

Institut für Biochemie und Biologie
Analytische Biochemie

**Entwicklung neuartiger biomimetischer Sensoren:
ein bifunktionaler Sensor auf Basis haptensierter
Cholinesterase**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin „Analytische Biochemie“

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Carsten Teller

Potsdam, Mai 2008

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen
Bedingungen 2.0 Deutschland

Um die Lizenz anzusehen, gehen Sie bitte zu:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.0/de/>

Online veröffentlicht auf dem

Publikationsserver der Universität Potsdam:

<http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2008/2502/>

urn:nbn:de:kobv:517-opus-25021

[<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-25021>]

Für meine Eltern und meinen Bruder

Wenn man sein Ziel kennt, gibt dies Festigkeit;
Festigkeit führt zu innerem Frieden;
innerer Frieden ermöglicht besonnenes Nachdenken;
besonnenes Nachdenken führt zum Gelingen.

LAO-TSE

Der Mensch hat dreierlei Wege klug zu handeln:
erstens durch Nachdenken, das ist der edelste;
zweitens durch Nachahmen, das ist der leichteste;
drittens durch Erfahrung, das ist der bitterste. . .

KONFUZIUS

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. (Acetyl)cholinesterasen	1
1.2. Cholinesterase-Inhibitoren	4
1.3. Biosensoren	11
1.3.1. Immobilisierungstechniken	12
1.3.2. Piezoelektrische Sensoren	13
1.3.3. Amperometrische Sensoren	16
2. Zielsetzung	19
3. Ergebnisse & Diskussion	23
3.1. Elektrochemische AChE-Aktivitätsmessung	23
3.1.1. Optimierung der amperometrischen Aktivitätsbestimmung	23
3.1.2. Inhibition mit Diisopropylfluorophosphat	27
3.1.3. Vergleich der Inhibitionskonstanten	28
3.1.4. Aktivierung der Phosphothionate	34
3.1.5. Inhibition mit Chlorpyrifos-oxon	36
3.2. Experimente mit 2,4-D als Hapten	38
3.2.1. Charakterisierung der 2,4-D-AChE-Konjugate	38
3.2.2. Einfluss von DMF auf die AChE-Aktivität	39
3.2.3. Test des 2,4-D-AChE-Konjugats in Mikrotiterplatten	39
3.2.4. EQCM mit 2,4-D-AChE an Propidium	41
3.2.5. Bindungstest mit anti-2,4-D-Antikörpern	43
3.2.6. Kompetitiver Immunoassay mit 2,4-D-modifizierten Sensoren	45
3.2.7. Anti-2,4-Antikörper-modifizierte Goldnanopartikel	47
3.2.8. Antikörper-modifizierte Silica-Nanopartikel	50
3.3. Experimente mit Kokain als Hapten	57
3.3.1. Charakterisierung der BZE-AChE-Konjugate	57
3.3.2. Untersuchung der Bindungskinetik des anti-BZE-Antikörpers	58
3.3.3. Kompetitiver Immunoassay mit Kokain und BZE-AChE	61
3.4. Test weiterer Erkennungselemente	64
3.4.1. Bindung von Butyrylcholinesterase an BZE-AChE	64
4. Zusammenfassung	67
5. Experimenteller Teil	71
5.1. Enzyme & Antikörper	71
5.2. Chemikalien	72

5.3. Puffer	73
5.4. Standardmethoden	74
5.4.1. Proteinbestimmung nach Bradford	74
5.4.2. Cholinesterase-Aktivitätsbestimmung nach Ellman	75
5.5. Modifizierung der piezoelektrischen Sensoren	76
5.5.1. Modifizierung mit Propidium	76
5.5.2. Modifizierung mit 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	77
5.5.3. Modifizierung mit BZE-DADDOO	79
5.6. Messapparatur	79
5.7. Experimente mit 2,4-D als Hapten	81
5.7.1. Synthese des 2,4-D-AChE-Konjugates	81
5.7.2. Einfluss von DMF auf die Enzymaktivität von AChE	82
5.7.3. ELISA mit 2,4-D-AChE	82
5.7.4. Bindung von anti-2,4-D-AK an 2,4-D-AChE	83
5.7.5. Kompetitiver Assay mit 2,4-D im Fließsystem	83
5.7.6. Kopplung von anti-2,4-D-AK an Goldnanopartikel	83
5.7.7. Test der AK-modifizierten Goldnanopartikel	84
5.7.8. Kopplung von MUA/MU an Goldnanopartikel	85
5.7.9. Kopplung von anti-2,4-D-AK an carboxy-terminierte Goldnanopartikel	85
5.7.10. Piezoelektrische Experimente mit anti-2,4-D-Goldnanopartikeln	85
5.7.11. Kopplung von anti-2,4-D-AK an Silica-Nanopartikel	86
5.7.12. Photometrische Detektion von Silica-Nanopartikeln	86
5.7.13. Partikel-ELISA mit anti-2,4-D-SNP	87
5.7.14. Piezoelektrische Experimente mit anti-2,4-D-Silica-Nanopartikeln	88
5.8. Experimente mit Kokain als Hapten	88
5.8.1. Synthese des BZE-AChE-Konjugates	88
5.8.2. Kinetik der Bindung des anti-BZE-Antikörpers an BZE-AChE	90
5.8.3. Kompetitiver Immunoassay im Fließsystem	90
5.8.4. Bindung von Butyrylcholinesterase an BZE-AChE	91
5.8.5. SDS-Gelelektrophorese der BZE-AChE-Konjugate	91
5.9. Experimente zur Inhibierung <i>in-situ</i> immobilisierter AChE	92
5.9.1. Inhibition mit Diisopropylfluorophosphat	92
5.9.2. Chemische Aktivierung von Chlorpyrifos und Terbufos	93
5.9.3. Inhibition mit Chlorpyrifos-oxon	93
Literaturverzeichnis	95
A. Anhang	113
B. Publikationen	117
C. Abkürzungen	119

1. Einleitung

1.1. (Acetyl)cholinesterasen

Die Reaktion auf externe Reize ist ein wesentliches Merkmal des Lebens [98]. Im Laufe der Evolution haben sich bei Wirbeltieren und wirbellosen Organismen unterschiedlich komplexe Systeme zur Signalweiterleitung ausgebildet. Hochspezialisierte Zellen bilden das Nervensystem, vom einfachen Nervennetz bei Nesseltieren über das Strickleiternnervensystem der Gliederfüßer bis zum peripheren und Zentralnervensystem bei den Wirbeltieren. Die Nervenzellen (Neurone) nutzen Unterschiede in der intra- und extrazellulären Ionenkonzentration zur Ausbildung und Weiterleitung elektrischer Potentiale. Bei der Weitergabe eines solchen Reizes an andere Nervenzellen kommen verschiedene niedermolekulare Substanzen – Neurotransmitter – zum Einsatz. Neben GABA (γ -Aminobuttersäure), Dopamin und Serotonin ist Acetylcholin am häufigsten an der chemischen Reizweiterleitung beteiligt [50, 84]. Nach der Ausschüttung eines Neurotransmitters ist es erforderlich, diesen möglichst schnell wieder abzubauen und aus dem synaptischen Spalt zu entfernen. Damit wird sowohl das vorherige Signal terminiert, als auch die Übertragung eines nachfolgenden Reizes vorbereitet.

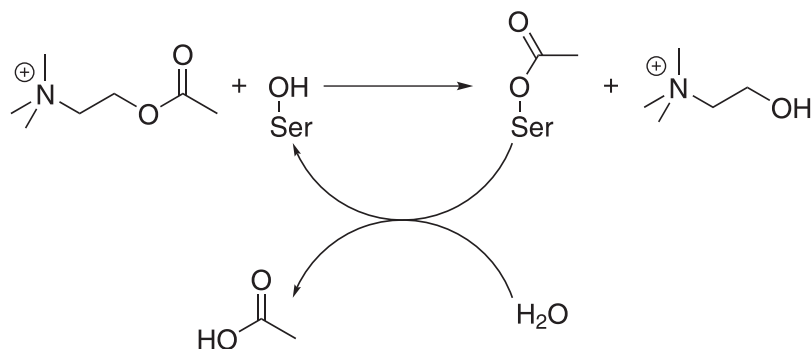


Abbildung 1.1.: Allgemeiner Reaktionsmechanismus der Acetylcholinhydrolyse durch die AChE

Im Falle des Acetylcholin wird die notwendige Hydrolyse durch ein hochspezialisiertes Enzym, die Acetylcholinesterase (EC: 3.1.1.7, AChE), katalysiert. Das allgemeine Reaktionssche-

ma des Acetylcholin-Abbaus ist in Abbildung 1.1 gezeigt. Aufgrund ihrer Funktion ist es nicht verwunderlich, dass man AChE vor allem in Geweben findet, in denen cholinerge Reizübertragung stattfindet. Dazu gehören das parasympathische vegetative Nervensystem, der sympathische Anteil des vegetativen Nervensystems und die neuromuskuläre Endplatte. Daneben wurde Acetylcholinesterase-Aktivität aber auch in nicht-neuronalen Geweben nachgewiesen. So findet man AChE sowohl im Blutplasma als auch auf den Erythrozytenmembranen [31]. Die Volumenaktivität der AChE im Plasma ist dabei vergleichbar mit der in der lumbalen Rückenmarksflüssigkeit [9].

In den meisten Vertebraten findet sich noch ein zweites Cholinesterase-Gen [125]. Dieses kodiert für eine Cholinesterase (ChE), die zwar auch im Nervengewebe vorkommt, aber im wesentlichen gelöst im Blutplasma vorliegt [31]. Im Gegensatz zur AChE, die bevorzugt Acetylcholin umsetzt und Cholinester mit größeren Seitenketten nur sehr langsam hydrolysiert, katalysiert dieses Enzym am besten die Hydrolyse von Butyrylcholin, aber auch Acetyl- und Propionylcholin mit vergleichbarer Geschwindigkeit [117]. Daher wird dieses Enzym Butyrylcholinesterase (EC: 3.1.1.8, BChE) genannt. Man findet in der Literatur allerdings auch die Bezeichnungen Serum-, Pseudo- oder unspezifische Cholinesterase. In der Rückenmarksflüssigkeit sind die Volumenaktivität der BChE und die der AChE ähnlich hoch. Im Serum ist die BChE-Volumenaktivität allerdings um den Faktor 350 höher [9]. Die biologische Rolle der Butyrylcholinesterase ist daher nicht direkt ersichtlich. Es gibt aber Hinweise darauf, dass die BChE entscheidend am Entgiftungssystem des Körpers beteiligt ist [70, 208]. Die humane BChE genießt besondere Aufmerksamkeit in der Anästhesie, wo sie für den Abbau des Muskelrelaxant Succinylcholin verantwortlich ist. So gibt es einige Mutanten der BChE, die nur geringe Hydrolyseaktivität für Succinylcholin zeigen [70] und somit für Komplikationen sorgen können.

Das aktive Zentrum beider Enzyme ist im Wesentlichen aus drei Teilen aufgebaut: der esterolytischen Tasche mit dem aktiven Serinrest, der anionischen Bindungsstelle und einem Gebiet aus hydrophoben Aminosäureresten. Die anionische Bindungsstelle befindet sich $\geq 4,7 \text{ \AA}$ vom aktiven Serinrest entfernt, während die hydrophobe Region zwischen den beiden ersteren Teilen und um sie herum liegt [148]. Die anionische Tasche dient in der AChE vor allem zum Binden und Orientieren des positiv geladenen Substrats. Häufig wird eine Aminosäure dieser Bindungstasche zu den katalytisch aktiven Resten hinzugezählt. Damit wird versucht, eine Analogie zur katalytischen Triade der Serinproteasen, wie zum Beispiel Chymotrypsin [134], herzustellen. Untersuchungen zu Isotopeneffekten mit schwerem Wasser (D_2O) haben jedoch gezeigt, dass die Hydrolyse von Cholinestern nach dem Schema einer Säure-Base-Katalyse abläuft [153]. In räumlicher Nähe zum aktiven Serinrest befindet sich ein Histidinrest. Dieser spielt eine wichtige Rolle im Reaktionsmechanismus der Acetylcholin-

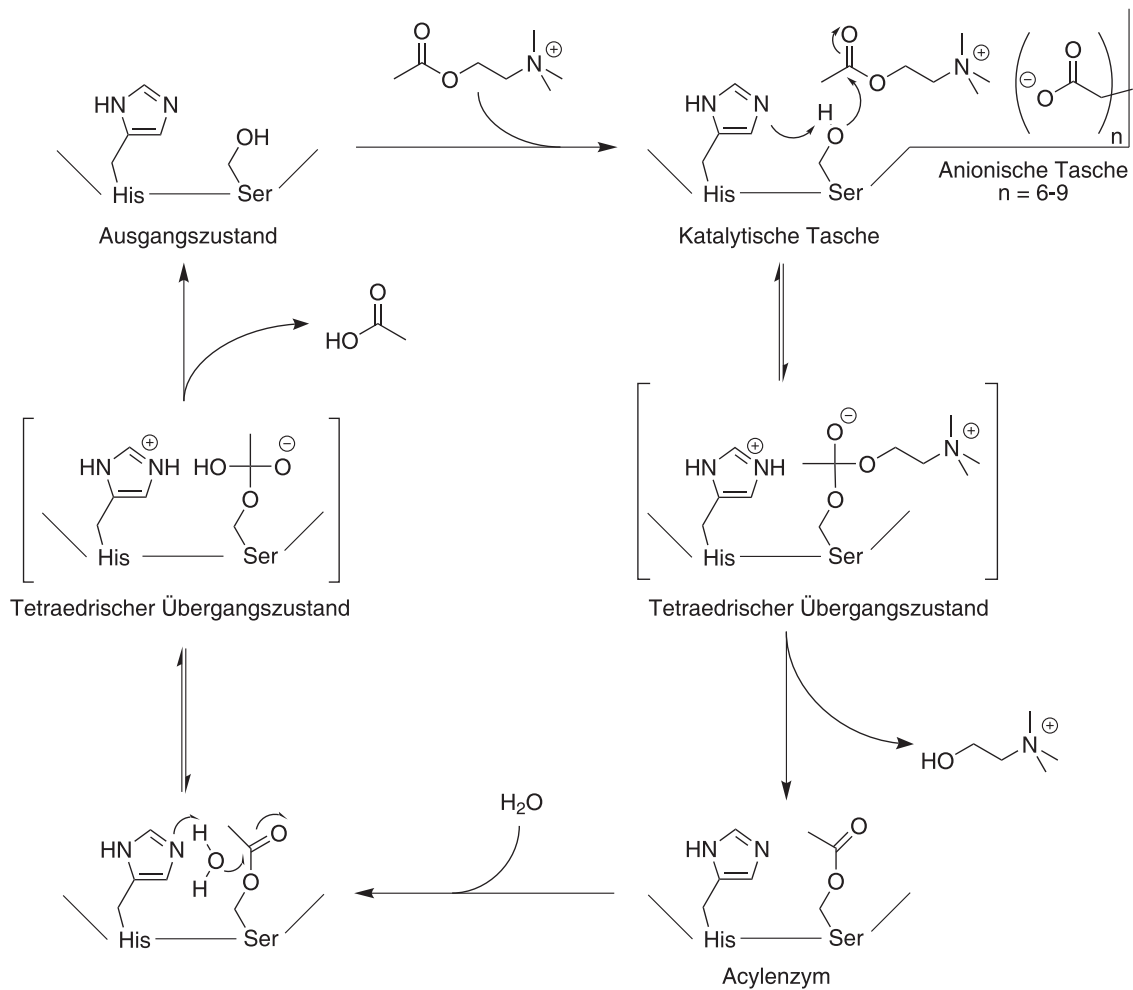


Abbildung 1.2.: Mechanismus der Säure-Base-Katalyse im aktiven Zentrum der Acetylcholinesterase, nach Quinn [148]

Hydrolyse (Abb. 1.2). Durch Übertragung eines Protons auf den Imidazolring des Histidins wird der Serinrest zum Alkoholat aktiviert. Dieses greift dann am Carbonylkohlenstoff des Cholinesters an. Die Reaktion läuft weiter über einen tetraedrischen Übergangszustand ab und führt zur Freisetzung des Cholins und einem acetylierten Serinrest. In der zweiten Hälfte des Zyklus wird der Essigsäureester des Serins hydrolysiert. Auch dieser Schritt läuft über einen tetraedrischen Übergangszustand und resultiert in der Freisetzung von Essigsäure. Das aktive Zentrum wird dadurch wieder in den Ausgangszustand zurückgeführt und kann den Katalysezyklus von neuem durchlaufen.

Aktuelle Studien haben gezeigt, dass Acetylcholin in seiner Funktion als Botenstoff nicht nur in Tieren, sondern auch in Pflanzen und Pilzen vorkommt. Dort ist es im Wesentlichen

an der Regulation des Wasserhaushalts und der Photosynthese beteiligt [202]. Sagane u. a. [156] konnten ein AChE-Gen in Pflanzen identifizieren. Das exprimierte Protein weist eine katalytische Triade wie bei Serin-Hydrolasen auf und zeigt eine Substrat- und Inhibitorspezifität wie AChE tierischen Ursprungs. Die Autoren vermuten, dass die pflanzliche AChE in der Nähe der Plasmodesmen lokalisiert ist und den Austausch von niedermolekularen Substanzen zwischen den Zellen über die Regulation von Kanalproteinen steuert.

Es gibt auch katalytische Antikörper mit ChE-ähnlicher Wirkung [93]. Johnson und Moore stellten bei der Produktion von Antikörpern gegen humane Erythrocyten-AChE fest, dass diese Antikörper ebenfalls die Hydrolyse von Acetyl- und Butyrylthiocholin katalysieren. Die Antikörper werden nicht durch Fasciculin, wohl aber durch Propidium, Gallamin und Tetramethylammoniumionen inhibiert. Außerdem konnte eine Hemmung durch BW284C51 (ein Tetrahydrobenzalacetone-Derivat) und eine Reaktion mit *iso*-OMPA (Diphosphorsäuretetra(isopropylamid)) festgestellt werden. Von allen Inhibitoren zeigten Tetramethylammoniumionen (TMA) die stärkste Hemmwirkung. Dies und die Tatsache, dass TMA zur Elution bei der Affinitäts-chromatographischen Aufreinigung der Erythrocyten-AChE vor der Immunisierung verwendet wurde, deuten auf ein Epitop gegen einen Komplex aus AChE und TMA hin. Das könnte die Bindung und damit auch die Umsetzung von kationischen Verbindungen wie z. B. Cholinestern erklären.

1.2. Cholinesterase-Inhibitoren

Die Inhibitoren der Acetylcholinesterasen lassen sich in vier Kategorien einteilen:

1. Organophosphate
2. Carbamate
3. Liganden, die im aktiven Zentrum binden und nicht unter 1 oder 2 fallen
4. Liganden der peripheren anionischen Bindungsstelle

Einige ausgewählte Organophosphate sind in Abbildung 1.4 dargestellt. Sie wirken als irreversible Inhibitoren der Cholinesterase. Sie binden wie die Cholinester im aktiven Zentrum des Enzyms und werden ähnlich wie diese umgesetzt. Dabei kommt es zu einer Phosphorylierung des aktiven Serinrestes und der Abspaltung eines der Alkyl- oder Aryl-Reste am Organophosphat. Damit ist das aktive Zentrum zunächst nur kurzfristig inaktiviert. Die meisten Organophosphate durchlaufen dann aber einen sogenannten „Aging“-Prozess, bei dem ein weiterer Phosphorsäureester gespalten wird die Bindung zum Serin aber erhalten bleibt (siehe Abb. 1.3). Durch Zugabe von Oximen kann das Phosphat jedoch auch auf das

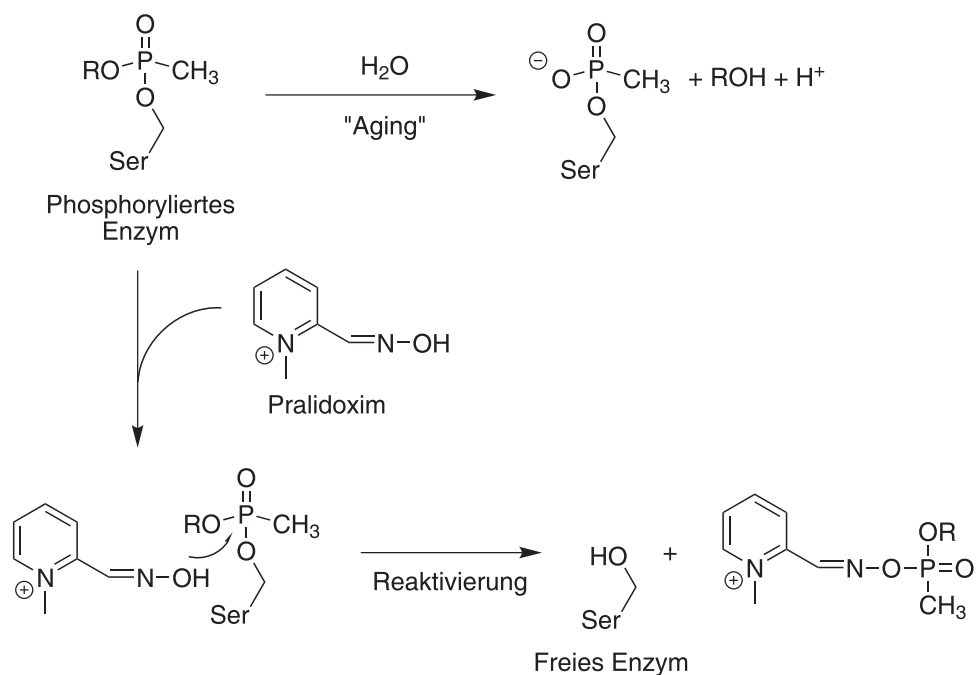


Abbildung 1.3.: Reaktionen von Methylphosphono-AChE: „Aging“ bzw. Reaktivierung durch Pralidoxim (2-PAM); R = Alkylrest; nach Luo u. a. [116] und Taylor u. a. [184]

Oxime übertragen werden und damit die Cholinesterase reaktivieren [116]. Solche Oxime haben daher eine weite Verwendung in der Biosensorik gefunden, wo sie genutzt werden, um die wiederholte Messung einer Organophosphat-Inhibition mit einem Sensor zu ermöglichen [19, 184, 194]. Auf der anderen Seite sind sie von pharmakologischer Bedeutung und finden Anwendung bei Organophosphatvergiftungen [116, 195]. Die Symptome einer solchen Vergiftung beim Menschen variieren je nach Dosis und Dauer der Exposition [135]. Meist kommt es zu Sehstörungen, Atemnot, Muskelzucken und Krämpfen, Schweißausbrüchen, Erbrechen und Bewußtlosigkeit, die schließlich über zentrale und periphere Atemlähmung zum Tod führen.

Organophosphate werden zumeist als Pestizide, aber auch als chemische Kampfstoffe eingesetzt. Sarin, Soman und Tabun sind Kampfstoffe der G-Klasse, die von Schrader und seinen Mitarbeitern in den 1930er Jahren bei der IG Farben ursprünglich als Insektenvernichtungsmittel entwickelt wurden. VX gehört wie die übrigen Kampfstoffe der V-Gruppe zu den Phosphonsäurethiocholinestern. Diese Substanzen wurden Anfang der 1950er Jahre zeitgleich von Tammelin [181] in Schweden und Ranaji Goshem in den USA entwickelt. VX wurde zuletzt im ersten Irakkrieg militärisch eingesetzt und erst durch die Chemiewaffenkonvention von 1997 verboten [33]. Neben der Detektion ist auch die Entgiftung solcher

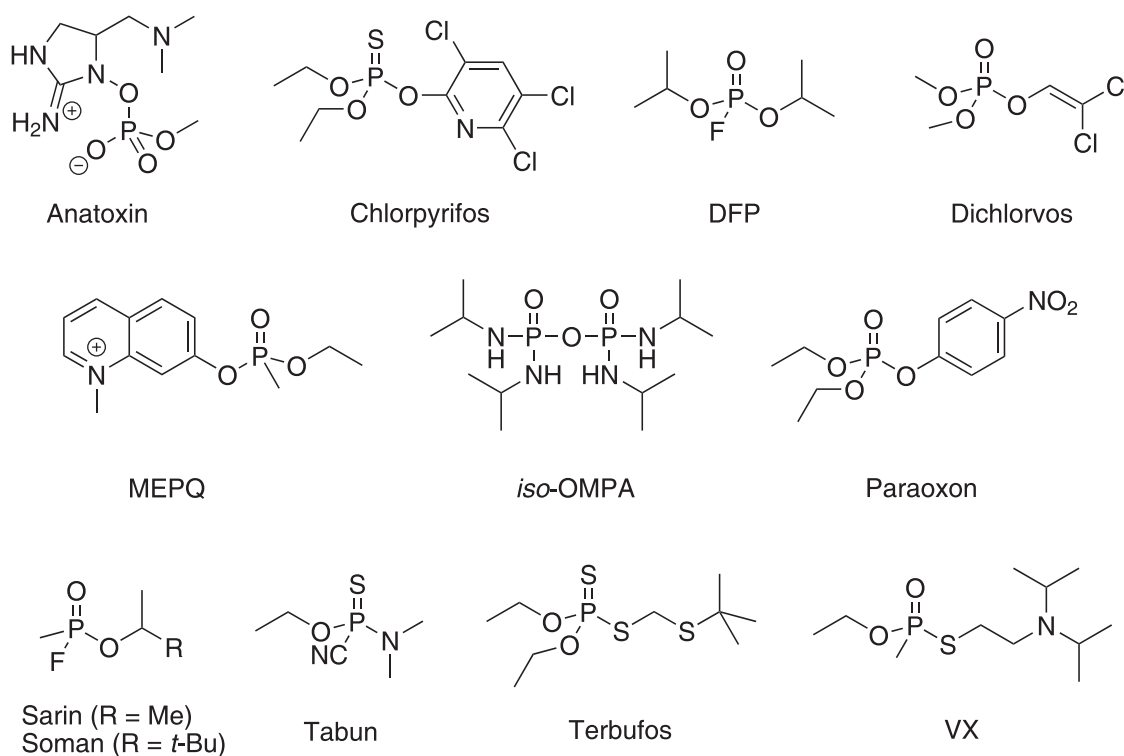


Abbildung 1.4.: Cholinesterase-Inhibitoren: ausgewählte phosphororganische Verbindungen

Kampfstoffe von hoher Bedeutung. Vayron u. a. [196] untersuchten die Möglichkeit katalytische Antikörper zum Abbau von Organophosphaten, insbesondere VX, herzustellen. Die erhaltenen Antikörper zeigten Affinitäten im mikromolaren Bereich und konnten für das Phenylanalogon von VX eine signifikante Umsatzgeschwindigkeit vorweisen.

Paraoxon, Dichlorvos, Chlorpyrifos und Terbufos finden vor allem als Pestizide Anwendung [81]. Chlorpyrifos-oxon wird unter dem Namen Dursban[®] als Larvizid gegen Mosquitos eingesetzt. Es wurde von der EU im Rahmen der „European Water Directive 2000/60/EC“ in die Liste der *priority substances under review* aufgenommen [189]. Dabei wurde eine Belastungsgrenze von 0,1 µg/l (\cong 0,3 nM) im Trinkwasser festgelegt.

MEPQ (ein Methylcholiniumderivat) wurde entwickelt, um die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke für Cholinesterase-Inhibitoren zu untersuchen [111]. Das Fluoreszenzsignal der 7-Hydroxy-1-methylcholinium-Abgangsgruppe ermöglichte dabei die direkte Beobachtung der Inhibitionskinetik. Dieses Organophosphat wird wie auch Diisopropylfluorophosphat (DFP) vor allem in der akademischen Forschung verwendet, unter anderem zur Titration des aktiven Zentrums von Cholinesterasen [30, 105].

Dies funktioniert allerdings nicht mit Cholinesterasen aller Spezies. So zeigt AChE aus dem Tintenfisch *Loligo opalescens* im Vergleich zur TcAChE den Austausch einiger Aminosäuren in der Nähe der Acylbindungstasche. Talesa u. a. [179] konnten zeigen, dass das in COS-Zellen exprimierte Enzym AChE-typische Eigenschaften wie Substratspezifität und Hemmung durch Eserin und Edrophonium aufweist. Allerdings konnte keine Inhibition der katalytischen Aktivität durch DFP erzielt werden. Eine ähnliche Spezifität liegt der Reaktion von Cholinesterasen mit *iso*-OMPA (Diphosphorsäuretetra(isopropylamid)) zu Grunde. Dieses Organophosphat wird zur Diskriminierung zwischen Acetyl- und Butyrylcholinesterase in histologischen Schnitten oder Enzympräparationen genutzt, da es die BChE mit deutlich höherer Effizienz hemmt [57].

Anatoxin ist ein natürlich vorkommendes Organophosphat. Es wird von Cyanobakterien der Gattung *Anabaena* produziert [126]. Es dient daher als Biomarker für die Wasserqualität bei der Belastung mit Cyanobakterien. Boublik u. a. [21] führten Mutagenese-Experimente mit *Drosophila* AChE durch, um einen empfindlichen Anatoxin-Nachweis zu ermöglichen.

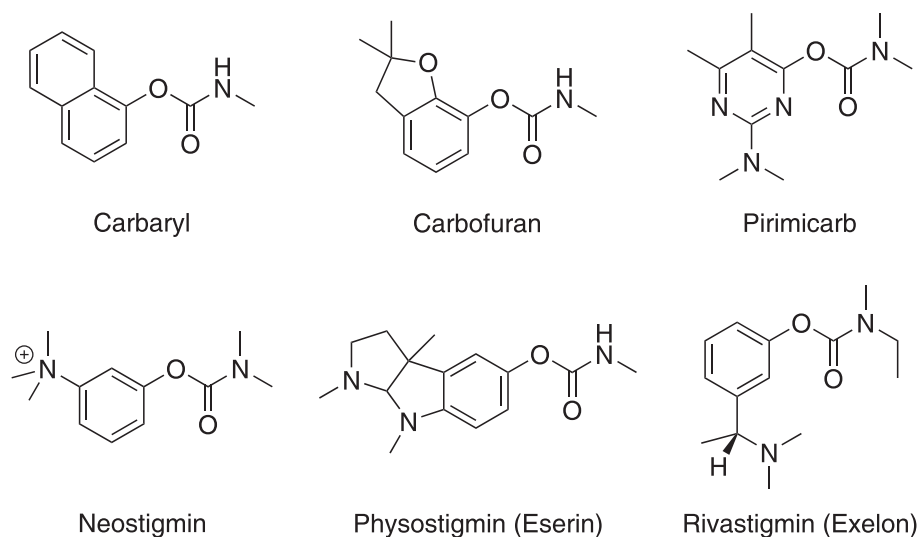


Abbildung 1.5.: Carbamate: ausgewählte Pestizide (obere Reihe) und Pharmaka (untere Reihe)

Die zweite große Gruppe von Cholinesteraseinhibitoren sind Carbamate. Diese Derivate der Carbaminsäure binden im aktiven Zentrum der Cholinesterasen und können ebenfalls wie das natürliche Substrat umgesetzt werden. Der Serinrest im aktiven Zentrum wird dabei zwischenzeitig carbamoyliert, kann aber durch Reaktion mit Wasser wieder in die aktiven Form zurückgeführt werden. Die Carbamate zählen somit zu den kompetitiven, reversiblen Inhibitoren. In Abbildung 1.5 sind die Strukturformeln einiger, ausgewählter Carbamate

dargestellt. Diese Substanzen werden zumeist als Pestizide oder Pharmaka verwendet.

Carbaryl, Carbofuran und Pirimicarb finden im großen Maßstab Verwendung als Insektizide [81]. Carbaryl wirkt als Fraß- und Kontaktgift und wird vor allem zur Bekämpfung des Kapselkäfers im Baumwollanbau verwendet. Carbofuran hat eine sehr hohe Breitenwirkung, ist im Gegensatz zum Carbaryl aber nicht bienengefährlich. Vielfältig sind daher auch die Anwendungsgebiete: unter anderem im Weinbau and Hopfenanbau. Als drittes Beispiel sei Pirimicarb erwähnt. Es bekämpft effektiv Blattläuse, schont aber im Acker bedeutsame Nützlinge wie den Marienkäfer und die Florfliege.

Daneben haben Carbamate auch eine große pharmazeutische Bedeutung. Neostigmin wirkt stimulierend auf die Acetylcholinrezeptoren, kann aber aufgrund des quartären Stickstoffs nicht die Blut-Hirn-Schranke passieren. Es wird daher hauptsächlich bei Atrophien, so zum Beispiel zur Reaktivierung der Muskeln nach einer Anästhesie, eingesetzt [195]. Physostigmin kann auch im zentralen Nervensystem wirken und wird deshalb auch bei Vergiftungen mit stärkeren Cholinesterase-Hemmern verwendet. Ein weiteres Anwendungsgebiet liegt in der Augenheilkunde zur Pupillenkonstriktion und Verringerung des Augendrucks bei Grünem Star. Daneben haben Cholinesterase-Inhibitoren in den letzten Jahren große Aufmerksamkeit auf dem Gebiet der Alzheimer-Therapie erfahren. So wird das Carbamat Rivastigmin unter dem Namen Exelon bereits in klinischen Studien eingesetzt [14].

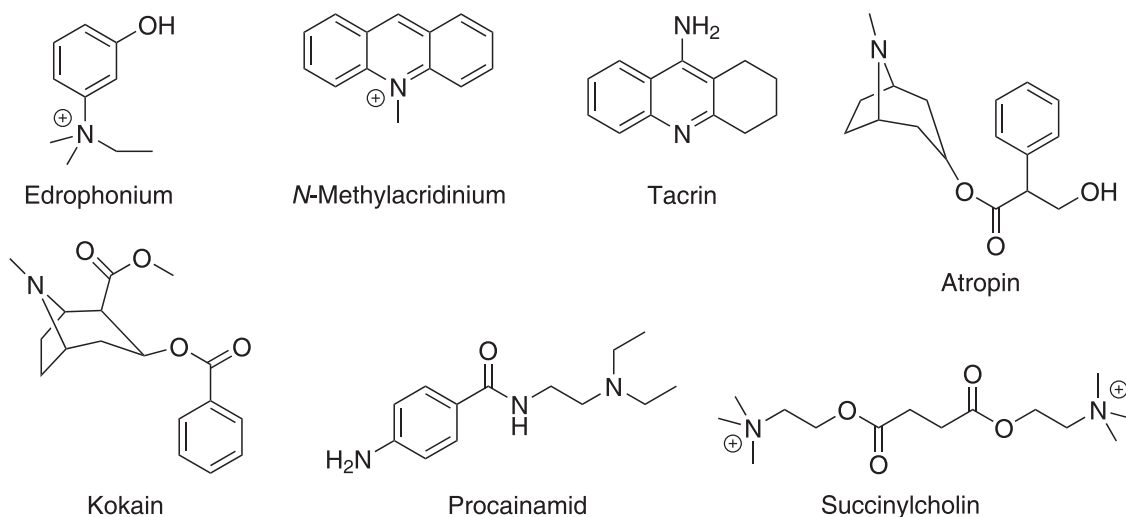


Abbildung 1.6.: Weitere im aktiven Zentrum der Cholinesterase bindende Liganden

Liganden der dritten Kategorie binden zwar im aktiven Zentrum der Cholinesterase, gehören aber weder zu den Organophosphaten noch zu den Carbamaten. Succinylcholin wird auch als Substrat umgesetzt, wenn auch mit sehr viel geringerer Geschwindigkeit [3]. In der Me-

dizin findet es als Muskelrelaxant bei Operationen Verwendung [70]. Edrophonium, Tacrin, *N*-Methylacridinium und Procainamid binden aufgrund der Kombination aus hydrophobem, aromatischen Ringsystem und positiv geladenem Stickstoff in der anionischen Tasche des aktiven Zentrums. Damit blockieren sie die Substratbindung und wirken somit als kompetitive Inhibitoren. Sie werden vor allem für die Bestimmung von Cholinesteraseaktivität in Gewebeextrakten oder Zellkulturüberständen verwendet [67]. Ein weiteres Anwendungsgebiet für die Acridinderivate und Procainamid liegt in der affinitätschromatographischen Aufreinigung von Cholinesterasen [70].

Die Alkaloide Atropin und Kokain binden sowohl an Acetylcholinrezeptoren als auch an die Cholinesterase. Atropin, gewonnen aus der Tollkirsche *Atropa belladonna*, ist das racemische Gemisch von D,L-Hyoscyamin [195] und bindet vor allem an die muscarinischen Acetylcholinrezeptoren des zentralen Nervensystems. Atropin deckt ein weites Spektrum pharmakologischer Anwendungen ab. Es wird aber vor allem bei Lokalanästhesie und in der Augenheilkunde eingesetzt. Lange Zeit wurde Atropin in den adeligen Kreisen zur Vergrößerung der Pupillen eingesetzt. Daher stammt auch der lateinische Name der Tollkirsche (ital. *bella donna* = schöne Frau).

Kokain ist eines von vielen Ecgoninderivaten, die aus dem Kokastrauch *Erthroxylon coca* extrahiert werden können. Kokain wird heutzutage nur noch in Ausnahmefällen pharmazeutisch verwendet. Der empfindliche Nachweis von Kokain ist von hohem forensischem Interesse. Zu den meistgenutzten Detektionsmethoden zählen GC-MS [55] und ELISA-Kits [147]. Aber auch die Entwicklung von Aptameren, das heißt nieder-molekulare Substanzen bindenden Nukleinsäuren, für einen Kokain-Nachweis war erfolgreich [112]. Im menschlichen Körper sind vor allem zwei Enzyme an der Bindung und dem Abbau von Kokain beteiligt: die Butyrylcholinesterase und die Lebercarboxylase [208]. Dabei spaltet erstere die Benzoessäureesterbindung, während die Carboxylase den Methylester hydrolysiert. Dies unterstützt die These, dass die BChE hauptsächlich für Entgiftung anti-Cholinesterase-wirksamer Substanzen vorhanden ist. Tatsächlich konnten *in vivo* Experimente mit Ratten [127] und Affen [26] zeigen, dass zusätzlichen Gaben von BChE die tödliche Wirkung einer Kokain-Überdosis abwenden. Einige Bakterien vom Stamm der Rhodococci, die im Wurzelgeflecht des Kokastrauchs leben, verfügen sogar über eine spezifische Kokainesterase (cocE). Diese ermöglicht es ihnen, Kokain als alleinige Stickstoff- und Kohlenstoffquelle zu verwenden [193].

Die vierte Kategorie von Cholinesterase-Inhibitoren umfasst die Substanzen, die mit der peripheren anionischen Bindungsstelle des Enzyms wechselwirken. Diese wird in der englischsprachigen Literatur als *peripheral anionic site* (kurz: PAS) bezeichnet. Sie liegt nahe des Eingangs zum aktiven Zentrum – dem so genannten *active-site gorge*. Liganden der PAS können unter Umständen den Zugang zum aktiven Zentrum blockieren [154] und damit

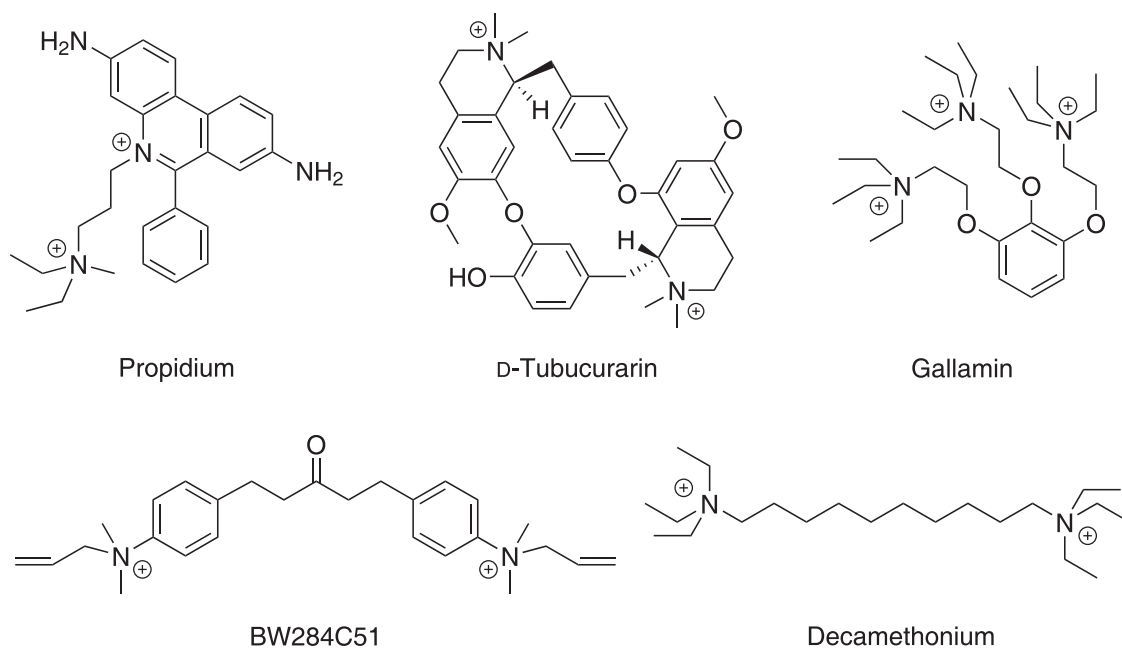


Abbildung 1.7.: Liganden der peripheren anionischen Bindungsstelle (PAS) der Acetylcholinesterase

auch die Reaktion mit Organophosphaten deutlich verlangsamen [120]. An der PAS erfolgt auch die erste Bindung von Acetylcholin bevor es im aktive Zentrum hydrolysiert wird. Diese Bindungsstelle ist damit auch für die Substratüberschuss-Hemmung mit Acetylcholin verantwortlich [178]. Die Butyrylcholinesterase weist keine PAS auf [78] und wird daher auch nicht durch höhere Substratkonzentrationen gehemmt [117].

D-Tubocurarin ist die aktive Komponente von Curare, eines giftigen Chodrodendron-Extrakts, der von den Indianern am Amazonas und Orinoko als Pfeilgift verwendet wird [169]. Es wird aufgrund seiner Bindung an nikotinische Acetylcholinrezeptoren als Muskelrelaxant eingesetzt [8]. Goličnik u. a. [69] beschrieben die Bindung von D-Tubocurarin an die PAS von *Drosophila* AChE. Gallamin wird (unter dem Namen Flaxedil) ebenfalls als Muskelrelaxant eingesetzt [195]. Die Bindung an die PAS konnte mit Hilfe der Röntgenkristallographie nachgewiesen werden [22].

Während D-Tubocurarin und Gallamin aufgrund sterischer Hinderung nur an der Oberfläche der AChE binden können, überbrücken die linearen Inhibitoren BW284C51, ein Tetrahydrobenzalaceton-Derivat, und Decamethonium die komplette Distanz von der PAS zum aktiven Zentrum [15].

Propidium wurde ursprünglich in der Zellbiologie als Interkalator doppelsträngiger DNS eingesetzt [205]. Fluoreszenzuntersuchungen von Taylor und Lappi [183] konnten zeigen, dass Propidium auch an periphere Bindungsstelle von Acetylcholinesterasen bindet. Das Fluoreszenzsignal des freien Propidiums wird durch die Bindung an die AChE deutlich verstärkt. Die Struktur muriner AChE im Komplex mit Propidium wurde 2003 durch Bourne u. a. [22] aufgeklärt.

Cavalli u. a. [28] studierten die Bindung von Propidium an humane Acetylcholinesterase mittels *molecular dynamics* Simulationen. Sie heben die Rolle der peripheren anionischen Bindungsstelle PAS in der AChE bei Neurogenese und Synaptogenese, sowie bei der Stimulation der Amyloidfaserbildung bei Alzheimererkrankten hervor. Weiterhin wird die π - π -Überlappung zwischen dem Indolring von Trp286 und dem Phenanthridiniumteil des Propidium deutlich. Indizien für einen *cross-talk* zwischen der peripheren und der katalytischen Bindungsstelle, die bereits bei den kristallographischen Untersuchungen [22] gefunden wurden, konnten erhärtet werden.

Untersuchungen zur Rolle der AChE und der PAS bei der Amyloidfibrillenbildung wurden von Alvarez und Inestrosa [4, 89] untersucht. Im Gehirn von Alzheimer-Patienten findet sich häufig eine Colokalisierung von Acetylcholinesterase und Amyloid- β -Peptid ($A\beta$). Inestrosa u. a. konnten zeigen, dass AChE – aber nicht BChE – die Fibrillenbildung von Wildtyp- $A\beta$ und mutierten $A\beta$ -Peptiden beschleunigte. Diese Wirkung konnte im Fall der AChE durch Zugabe von Propidium unterbunden werden. Der Einsatz von Edrophonium (einem Inhibitor des aktiven Zentrums) blieb wirkungslos.

Auch Ethidiumbromid, das eigentlich nur als Interkalator doppelsträngiger DNS eingesetzt wird, bindet an Acetylcholinesterase. Mazzanti u. a. [128] untersuchten die *in-vivo* Inhibition der AChE im Rattengehirn. Als K_i -Wert wurden 2,36 μ M bis 6,8 μ M bestimmt. Die Autoren vermuten, dass Ethidiumbromid wie Propidium über die PAS an die AChE bindet.

1.3. Biosensoren

Im Jahr 1999 wurde die Definition eines (elektrochemischen) Biosensors wie folgt durch die IUPAC [190] festgelegt:

„A [...] biosensor is a self-contained integrated device, which is [...] using a biological recognition element (biochemical receptor) which is retained in direct spatial contact with a [...] transduction element.“

Die wesentliche Eigenschaft eines Biosensors besteht demnach in der direkten räumlichen Kopplung von biologischem Erkennungselement und Transducer zur Umwandlung des biologischen Signals. Während die ursprüngliche Definition auf elektrochemische Transducer, wie zum Beispiel potentiometrische, amperometrische und konduktometrische Sensoren, beschränkt war, existieren noch viele weitere Möglichkeiten zur Signaltransduktion [159]. Hierzu gehören Thermistoren zur Messung der Reaktionsenthalpie [40], die gravimetrische Bestimmung mittels piezoelektrischer Sensoren (siehe Seite 13) und diverse optische Detektionsmethoden, wie Spektrophotometrie [121], Fluoreszenzmessung [25] und Reflektometrie [51]. Der Aufbau eines Biosensors ist schematisch in Abbildung 1.8 gezeigt.

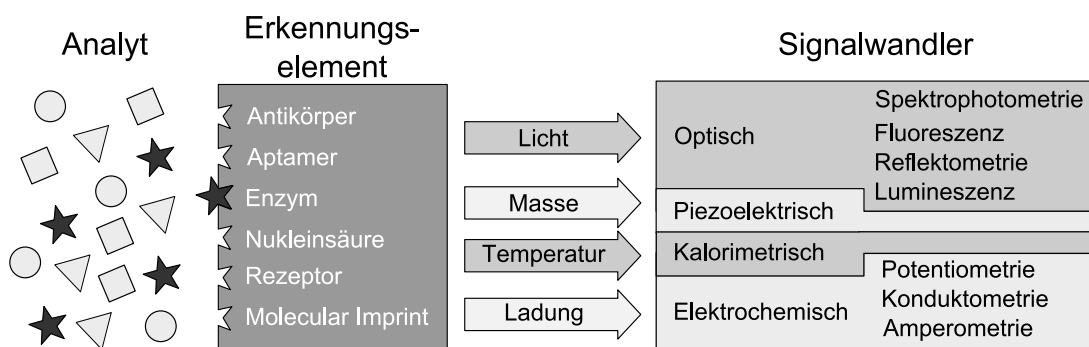


Abbildung 1.8.: Biosensor-Schema: Detektion eines Analyten aus einem Substanzgemisch durch das Erkennungselement und Umwandlung in ein aufzeichenbares Messsignal

1.3.1. Immobilisierungstechniken

Für die Herstellung eines direkten räumlichen Kontakts zwischen der biologischen und der signalumwandelnden Komponente des Biosensors sind effiziente Immobilisierungstechniken unerlässlich. Für die direkte chemische Kopplung von Proteinen an Oberflächen und von Proteinen untereinander gibt Hermannson [82] eine umfassende Übersicht. Neben der „klassischen“ (und in der Regel unspezifischen) Verknüpfung mittels Glutaraldehyd [1] hat sich die Verwendung von niedermolekularen Anker-Molekülen zur Immobilisierung durchgesetzt. Das Biotin-Avidin-System ist eines der beststudierten Kopplungssysteme und wurde ausführlich in einem Übersichtsartikel von Wilchek und Bayer [204] beschrieben. Aktuelle Entwicklungen gehen sogar dahin, die chemische Kopplung von Biotin zu umgehen und direkt ein terminales, Avidin-bindendes Peptid am Fusionsprotein zu exprimieren [108]. Daneben sind Lipid-Anker ein in der Natur weit verbreitetes Konzept zur Fixierung von Proteinen an der Zellmembran [35]. Dieser Ansatz hat in den letzten Jahren auch in der Biosensorik breite Resonanz gefunden [182]. Bei Protein-Protein-Kopplungen haben Antikörper-Enzym-Konjugate

eine erfolgreiche Geschichte auf dem Gebiet der ELISAs (*enzyme-linked immunosorbent assays*) [192].

Die direkte Wechselwirkung zwischen biologischem Erkennungselement und dem Transducer erfolgt im einfachsten Fall durch Adsorption an der Sensoroberfläche [149]. Eine weitere, relativ unspezifische Methode ist der Einschluss von Enzymen in Sol-Gelen [6, 110]. Dagegen bieten SAMs (*self-assembled monolayers* = selbstorganisierte Monoschichten) die Möglichkeit zur definierten Funktionalisierung der Sensoroberfläche. Mrksich und Whitesides [132] und Bain u. a. [13] beschreiben ausführlich die Verwendung von Mercaptoverbindungen zur Modifikation von Goldelektroden. SAMs bieten außerdem den Vorteil eines schnellen Elektronentransfers, was für die Anwendung von Protein-elektrochemischen Sensoren unerlässlich ist [155]. Auch die Verwendung von Polyelektrolyten in *layer-by-layer*-Aufbauten folgt in erster Linie dem Wunsch nach einer definierten Modifizierung und einer guten elektrochemischen Ansprechbarkeit der Sensoroberfläche [42].

1.3.2. Piezoelektrische Sensoren

Auf dem Gebiet der markierungsfreien Detektionsmethoden haben piezoelektrische Sensoren in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Durch Fortschritte bei der Fertigungstechnik und der Entwicklung von Mikrofluidiksystemen haben sich Piezosensoren zu einer wertvollen Alternative zu Oberflächenplasmonresonanz (SPR) und Gitterkopplern entwickelt [104].

Der piezoelektrische Effekt wurde 1880 von den Gebrütern Curie [37–39] entdeckt. Sie fanden heraus, dass bestimmte (piezoelektrische) Kristalle bei mechanischer Belastung elektrische Ladungen auf ihrer Oberfläche entstehen lassen. Dies beruht auf der Verschiebung der Ladungsschwerpunkte innerhalb der Elementarzelle, wenn eine Kraft F auf das piezoelektrische Material einwirkt (griech.: $\pi\iota\acute{\epsilon}\zeta\epsilon\iota\nu$ = drücken). Dadurch kommt es zur Bildung mikroskopischer Dipole und einer damit verbundenen Polarisation des Kristalls [203]. Es wird ein Dipolmoment senkrecht zur einwirkenden Kraft F und proportional zum Betrag von F ausgebildet. Viele Materialien, deren Kristalle kein Symmetriezentrum aufweisen, zeigen piezoelektrische Eigenschaften. Dazu gehören natürlich vorkommende Kristalle wie Kaliumnatriumtartrat (Rochellesalz), Rohrzucker und Quarz (SiO_2). Aber auch getrocknete Knochen weisen aufgrund ihres Apatitgehalts piezoelektrische Eigenschaften auf [63]. Industrielle Anwendung finden vor allem synthetische Keramikmaterialien wie zum Beispiel Bleizirkonattitanat, Lithiumniobat und Lithiumtantalat.

Neben der Einteilung nach ihrer chemischen Zusammensetzung können piezoelektrische Sensoren auch nach der Art ihres Betriebsmodus unterschieden werden. Runde Quarzplätt-

chen mit kreisförmigen Elektroden werden als Dickenschwinger, auch als TSM-Resonatoren (*thickness shear mode*) bekannt, eingesetzt. Die Wellenleitung erfolgt hier durch das Kristallvolumen mit transversaler, d.h. senkrecht zur Ausbreitungsrichtung verlaufender, Teilchenauslenkung. Diese Transversalwellen werden auch als Scherwellen bezeichnet. Die Wellenlänge der Grundschwingung folgt dabei der Bedingung $\lambda_0 = 2d$, d.h. die entsprechende Resonanzfrequenz ist der Dicke des Quarzplättchens ($f_0 \propto 1/d$) umgekehrt proportional.

Der Einsatz eines solchen Dickenschwingers als Quarz-Mikrowaage wurde erstmals von Sauerbrey [158] im Jahre 1959 beschrieben. Sauerbrey erkannte, dass sich bei einer Massenbelegung eines Dickenschwingers formal nur die Dicke des Resonators ändert, während die übrigen mechanischen Eigenschaften des Quarzkristalls unverändert bleiben. Daher ergibt sich die Frequenzänderung Δf infolge einer Massenbelegung der Oberfläche Δm aus:

$$\frac{\Delta f}{f_0} = -\frac{\Delta d}{d} = -\frac{\Delta m}{\rho_q \cdot d \cdot A} \quad (1.1)$$

Dabei sind f_0 und d die Grundfrequenz respektive die Dicke des unbeschichteten Quarzplättchens. Weiterhin spielen die Elektrodenfläche A und die Dichte von Quarz ($\rho_q = 2,65 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$) eine Rolle. Wird noch die Resonanzbedingung der Grundschwingung $f_0 = c_q/2d$ zu Gleichung 1.1 einbezogen, so ergibt sich:

$$\Delta f = \frac{-2f_0^2}{c_q \cdot \rho_q \cdot A} \Delta m = \frac{-2f_0^2}{\sqrt{\mu_q} \rho_q A} \Delta m \quad (1.2)$$

Die Konstante c_q bezeichnet die Wellenausbreitungsgeschwindigkeit der Transversalwelle in Quarz und liegt bei ca. $3330 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$. Die Gleichung 1.2 wird nach ihrem Entdecker auch gemeinhin „Sauerbrey-Gleichung“ [158] genannt. Durch Umstellen der Sauerbrey-Gleichung 1.2 lässt sich die theoretische Sensitivität S des Schwingquarzes berechnen. Für einen Elektrodendurchmesser von 5 mm, eine Grundfrequenz von 10 MHz und Schermodulus $\mu_q = 2,947 \cdot 10^6 \text{ N} \cdot \text{cm}^{-2}$ ergibt sich:

$$S = \frac{|\Delta f|}{\Delta m} = 1,16 \text{ Hz/ng} \quad \text{bzw.} \quad 0,86 \text{ ng/Hz} \quad (1.3)$$

Damit ist ein solcher Schwingquarz nicht mehr nur eine Mikrowaage, sondern kann schon als QCN (*quartz crystal nanobalance*) bezeichnet werden. Einschränkend muss aber gesagt werden, dass die Sauerbrey-Gleichung nur für Messungen im Vakuum und unter bestimmten Bedingungen auch in der Gasphase gültig ist. Lange Zeit wurden piezoelektrische Sensoren daher ausschließlich für besondere Anwendungen, wie zum Beispiel zur Bestimmung der Schichtdicke aufgebracht Metallfilme [129], eingesetzt. Aber auch die Entwicklung von Sensoren zur Bestimmung verschiedenster Analyten in der Gasphase wurde vorangetrieben.

So haben Shackelford und Guilbault [164] bereits 1974 einen piezoelektrischen Sensor zur Detektion von Organophosphaten in der Luft vorgestellt.

Daneben gibt es auch die Gruppe der SAW-Sensoren (*surface acoustic wave*). Diese zeichnen sich dadurch aus, dass die akustische Wellenleitung lateral, das heißt entlang der Kristalloberfläche, erfolgt. Zur Anregung dieser Schwingung werden meist Interdigitalelektroden auf dem piezoelektrischen Material aufgebracht [200, 207]. SAW-Sensoren bieten den Vorteil, dass sie die Arbeit mit sehr hohen Frequenzen – bis in den Gigahertz-Bereich [46] – ermöglichen. Da die Grundfrequenz im Quadrat in die Sauerbrey-Gleichung eingeht, machen SAW-Sensoren ungleich empfindlichere Messungen möglich. Unter anderem kann man damit auch die Bindung niedermolekularer Substanzen verfolgen [45].

Bei der Arbeit mit piezoelektrischen Kristallen in der Flüssigphase muss das einfache Sauerbrey-Modell um einige Faktoren zur Beschreibung des Systems erweitert werden. In flüssigen Umgebungen kommt es u. a. zur Dämpfung der Grundschiwingung, da die Masse, die auf den Quarzkristall einwirkt, nicht mehr starr mit diesem verbunden ist. Wichtige Faktoren sind dabei die Dichte ρ_l und die Viskosität ν_l der Flüssigkeit, die im Kontakt mit dem Schwingquarz ist. Kanazawa und Gordon [97] haben ein Modell entwickelt, das das Verhalten des Quarzes in Kontakt mit einer Flüssigkeit hinreichend beschreibt:

$$\Delta f = -\sqrt{\frac{\rho_l \cdot \nu_l}{\pi \cdot \rho_q \cdot \mu_q}} f_0^3 \quad (1.4)$$

In Gleichung 1.4 wird allerdings noch nicht der Einfluss einer adsorbierten Masse berücksichtigt. Der Vollständigkeit halber sei deshalb erwähnt, dass Martin u. a. [122] das Kanazawa-Modell um eine simultan aufgebraachte Masseschicht erweitert haben. Erste Untersuchungen von Proteinwechselwirkungen mit einem Piezosensor in Flüssigkeit wurden von Kößlinger u. a. [103] publiziert.

Im Allgemeinen hängt die gemessene Frequenzdifferenz Δf nicht nur von einer Änderung der Masse Δm , sondern von weiteren Faktoren wie der Viskosität ν , der Dichte ρ und der Temperatur T ab [151]:

$$\Delta f = \frac{\partial f}{\partial m} \Delta m + \frac{\partial f}{\partial \nu} \Delta \nu + \frac{\partial f}{\partial \rho} \Delta \rho + \frac{\partial f}{\partial T} \Delta T + \dots \quad (1.5)$$

Der Einfluss der Temperatur ist zu vernachlässigen, wenn Quarzplättchen verwendet werden, die im sogenannten AT-Schnitt (siehe Abb. 1.9) geschnitten wurden. Bedingt durch die Kristallstruktur des Quarzes zeichnet sich der AT-Schnitt durch eine sehr gute Temperaturstabilität aus [91].

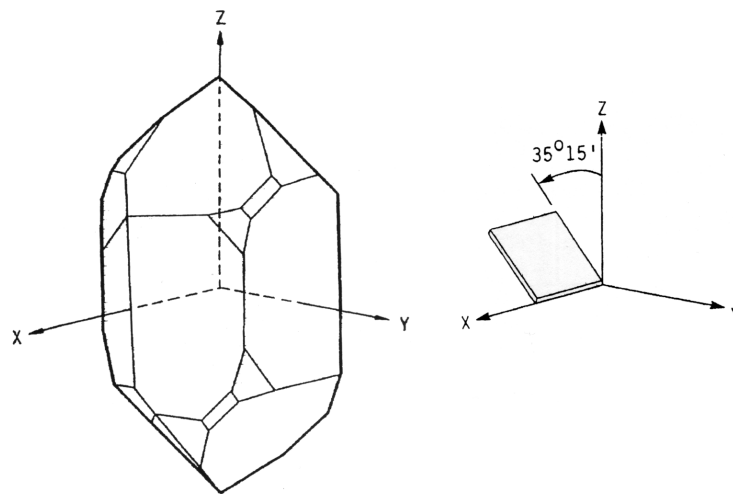


Abbildung 1.9.: Schematische Darstellung eines Quarzkristalls (links) und Lage des AT-Schnitts bezogen auf die Kristallachsen (rechts)
 Quelle: O'Sullivan und Guilbault [143], modifiziert

Diese Eigenschaften von Quarzsensoren und die sprunghafte Entwicklung der Regelelektronik in den letzten Jahren haben dafür gesorgt, dass piezoelektrische Detektoren auch verstärkt in der Biosensorik eingesetzt werden. Zu den bereits untersuchten Anwendungen zählen die *in-situ* Hybridisierung von DNS auf der Oberfläche [64], die Untersuchung von Lipidvesikeln [102], Wechselwirkungen von Peptiden [124], Enzymen [76] und Antikörpern [27], sowie Experimente zur Kombination von molekular geprägten Polymeren (MIPs) mit einem piezoelektrischen Sensor [47, 48]. Aufgrund der Natur des piezoelektrischen Effekts sind vor allem zwei Eigenschaften des Analyten für eine empfindliche Detektion wichtig – hohe Molekülmasse und hohe Affinität zum Bindungspartner auf dem Sensor.

Neben der quantitativen Analytik sind piezoelektrische Sensoren auch zur Beschreibung von Bindungsreaktionen geeignet. Auf dem Gebiet der Bestimmung kinetischer Konstanten von Affinitätsinteraktionen haben sich QCM-Sensoren mittlerweile zu einer Alternative zu den etablierten Biacore[®]-Geräten entwickelt [104].

1.3.3. Amperometrische Sensoren

Elektrochemische Sensoren haben eine lange Tradition in der Biosensorik. Sie bieten gegenüber optischen Detektionsmethoden den Vorteil, dass man sie auch in trüben oder farbigen Proben einsetzen kann. Zudem ist es durch geschickte Wahl des Redoxpotentials möglich, störende Nebenreaktion nahezu vollständig auszuschließen. Der Vorreiter aller elektrochemi-

schen Sensoren in der Bioanalytik ist die Sauerstoff-Elektrode von Leland C. Clark [32]. Sie ermöglichte die direkte Bestimmung der Sauerstoff-Konzentration im Patientenblut. Auch heute noch basieren viele amperometrische Biosensoren auf dem Nachweis der Zu- oder Abnahme der Sauerstoff-Konzentration [199]. Auch wenn die eigentlich zu untersuchende Nachweisreaktion eines Analyten nicht Sauerstoff-abhängig ist, kann sie durch Nachschaltung einer Zweitreaktion, zum Beispiel mit Glucoseoxidase, mit einer Clark-Elektrode gemessen werden [80].

Auf dem Gebiet der Detektion von Anticholinesterasen sind amperometrische Sensoren neben den klassischen Techniken wie GC-MS [36] am weitesten verbreitet. Dabei basieren einige Systeme basieren auf dem direkten Umsatz von Organophosphaten durch die Organophosphatase [133]. Die meisten Biosensoren für Cholinesterase-Inhibitoren nutzen die Abnahme der Cholinesterase-Aktivität als Indikator für die Inhibitor-Konzentration. Dabei wird entweder ein Acylthiocholin als Substrat eingesetzt und das entstehende Thiocholin elektrochemisch oxidiert [71] oder das natürliche Acylcholin verwendet. Im zweiten Fall wird das gebildete Cholin durch die Cholinoxidase zum Betain bei gleichzeitiger Produktion von Wasserstoffperoxid oxidiert [130]. Einen anderen Weg geht die Arbeit von Makower u. a. [119]. Hier wurde Meerrettich-Peroxidase kovalent an Butyrylcholinesterase gekoppelt. Nach Inkubation mit dem Organophosphat DFP wurde das Bienenzymkonjugat über eine mit einem Paraoxon-Derivat modifizierte Affinitätschromatographiesäule geleitet. So konnte der nicht-inhibierte Teil des Konjugats an die Säule binden und die nicht-bindende, inhibierte Fraktion über die POD-Aktivität nachgewiesen werden.

In der aktuellen Entwicklung amperometrischer, Cholinesterase-basierter Biosensoren sind drei Richtungen abzusehen: die Verwendung von Cholinesterasen unterschiedlicher Spezies, die Variation der Immobilisierungsmethode der ChE und die Parallelisierung mehrerer Erkennungselemente durch Biochips.

In der Literatur dominieren die AChE des Zitteraals (*Electrophorus electricus*) und die humane Butyrylcholinesterase die Liste der verwendeten Cholinesterasen [75, 167, 170]. Daneben hat die AChE der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) in den letzten Jahren für die Anwendung in Biosensoren an Bedeutung gewonnen [60, 67]. Von diesem Enzym wurden zahlreichen Mutanten erzeugt, um durch den Austausch einzelner oder mehrerer Aminosäuren eine Steigerung der Empfindlichkeit für bestimmte Inhibitoren zu erreichen [21, 165, 197]. Daneben wurden auch die AChE des Nematoden *Nippostrongylus brasiliensis* [87, 198] und des Gelben Bungar (*Bungarus fasciatus*) [34, 201] auf ihre Eignung für die Biosensorik untersucht.

Bei den Immobilisierungsmethoden wurde lange Zeit die Vernetzung mit Glutaraldehyd bevor-

zugt [107, 168]. Neuere Arbeiten nutzen die Einbettung der Cholinesterase in Polymeren. So berichten Andreescu u. a. [5] über einen AChE-Sensor auf Basis eines Sol-Gel-Einschlusses in Polyvinylalkohol. Eine weitere Möglichkeit ist Immobilisierung der AChE durch die Elektropolymerisation von Anilinderivaten [171]. Wird hingegen keine Edelmetallelektrode verwendet, so haben sich nano-strukturierter Kohlenstoff [173] und epoxy-modifiziertes Graphit [1] als gute Alternativen für die Herstellung von AChE-Sensoren erwiesen.

Auf dem Gebiet der Nukleinsäureanalytik ist die parallele Messung mehrerer Analyten mit Hilfe von Biochips eine bereits etablierte Methode. Dabei wird üblicherweise die Fluoreszenz speziell markierter Oligonukleotide detektiert [175]. Im letzten Jahr stellten Ghindilis u. a. [66] mit dem ElectraSense™ ein Gerät zur elektrochemischen Detektion der DNS-Hybridisierung auf Microarrays vor. Ein AChE-basierter Biochip wurde in den Arbeiten von Bachmann u. a. [10, 11] vorgestellt. Hier wurden Acetylcholinesterasen verschiedener Organismen und Mutanten der *Drosophila* AChE in Dickschichtelektroden auf Biochips immobilisiert. Die parallele Messung der unterschiedlich stark ausgeprägten Hemmung der verschiedenen Enzyme bildete den Trainingsdatensatz für die Konstruktion eines künstlichen neuronalen Netzwerks. Dieses ermöglichte die Bestimmung der Konzentration von binären Inhibitorgemischen.

2. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines bifunktionellen Biosensors nach dem Vorbild eines Baukastensystems. Dies soll durch die Kombination verschiedenster molekularer Erkennungselemente erreicht werden. Als Transducer werden Quarzplättchen mit Goldelektroden eingesetzt. Die Verwendung solcher Sensoren mit einem EQCM-Geräts (*electrochemical quartz crystal microbalance*) ermöglicht es, zwei Messsignale gleichzeitig aufzunehmen:

1. die piezoelektrische Bestimmung einer Massenbeladung
2. die amperometrische Detektion von Enzymaktivität auf der Sensoroberfläche

Das Schema des geplanten Sensorsystems ist in Abbildung 2.1 gezeigt. Die Oberfläche der Piezokristalle wird mit Propidium – einem reversiblen Acetylcholinesterase-Inhibitor – modifiziert, um die Bindung der AChE über die periphere anionische Bindungsstelle und damit die Beladung des Sensors mit derselben zu ermöglichen. Ein weiteres Erkennungselement wird durch die chemische Kopplung eines Haptens an die Cholinesterase eingeführt. Damit wird die Bindung eines Antikörpers oder eines weiteren Enzyms mit entsprechender Bindungsstelle ermöglicht. Für die Analytik stehen somit zwei verschiedene Assayvarianten zu Verfügung: die Bestimmung der Inhibition der AChE-Aktivität und ein Bindungstest über das Hapten.

Für den Bindungstest wird ein Antikörper benötigt, der gegen das Hapten gerichtet ist und somit an das immobilisierte Hapten-Cholinesterase-Konjugat binden kann. Durch Vorinkubation mit freiem Hapten wird ein Teil der Antikörper in ihrer Bindungsfähigkeit zum Sensor (das heißt der haptensierten Acetylcholinesterase) eingeschränkt. Das soll die Durchführung eines kompetitiven Immunoassays im Fließsystem mit piezoelektrischer Detektion ermöglichen. Dieser Teil der Arbeit erfordert zunächst die Wahl eines geeigneten Antigen-Antikörper-Paares. Als Modellanalyt wird zunächst 2,4-Dichlor-phenoxyessigsäure favorisiert. Dieses Herbizid und die entsprechenden Antikörper sind bereits gut in der Literatur beschrieben. Außerdem bietet 2,4-D den Vorteil, dass es nicht mit der Cholinesterase wechselwirkt. Zur Verstärkung des Massesignals der Antikörperbindung sollen auch Nanopartikel eingesetzt werden. Als Alternative zu 2,4-D wird ebenso Kokain als Hapten in Betracht gezogen. Für diesen Analyt sind ebenfalls Antikörper mit hoher Bindungsaffinität bekannt. Es sollen weitere

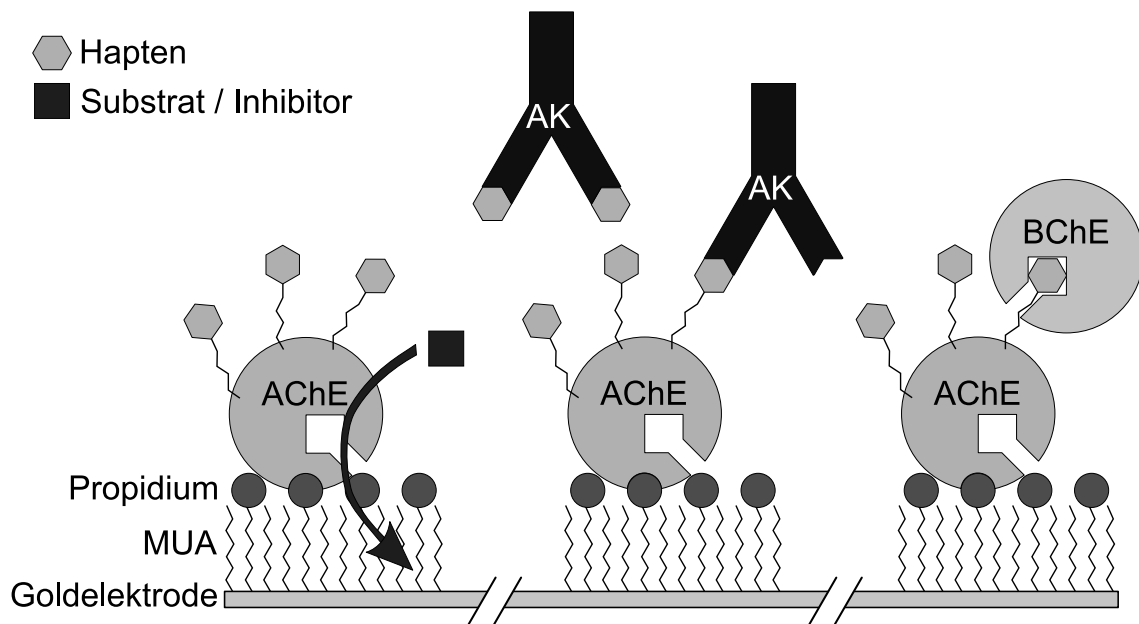


Abbildung 2.1.: Schematische Darstellung der Sensorarchitektur: haptensierte Cholinesterase gebunden über Propidium-Alkanthiol-SAM an der Goldelektrode; beide Cholinesterasen sind der Übersichtlichkeit halber als Monomere dargestellt; Links. . . Aktivitätsmessung bzw. Inhibition der immobilisierten AChE; Mitte. . . Bindung freier Antikörper an das Hapten-Enzym-Konjugat; Rechts. . . Bindung von Butyrylcholinesterase im Falle von Kokain als Hapten.

Möglichkeiten untersucht werden, dieses (Baukasten)-System von Erkennungselementen (d.h. Propidium und Hapten) zu erweitern. So ist Kokain auch ein Substrat und Inhibitor der Butyrylcholinesterase. Die Verwendung von Kokain als an die Acetylcholinesterase gekoppeltes Hapten eröffnet somit die Möglichkeit, an Stelle des Antikörpers ein weiteres Enzym – Butyrylcholinesterase – an das immobilisierte Konjugat zu binden.

Für die Kopplung von Antigen und Cholinesterase soll eine geeignete Synthesestrategie festgelegt und optimiert werden. Besonderes Augenmerk wird auf den Erhalt der Enzymaktivität im Verlauf der chemischen Modifizierung gelegt, um optimale Voraussetzungen für die Aktivitätsmessungen der Cholinesterase zu schaffen.

Im zweiten Teil der Arbeit liegt der Schwerpunkt auf der Aktivitätsmessung der reversibel immobilisierten Acetylcholinesterase. Im Fließsystem soll die Hemmung der Acetylcholinesterase mit Hilfe geeigneter Inhibitoren untersucht werden. Als Modell-Organophosphat kommt zunächst Diisopropylfluorophosphat zum Einsatz. In weiterführenden Experimenten sollen auch potentere Organophosphate, u. a. nach vorheriger Überführung der Thioverbindungen in die entsprechenden Oxo-Formen, verwendet werden. Die Hemmwirkung wird dabei aus

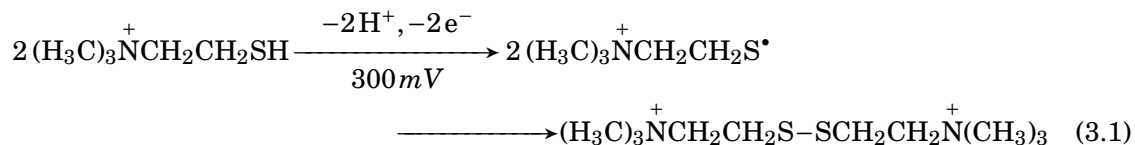
den Differenzen von Aktivitätsmessungen vor und nach einer Injektion des Inhibitors ins Fließsystem bestimmt.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Elektrochemische AChE-Aktivitätsmessung

3.1.1. Optimierung der amperometrischen Aktivitätsbestimmung

Thiocholinester eignen sich nicht nur für die optische Bestimmung der Cholinesteraseaktivität nach Ellman u. a. [53], sondern auch für chronoamperometrische Messungen. Das bei der Hydrolyse durch die Cholinesterase gebildete Thiocholin (siehe Abb. 5.1 auf S. 76) kann an der Arbeitselektrode bei positivem Potential (gegen Ag/AgCl) oxidiert werden. Dabei geht man davon aus, dass das Produkt der Ein-Elektronen-Oxidation zum Disulfid dimerisiert [71].



Bei den EQCM-Messungen, das heißt bei der simultanen Aufnahme von amperometrischen und piezoelektrischen Signalen, fällt auf, dass die Thiocholinoxidation immer auch mit einem Frequenzanstieg einhergeht. Abbildung 3.1 zeigt eine Beispielmessung für die Aktivitätsbestimmung von BZE-AChE auf dem Propidium-modifizierten Sensor. Erst nach dem Einschalten der Arbeitselektrode bei $t = 900$ s kann ein Oxidationsstrom gemessen werden, obwohl die Umsetzung durch die AChE schon 1 min davor beginnt. Gleichzeitig kann eine im Vergleich zur Ligandenbindung starke Frequenzzunahme beobachtet werden. Nach der Sauerbrey-Gleichung (siehe S. 14) ist dies gleichbedeutend mit einer Massenabnahme. Viskositäts- und Dichteänderung des Fließmediums können als Ursachen ausgeschlossen werden, da nach dem Umschalten auf Puffer die gemessene Frequenz bis zur erneuten Acetylthiocholin-Injektion konstant bleibt.

Die Ursachen für den Frequenzanstieg bzw. Masseverlust können verschieden sein. So ist es möglich, dass sich Gold direkt von der Elektrode durch die Oxidation ablöst. Dabei spielt vor allem die zwischen Goldelektrode und dem Quarz aufgebrauchte Adhäsionsschicht eine Rolle.

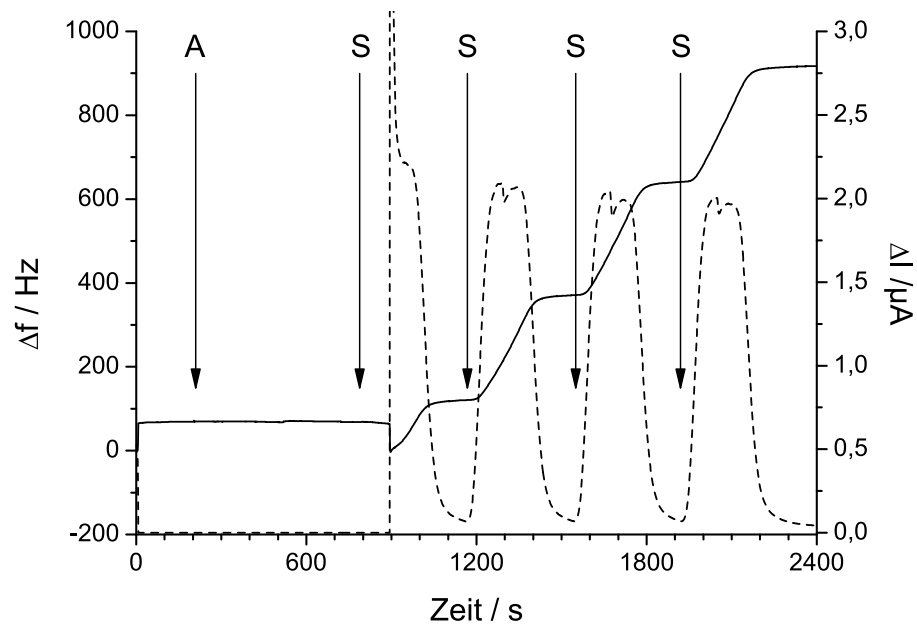


Abbildung 3.1.: Beispielmessung für die Thiocholinoxidation, 300 mV vs. Ag/AgCl (Frequenzdifferenz: durchgezogen, Stromsignal: gestrichelt), Einschalten der Arbeitselektrode während der ersten ATC-Injektion; A: Injektion der BZE-AChE, S: Injektion des Substrats 0,3 mM ATC gefolgt von Pufferinjektion nach Erreichen des Plateaus

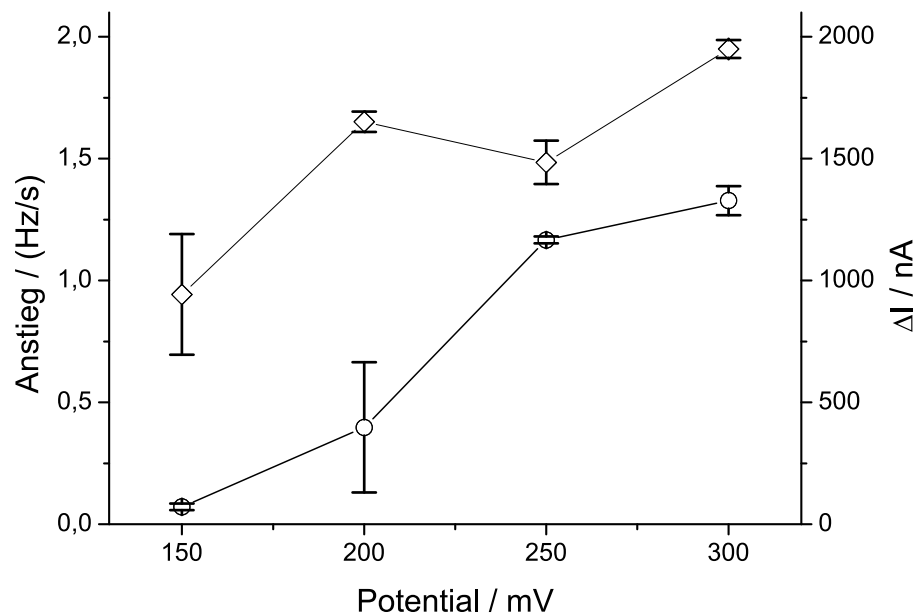


Abbildung 3.2.: Vergleich des Anstiegs des Massesignals (o) und des Peakstroms (◇) in Abhängigkeit vom angelegten Potential zur Thiocholinoxidation (Messungen gegen Ag/AgCl, n = 3 – 6)

Hoogvliet und van Bennekom [85] untersuchten das Verhalten von QCM-Sensoren mit Chrom- und Titanzwischen-schicht bei wiederholten zykl voltametrischen Scans in Perchlorsäure bzw. Phosphatpuffer. In allen Fällen kommt es zu einem Masseverlust und einer Zunahme der Oberflächenrauigkeit. Dabei erwiesen sich die Kristalle mit Titanadhäsionsschicht als deutlich stabiler als die Chromvariante. Außerdem war, wie erwartet, der Masseverlusteffekt deutlich stärker ausgeprägt bei der Messung in Perchlorsäure als in Phosphatpuffer. Die direkte Oxidation des Goldsubstrats unter Langmuir-Blodgett-Filmen wurde jedoch erst durch Beschuss mit ionisiertem Argon erreicht [206]. Wittmaack u. a. konnten in der anschließenden massenspektrometrischen Analyse Au^+ nachweisen.

Eine weitere Möglichkeit für den beobachteten Masseverlust wäre die Ablösung von Molekülen aus der modifizierten Monoschicht via Verdrängung durch Thiocholin oder Dimerisierung mit dem oxidierten Thiocholin. In jedem Fall wird die Oberflächencharakteristik drastisch verändert. So ist bei der Arbeit mit 300 mV vs. Ag/AgCl die Stabilität der Propidium-modifizierten Sensoren mit 20 – 30 Messungen pro Sensorseite [77] deutlich geringer als im reinen QCM-Betriebsmodus mit 40 – 50 Messungen [185]. Allerdings haben Arbeiten zur Desorption und dem Austausch von Alkanthiolen [12, 88] gezeigt, dass diese Phänomene durch die Reduktion der chemisorbierten Thioverbindung zum Thiolat erst bei negativem Potential ($-0,6$ V bis $-1,2$ V vs. Ag/AgCl) verursacht werden.

Der hier bei 300 mV vs. Ag/AgCl beobachtete Massenverlust ist daher auf eine Reaktion des QCM-Sensor auf das enzymatisch gebildete Thiocholin zurückzuführen. Geddes u. a. [65] beschreiben die Modifikation von piezoelektrischen Sensoren mit 12-Mercaptododecanol durch Chemisorption. Anstatt der erwarteten Massenzunahme von 53 ± 8 ng konnten sie eine Abnahme um 100 ng messen. Vergleichsuntersuchungen mittels Kontaktwinkelmessung und FTIR zeigten jedoch die Ausbildung eines Alkanthiolfilms auf der Goldoberfläche. Als mögliche Ursachen geben die Autoren die Ablösung von Gold von der Oberfläche durch die Thiollösung bzw. das Entfernen von organischen Oberflächenkontaminationen an.

Zur Optimierung der Messsignale und der Haltbarkeit der Sensoren wurden unterschiedliche Oxidationspotentiale im Bereich von 150 mV bis 300 mV getestet. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 3.2 dargestellt. Deutlich erkennbar ist eine Korrelation zwischen steigendem Oxidationspotential und zunehmendem Anstieg des Massesignals. Dagegen verändert sich der gemessene Peakstrom nach einer Erhöhung durch den Wechsel des angelegten Potentials von 150 mV auf 200 mV nur noch sehr wenig bei weiterer Steigerung des Potentials bis 300 mV.

In Hinblick auf die Stabilität der Sensoroberfläche und eine empfindliche Detektion der AChE-Aktivität wurde 200 mV als Arbeitspotential für die folgenden Inhibitionsstudien

Tabelle 3.1.: Vergleich der verwendeten Oxidationspotentiale (gegen Ag/AgCl) zur amperometrischen Bestimmung der AChE-Aktivität mit verwendetem Elektrodentyp und Mediator

PVA-SbQ: Poly(vinylalkohol)-Backbone-basiertes 4-[4-(1,3-Dioxanzyl)styryl]-1-methyl-pyridinium-methosulfat, PDDA: Poly(diallyldimethylammonium)chlorid, CNT: Kohlenstoffnanoröhren, TCNQ: 7,7',8,8'-Tetracyanochinodimethan

Potential in mV	Typ	Mediator	Referenz
700	Graphitpaste	—	Albareda-Sirvent u. a. [1]
610	Graphitpaste	—	Evtugyn u. a. [56]
600	Platin	—	Günther und Bilitewski [68]
410	Platin	PVA-SbQ	Jeanty u. a. [92]
410	Graphitpaste	TCNQ	Del Carlo u. a. [43]
370	Platin	Cobalt-Phthalocyanin	Nunes u. a. [138]
350	Platin	—	Sapelnikova u. a. [157]
300	SAM-Gold	—	Halamek u. a. [75]
200	Graphitpaste	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{FeCl}_3$	Arduini u. a. [7]
200	SAM-Gold	—	diese Arbeit
150	Glaskohlenstoff	PDDA, CNTs	Liu und Lin [113]
100	Graphitpaste	PVA-SbQ	Devic u. a. [44]
100	Graphitpaste	TCNQ	Bachmann u. a. [10]
100	Graphitpaste	Cobalt-Phthalocyanin	Hart und Hartley [79]

eingesetzt. Ein Vergleich mit der Literatur über Cholinesterase-Biosensoren, die ebenfalls die Thiocholinoxidation zur Detektion einsetzen, zeigt, dass die angewendeten Potentiale über einen weiten Bereich – von 100 mV bis 700 mV – variieren. Tabelle 3.1 stellt außerdem die Unterschiede in den verwendeten Elektroden und Mediatoren dar. Der Großteil der AChE-Biosensoren sind mit Graphitpaste gedruckte Dickschichtelektroden (*screen-printed electrodes*). Die zweite, große Gruppe sind Platindraht- und Platindickschichtelektroden. In beiden Fällen wird deutlich, dass erst die Verwendung von Mediatoren die Arbeit bei niedrigen Redoxpotentialen ermöglicht. Allerdings zeigt sich auch hier, dass Unterschiede im Sensor-/Elektrodenaufbau zu unterschiedlichen Arbeitspotentialen führen können (siehe Bachmann u. a. [10] und Del Carlo u. a. [43]). Die Arbeit von Liu und Lin [113] fällt etwas aus dem vorher genannten Schema heraus, in dem die Autoren versuchen mehrere moderne Ansätze zur Elektrodenmodifikation – Kohlenstoffnanoröhren und *layer-by-layer*-Aufbauten mit Polyelektrolyten – zu kombinieren.

Die hier vorgestellte Variante zur Bestimmung der AChE-Aktivität ist eine Weiterentwicklung der Arbeit von Halamek u. a. [75], die auf dem von Teller u. a. [186] vorgestellten Propidium-modifizierten QCM-Sensor basiert.

Eine Alternative, um das Problem der Oberflächenbeeinträchtigung durch die Thiocholinoxidation zu umgehen, ist die Kopplung mit Cholinoxidase wie von Mitchell [130] und Tamiya u. a. [180] beschrieben. Dabei wird direkt das natürliche Substrat – Acetylcholin – eingesetzt. In einer nachgeschalteten Reaktion wird Cholin zum Betain oxidiert unter gleichzeitiger Bildung von Wasserstoffperoxid, das dann elektrochemisch detektiert wird.

3.1.2. Inhibition mit Diisopropylfluorophosphat

Als Modellorganophosphat für Inhibition der modifizierten AChE wurde zunächst Diisopropylfluorophosphat (DFP) gewählt. Diese Substanz wird häufig zur Charakterisierung von Cholinesterasen und als Modellanalyt für ChE-Biosensoren eingesetzt [16, 49, 74, 115, 119]. Nachdem nachgewiesen war, dass sowohl aktive als auch DFP-inhibierte AChE mit vergleichbarer Affinität an Propidium-modifizierte Sensoren binden [185, 186], waren die ersten Studien zur Bestimmung der AChE-Hemmung mit diesem System auf Vorinkubation der AChE mit dem Organophosphat beschränkt [75]. Auch bei der Verwendung von D,L-Carnitin als AChE-Ligand für die EQCM-Sensormodifikation wurde die AChE mit DFP vor der Injektion ins Fließsystem vorinkubiert [209]. In dieser Arbeit wurde nun die Inkubation direkt in der Durchflußzelle durchgeführt. Dazu wurde zunächst modifizierte Acetylcholinesterase auf dem Sensor gebunden und die Ausgangsaktivität des immobilisierten Enzyms bestimmt. Dann wurde DFP in den Pufferstrom gegeben und nach dem Wechsel zum Phosphatpuffer die verbliebene AChE-Aktivität gemessen. In Anlehnung an Zhang u. a. [210] wurde der Restanteil aktiven Enzyms aus der relativen Peakhöhe des Oxidationsstroms der partiell inhibierten AChE im Vergleich zur Ausgangsaktivität errechnet.

$$\frac{[E]}{[E_0]} = \frac{\Delta I_{nach\ Inh.}}{\Delta I_{vor\ Inh.}} \quad (3.2)$$

Abbildung 3.3 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition der EeAChE durch DFP. Dabei fällt die recht geringe Empfindlichkeit der DFP-Inhibition auf. Der dynamische, quasi-lineare Bereich für eine Konzentrationsbestimmung aufgrund der Hemmung der EeAChE liegt im Bereich von 10^{-4} M bis 10^{-6} M. Das ist für eine umweltanalytische Anwendung nicht ausreichend, deckt sich aber mit Ergebnissen aus der Literatur. Rogers u. a. [152] koppelten Biotin an EeAChE zur Immobilisierung derselben auf biotinylierter Nitrocellulose über Streptavidin. Mit diesem System wurde nach 10 minütiger Inkubation für DFP ein IC_{50} von $4,2 \mu\text{M}$ bestimmt. Außerdem fällt auf, dass auch in den niedrigen Verdünnungen die AChE-Aktivität „scheinbar“ abnimmt. Das könnte man auf die Verdünnung des Inhibitors mit deionisiertem Wasser zurückführen. Dieses hat einen leicht sauren pH-Wert und kann deshalb ebenfalls die Cholinesterase hemmen [163]. Als weitere Möglichkeit kommt auch

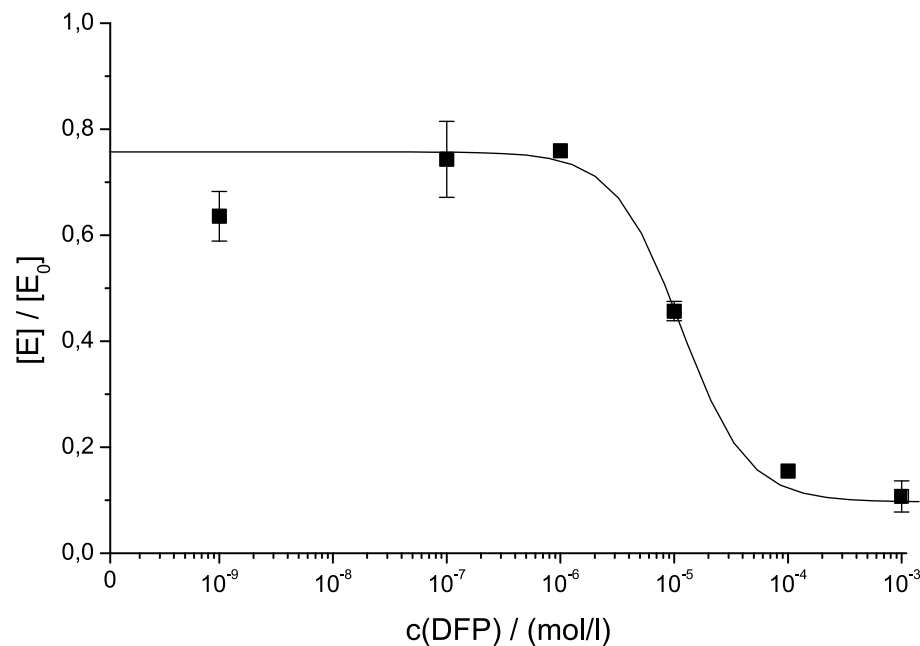


Abbildung 3.3.: Inhibition der BZE-AChE mit DFP im Fließsystem, $[E]/[E_0]$. . . relative Enzymaktivität; $IC_{50} = 1,15 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

eine erhöhte Dissoziation der AChE vom Propidium durch den niedrigeren pH-Wert in Betracht. Eine Ursache für die geringe Empfindlichkeit für DFP könnte in einer zu langsamen Inhibitionskinetik für die Phosphorylierung des AChE-Serins durch DFP liegen.

3.1.3. Vergleich der Inhibitionskonstanten

Für die Empfindlichkeit eines Organophosphat-Nachweises ist auch die Kinetik der Reaktion mit dem Serin im aktiven Zentrum der Cholinesterase ausschlaggebend. Die Geschwindigkeitskonstanten für diese Reaktion wurden erstmals von Aldridge [2] theoretisch und experimentell untersucht. Für die Phosphorylierung des Enzyms E durch das Organophosphat PX (wobei X die Abgangsgruppe darstellt) gilt folgende, allgemeine Reaktionsgleichung:



Dieses Schema kann durch Einführung der bimolekularen Geschwindigkeitskonstante $k_i = k_2/K_D$ vereinfacht werden.



Der Geschwindigkeitsansatz hierfür lautet:

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_i[E][PX] \quad (3.5)$$

Dabei sind $[E]$ und $[PX]$ die Konzentrationen an freiem Enzym (AChE) bzw. Organophosphat. Die Ausgangskonzentrationen an Enzym und Organophosphat werden mit $[E_0]$ und $[PX_0]$ bezeichnet. Durch Normalisieren ($E = [E]/[E_0]$), Substituieren ($[PX] = [PX_0] - (1 + E)[E_0]$) und Umformen ergibt sich folgende Differentialgleichung (DGL).

$$\frac{dE}{dt} = k_i([E_0] - [PX_0])E - k_i[E_0]E^2 \quad (3.6)$$

Gleichung 3.6 ist eine DGL des Bernoulli-Typs ($\alpha = 2$) und läßt sich entsprechend lösen [174]. Die integrierte Geschwindigkeitsgleichung für die verbleibende Enzymaktivität nach der Zeit t ergibt sich zu:

$$\frac{[E]}{[E_0]} = \frac{([PX_0] - [E_0]) \cdot e^{-k_i t([PX_0] - [E_0])}}{[PX_0] - [E_0] \cdot e^{-k_i t([PX_0] - [E_0])}} \quad (3.7)$$

Die verbleibende Enzymaktivität bei genügend langer Inkubation ergibt sich wie folgt:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \frac{[E]}{[E_0]} = \frac{[E_0] - [PX_0]}{[E_0]} = 1 - \frac{[PX_0]}{[E_0]} \quad (3.8)$$

Aus Gleichung 3.7 wird deutlich, dass für den Spezialfall $[E_0] = [PX_0]$ kein sinnvoller Kurvenverlauf berechnet werden kann. Für Simulationen von Inhibitionskurven oder die nicht-lineare Regression von entsprechenden Messdaten sollten $[E_0]$ und $[PX_0]$ immer leicht verschieden gewählt werden. Wird dagegen mit hohen Überschüssen an Organophosphat gegenüber der eingesetzten Enzymmenge gearbeitet, so kann die Herleitung vereinfacht werden [117]. Wenn $[E_0] \ll [PX_0]$ und $[E_0] \geq [EP]$, so folgt daraus, dass $[PX_0] \gg [EP]$ und $[PX_0] = [PX] + [EP] \simeq [PX]$. Damit wird Gleichung 3.5 zu einer Geschwindigkeitsgleichung pseudo-erster Ordnung. Das Integrationsverfahren erleichtert sich erheblich und ergibt:

$$\frac{[E]}{[E_0]} = e^{-k_i[PX_0]t} \quad (3.9)$$

In Abbildung 3.4 sind die beiden Zeitabhängigkeiten der Inhibition (Gl. 3.7 und 3.9) exemplarisch dargestellt. Dort sind die Zeitkurven für die Hemmung der Cholinesterase durch unterschiedliche Konzentrationen eines fiktiven Organophosphats gezeigt. Man sieht, dass selbst ein vergleichsweise hoher k_i -Wert nicht unbedingt ausreicht, um den Endpunkt der Inhibition in einem testüblichen Zeitraum (< 1 h) zu erreichen, wenn die Konzentration des Organophosphats geringer als die der Cholinesterase ist. Wird dagegen mit einem Überschuß an Organophosphat gearbeitet (z. B. $[PX_0] \geq 10 \cdot [E_0]$), so wird der Endpunkt der irreversi-

Tabelle 3.2.: Inhibitionsgeschwindigkeitskonstanten k_i in $M^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$; Literaturwerte wurden gegebenenfalls umgerechnet; * = huAChE

Inhibitor	EeAChE	DmAChE	huBChE	Dm-Mutante
Chlorpyrifos-oxon	$2,85 \cdot 10^6$ [21]	$8,64 \cdot 10^8$ [30]	$2,00 \cdot 10^8$ [83]	$1,62 \cdot 10^9$ Y324A [21]
	$1,80 \cdot 10^6$ [83]	$8,40 \cdot 10^8$ [21]	$6,00 \cdot 10^6$ * [83]	
DFP	$9,84 \cdot 10^3$ [59]	$3,20 \cdot 10^7$ [30]	$1,70 \cdot 10^7$ [162]	
			$1,40 \cdot 10^5$ * [140]	
Dichlorvos	$1,90 \cdot 10^3$ [21]	$4,89 \cdot 10^5$ [30]	$2,30 \cdot 10^5$ [83]	$4,87 \cdot 10^8$ E69Y, Y71D [172]
	$< 10^3$ [197]	$1,80 \cdot 10^6$ [21]	$5,20 \cdot 10^4$ * [83]	$5,48 \cdot 10^8$ E69Y, Y71D [21]
	$2,60 \cdot 10^4$ [172]	$5,00 \cdot 10^5$ [197]		
Paraoxon	$2,90 \cdot 10^5$ [197]	$1,65 \cdot 10^6$ [30]	$9,70 \cdot 10^5$ * [162]	$1,89 \cdot 10^7$ E69Y, F330L [21]
	$2,87 \cdot 10^5$ [21]	$1,46 \cdot 10^6$ [21]	$1,20 \cdot 10^6$ * [83]	$3,20 \cdot 10^6$ Y408F [197]
	$2,90 \cdot 10^6$ [58]	$1,40 \cdot 10^6$ [197]	$1,10 \cdot 10^6$ * [150]	
	$1,15 \cdot 10^5$ [59]	$1,40 \cdot 10^7$ [58]	$1,50 \cdot 10^6$ [83]	
<i>iso</i> -OMPA		$8,34 \cdot 10^3$ [30]	$4,30 \cdot 10^3$ [3]	
			$7,65 \cdot 10^1$ * [140]	
Terbufos-oxon	$3,90 \cdot 10^6$ [61]	$3,00 \cdot 10^7$ [61]	$3,70 \cdot 10^6$ [61]	$3,30 \cdot 10^8$ W321L, Y324A [61]
VX	$2,54 \cdot 10^7$ [59]		$1,38 \cdot 10^8$ * [141]	

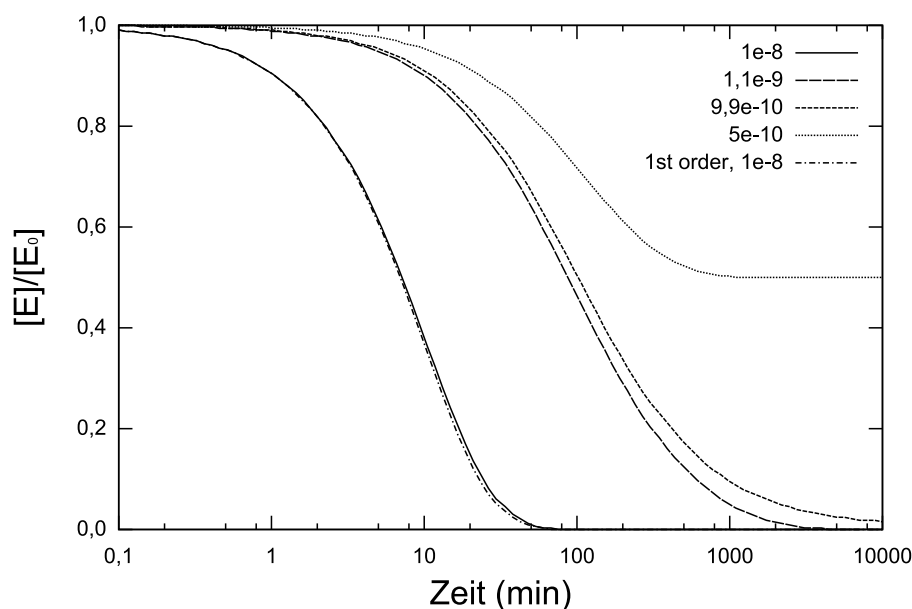


Abbildung 3.4.: Simulation der AChE-Inhibition nach Gleichung 3.7; $[E_0] = 1 \cdot 10^{-9}$ M, $k_i = 1 \cdot 10^7$ $M^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, $[PX_0]$ siehe Legende; für $[PX_0] = 1 \cdot 10^{-8}$ M ist ausserdem der Inhibitionsverlauf nach Gleichung 3.9 (1st order) dargestellt.

blen Inhibition deutlich schneller erreicht. Außerdem fällt auf, dass sich die Kurve für die vollständige Integration (Gl. 3.7) immer mehr den Werten annähert, die für das vereinfachte Modell (Gl. 3.9) erhalten werden.

Für zahlreiche Cholinesterasen wurden die Inhibitionsgeschwindigkeiten durch diverse Organophosphate untersucht. Tabelle 3.2 gibt einen Einblick in die publizierten Werte. Die meisten der neueren Publikationen nutzen dabei die Vorteile der nicht-linearen Regression und verwenden Gleichung 3.7. Dabei fällt auf, dass die berechneten Werte teils nur gering, teils um ein ganze Größenordnung (vgl. k_i -Wert für Paraoxon) schwanken. Für einige Inhibitoren, zum Beispiel VX, werden Geschwindigkeitskonstanten erreicht, die dem Wert für die Acetylierung des Serins während der Katalyse ($k > 3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ [181]) sehr nah kommen.

Aus den Daten in Tabelle 3.2 und der exemplarischen Simulation in Abbildung 3.4 kann man nun sehr leicht zu der Erkenntnis gelangen, dass für den empfindlichen Nachweis eines Organophosphats zwei Faktoren wichtig sind:

1. eine hohe Inhibitionsgeschwindigkeitskonstante k_i , um eine Phosphorylierung des Enzyms in kurzer Inkubationszeit zu sichern;
2. eine hohe spezifische Aktivität der Cholinesterase, um eine geringe Enzymmenge nutzen zu können.

Beim *enzyme engineering*, das heißt dem Austausch einzelner oder Gruppen von Aminosäuren, für bessere OP-Empfindlichkeiten lässt sich allerdings feststellen, dass eine höhere Sensitivität (d.h. ein höherer k_i -Wert) in der Regel mit einer Verminderung der spezifischen Aktivität der AChE einhergeht [139]. Werden diese Betrachtungen nun auf die AChE des Zitteraals übertragen, so findet man, dass diese zwar eine hohe spezifische Aktivität von ca. 1200 U/mg aufweist, aber der k_i -Wert für DFP mit $9,84 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ im Vergleich zu anderen Cholinesterasen relativ klein ist. Abbildung 3.5 verdeutlicht diesen Unterschied zwischen den Cholinesterasen bei der Inhibition durch DFP. Hier zeigt sich, dass bei der Reaktion einer DFP-Stoffmenge, die 90% der eingesetzten Enzymstoffmenge entspricht, im Falle der *Drosophila* AChE und der humanen BChE bereits nach 30 min bzw. 60 min (gerundet) ungefähr 50% der Enzymaktivität gehemmt sind. Bei der Verwendung von EeAChE dauert es nahezu zwei Monate bis (rein rechnerisch) der gleiche Zustand erreicht wird.

Deshalb sollte ein Organophosphat gewählt werden, das auch in Kombination mit der haptenisierten EeAChE einen konkurrenzfähigen Nachweis ermöglicht. Abbildung 3.6 zeigt die erwarteten Konzentrationsabhängigkeiten ausgewählter Organophosphate im Vergleich zum DFP. Dichlorvos und VX wurden für diesen Vergleich außer acht gelassen, da sie zu insensitiv

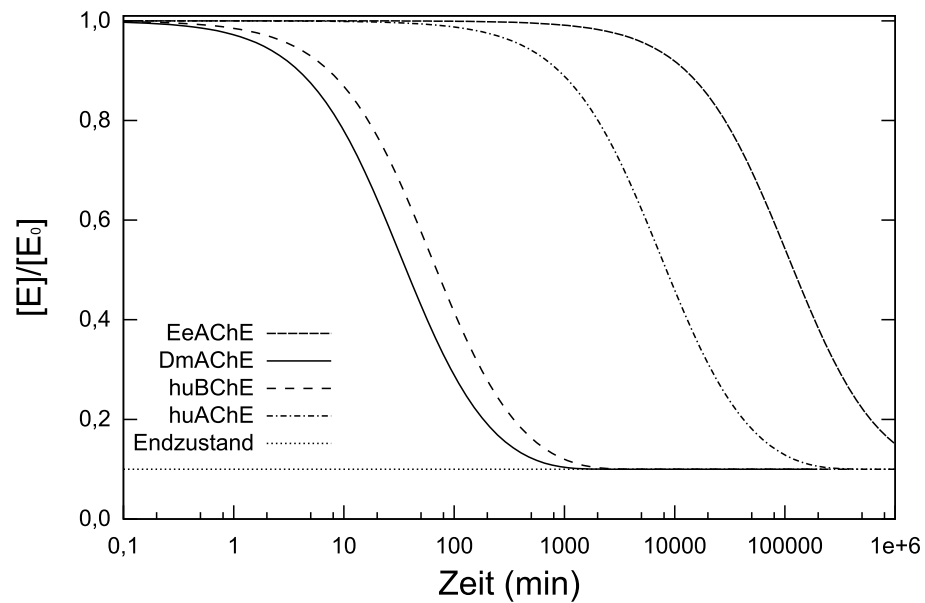


Abbildung 3.5.: Vergleich der Inhibitionskinetik von DFP für verschiedene Cholinesterasen; $[PX_0] = 9 \cdot 10^{-10}$ M, $[E_0] = 1 \cdot 10^{-9}$ M, k_i -Werte siehe Tabelle 3.2; die Zeitachse ist der Übersichtlichkeit halber logarithmisch gestaucht.

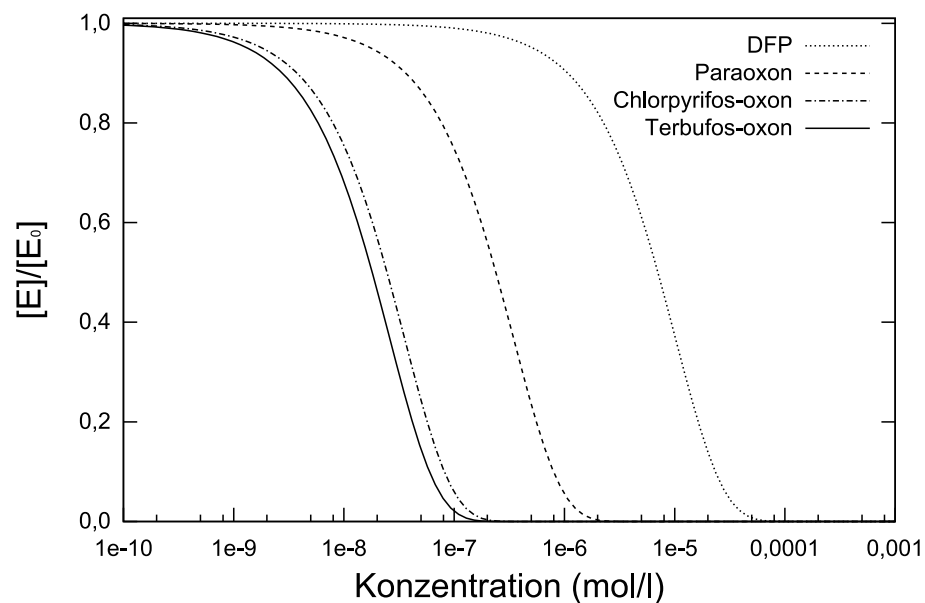


Abbildung 3.6.: Erwartete Inhibition der AChE des Zitteraals durch unterschiedliche Hemmstoffe nach 10 min Inkubation; Konzentrationabhängigkeit basierend auf k_i -Werten aus Tabelle 3.2, $[E_0] = 1 \cdot 10^{-9}$ M

(Dichlorvos) beziehungsweise im experimentellen Umgang zu aufwendig (VX) sind. Von den verbliebenen drei Organophosphaten ist Paraoxon bereits deutlich besser als DFP für einen OP-Nachweis geeignet. Terbufos-oxon und Chlorpyrifos-oxon sind nochmals empfindlicher und könnten im Vergleich zum DFP die untere Nachweisgrenze um zwei Zehnerpotenzen nach unten verschieben. Für die weiterführenden Inhibitionsexperimenten sollten daher diese beiden Organophosphate auf ihre Eignung geprüft werden.

Neben Vorhersagen über das Inhibitionsverhalten ausgewählter Cholinesterase-Organophosphat-Paarungen lässt sich das Modell von Aldridge [2] auch zur Validierung experimenteller Daten einsetzen. Davis u. a. [41] stellen in einem Übersichtsartikel mehrere „ultraempfindliche“ AChE-Biosensoren vor. In einigen Fällen sind die beschriebenen, extrem niedrigen Werte für die Nachweisgrenze (LOD) auf Rechenfehler zurückzuführen. So erreichen Bonnet u. a. [20] für die Detektion von Chlorpyrifos-oxon ein LOD von $1,5 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Dies entspricht einer Massenkonzentration von rund $5 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ (bei einer Molmasse von $334,52 \text{ g/mol}$) und nicht dem von den Autoren angegebenen Wert von $5 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$.

Der von Sotiropoulou und Chaniotakis [173] vorgestellte AChE-Biosensor basiert auf der Immobilisierung der EeAChE in einer porösen Kohlenstoffelektrode. Die Autoren gehen dabei von dem richtigen Ansatz aus, dass ein empfindlicher Nachweis nur erreicht wird, wenn möglichst wenig Enzym auf der Elektrode immobilisiert wird. Mit dieser Methode konnten sie Dichlorvos im Bereich von 10^{-6} M bis 10^{-12} M nachweisen. Der weite dynamische Messbereich über sechs Größenordnungen lässt jedoch einige Fragen über die Natur des Aktivitätsverlusts offen. Setzt man ein stöchiometrisches Bindungsverhältnis von 1 : 1 (Dichlorvos : AChE) voraus, so wäre eine Inhibition im Bereich von 100% bis 0,0001% zu erwarten. Dabei sollten bereits alle Werte unterhalb von 1% Inhibition aufgrund von zufälligen Fehlern nicht mehr von einander unterscheidbar sein und als 0% betrachtet werden. In einer zweiten Publikation [172] stellen Sotiropoulou u. a. eine Weiterentwicklung dieses Sensors vor. In diesem Fall wird *Drosophila* AChE genetisch optimiert, um einen möglichst hohen k_i -Wert für Dichlorvos zu erhalten (siehe Tabelle 3.2 auf Seite 30). Mit dieser Mutante erhalten sie einen dynamischen Inhibitionsbereich für Dichlorvos-Konzentrationen von 10^{-14} M bis 10^{-20} M . Als Nachweisgrenze – basierend auf 40% Inhibition – wird eine „nahezu“ attomolare Konzentration ($10^{-17} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) angegeben. Allerdings beträgt die maximale, bestimmte Inhibition nur 60%. Auch hier lassen sich ähnliche Überlegungen zur Breite des publizierten dynamischen Bereichs wie zuvor anstellen.

Ein weiterer Ansatz, um möglichst geringe Mengen an Cholinesterase zu immobilisieren, wurde von Pritchard u. a. [146] vorgestellt. Hier wurden zunächst Defekte in einem isolierenden Polymer auf der Elektrodenoberfläche mittels Ultraschall erzeugt. In diesen Defekten wurde AChE in einer elektropolymerisierbaren Matrix immobilisiert. Damit wurden aus

einer einzigen Elektrode viele Mikroelektroden mit einer jeweiligen Größe um 10 μm erzeugt. Mit diesem System wurde die Inhibition durch Paraoxon in einem Bereich von 10^{-8} M bis 10^{-17} M bestimmt. Eine Abbildung dieser Konzentrationsabhängigkeit wäre wünschenswert gewesen. Die exemplarischen chronoamperometrischen Kurven für eine Messung vor und nach Inkubation mit 10^{-17} M Paraoxon zeigen einen Abfall des Signals um 50%. In der Diskussion dieses Ergebnisses stellen die Autoren fest, dass diese Inhibition eine so geringe Enzymmenge voraussetzt, dass damit kein Stromsignal im Bereich von 1 μA messbar wäre. Da dies trotzdem der Fall ist, müsste in dem System eine Verstärkung um den Faktor $4,5 \cdot 10^7$ erfolgen. Die Natur dieses Verstärkungsfaktor sei jedoch unbekannt und erfordere weitere Untersuchungen des Systems.

3.1.4. Aktivierung der Phosphothionate

Da Phosphothionate an sich wenig wirksame Inhibitoren sind [123, 161], müssen sie erst in die entsprechenden Oxo-Formen überführt werden. Dies kann durch chemische oder enzymatische Behandlung erreicht werden. Bei den chemischen Methoden dominierte lange Zeit die Verwendung von Bromwasser und Hypochlorit [109, 191]. Daneben wurden auch H_2O_2 , Cerammoniumnitrat (CAN) und organische Peroxide zur Umwandlung der Thiophosphonate eingesetzt. Diese Verfahren haben allesamt den Nachteil, dass die Umwandlung in die entsprechende Oxo-Form selten mit hohen Ausbeuten abläuft und meist mit einem hydrolytischen Abbau des Organophosphats einhergeht [106]. Im Rahmen der Studie von Kralj u. a. hat sich die Oxidation mittels *N*-Bromsuccinimid (NBS) als die effektivste Methode herausgestellt. Sie ist auch nach DIN 38415-1 [136] die Methode der Wahl. Daneben werden Thiophosphonate auch durch Enzyme – im wesentlichen Monoxygenasen – in die Oxo-Formen überführt. In der Tat beruht die insektizide Wirkung vieler Organophosphate, wie zum Beispiel Malathion, auf ihrer enzymatischen Aktivierung zum Oxon nach der Aufnahme durch das Insekt [81]. Chambers u. a. [29] und Nigg und Knaak [135] beschreiben Lebermikrosomen als hauptsächliche Katalysatoren für diese Umwandlung bei Vertebraten. So wie die (Acetyl)cholinesterasen ein sehr ausgewähltes Inhibitorspektrum haben, werden auch die Thiophosphonate durch die verschiedenen Cytochrome der P450-Familie unterschiedlich gut umgesetzt. Schulze u. a. [161] untersuchten genetisch modifiziertes Cytochrom P450 BM-3. Dabei konnte gezeigt werden, dass erst die geschaffenen Mutanten Substrate wie Parathion und Chlorpyrifos umsetzen konnten, während der Wildtyp kaum eine Desulfurierungsaktivität zeigte.

In dieser Arbeit wurde NBS für die Aktivierung von Chlorpyrifos und Terbufos gewählt. Nach der Desulfurierung zum Oxon wurden die Organophosphate in Mikrotiterplatten getestet.

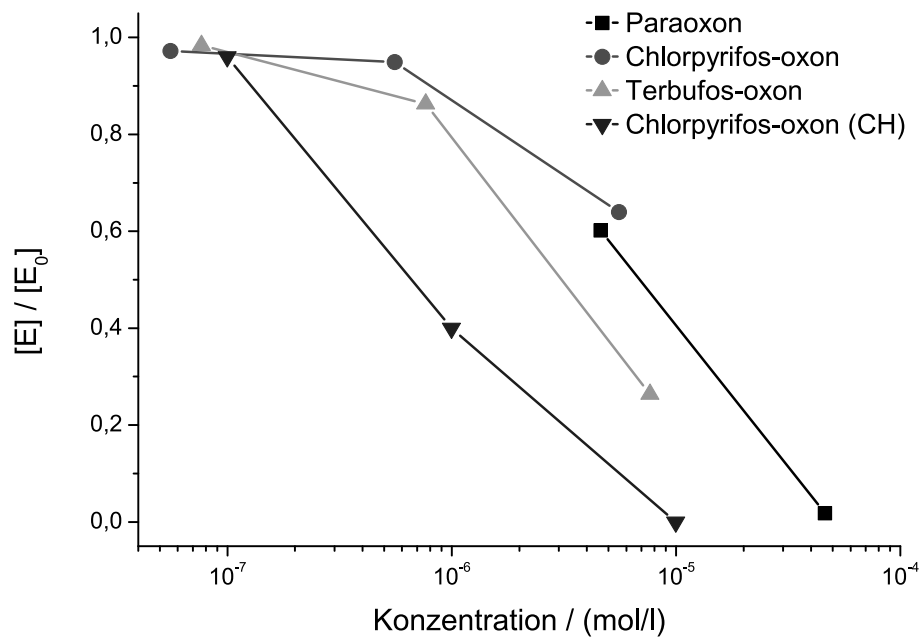


Abbildung 3.7.: Inhibition durch unterschiedliche Hemmstoffe nach 10 min Inkubation in der Mikrotiterplatte; Paraoxon und Chlorpyrifos-oxon (CH) wurden ohne weitere NBS-Behandlung verwendet.

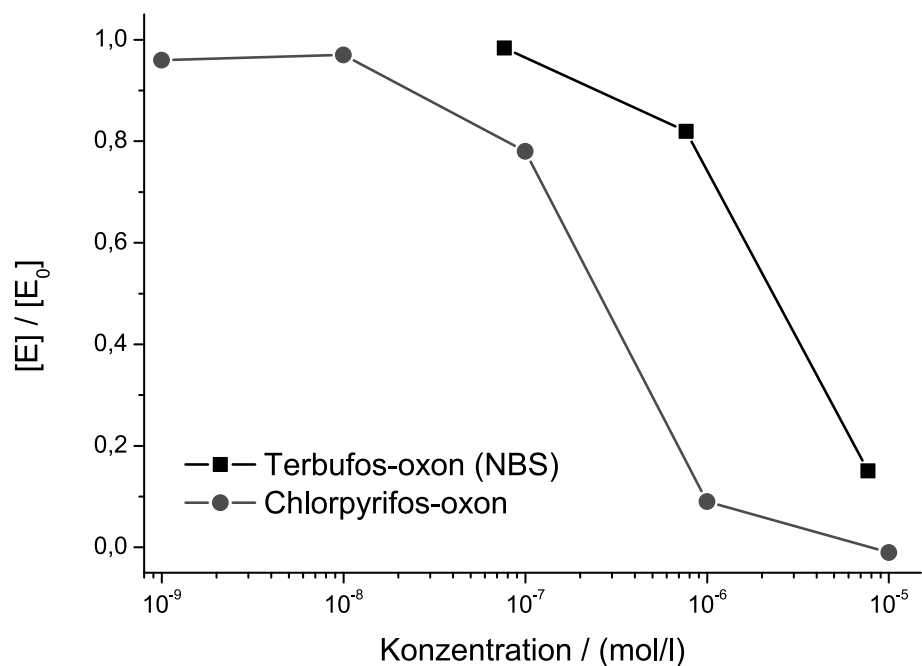


Abbildung 3.8.: Vergleich von Chlorpyrifos-oxon (aus Cyclohexan) und Terbufos-oxon (nach Aktivierung durch NBS); verbliebene AChE-Aktivität nach 30 min Inkubation mit dem Organophosphat

Abbildung 3.7 zeigt die Inhibition nach 10 minütiger Inkubation der EeAChE. Als Vergleich wurden Paraoxon und Chlorpyrifos-oxon (CH) ohne Behandlung mit NBS mitgeführt. Letzterer Inhibitor lag bereits als Oxon in Cyclohexan gelöst vor. Da Cyclohexan nicht mit Wasser bzw. Puffer gemischt werden kann, wurden Aliquote des Oxons am Rotationsverdampfer eingengt. Paraoxon schnitt als Inhibitor mit der geringsten Empfindlichkeit nach 10 min Inkubation ab. Danach folgten Chlorpyrifos-oxon und Terbufos-oxon. Beide Organophosphate konnten durch die Behandlung mit NBS desulfuriert werden. Allerdings zeigte sich auch ein deutlicher Unterschied zwischen dem NBS-aktivierten und dem aus Cyclohexan eingengten Chlorpyrifos-oxon. Das könnte zwei Ursachen haben. Zum einen ist es denkbar, dass die Umwandlung in die Oxo-Form nur unvollständig abgelaufen ist, obwohl mit einem 12-fachen molaren Überschuß an NBS gearbeitet wurde. Zum anderen ist es auch möglich, dass diese Behandlung bereits zu einer teilweisen Zersetzung der Thio- und Oxo-Form führen kann.

Bei längerer Inkubationszeit des Inhibitors mit der Acetylcholinesterase zeigt sich dieser Unterschied noch deutlicher. Abbildung 3.8 stellt die Konzentrationsabhängigkeiten für Terbufos-oxon (nach NBS-Aktivierung) und Chlorpyrifos-oxon (aus Cyclohexan) dar. Die Inhibitionskurven zeigen, dass die Inhibition mit CPO um den Faktor 10 empfindlicher als mit TBO ist. Auf Grundlage der Inhibitionsgeschwindigkeitskonstanten (siehe Tabelle 3.2 auf S. 30) wäre eher eine Überlagerung beider Inhibitionskurven zu erwarten gewesen. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass die Behandlung mit NBS nicht zu vollständigem Umsatz bzw. auch zu einer Zersetzung von Produkt und Ausgangsstoff führt. Welcher der beiden Effekte den größeren Einfluß hat, konnte jedoch nicht geklärt werden. Die besten Ergebnisse wurden mit Chlorpyrifos-oxon aus Cyclohexan erzielt. Daher wurde diese Inhibitorpräparation für die folgenden Hemmstudien mit der modifizierten Acetylcholinesterase verwendet.

3.1.5. Inhibition mit Chlorpyrifos-oxon

Ausgehend von den theoretischen und praktischen Voruntersuchungen zur Inhibitionsfähigkeit der verschiedenen Organophosphate, wurde die Inhibition der auf dem Propidium-modifizierten Sensor gebundenen BZE-AChE mit Chlorpyrifos-oxon aus Cyclohexan durchgeführt. Wie auf Seite 27 ff. beschrieben, wurde die Aktivität der adsorbierten BZE-AChE über die enzymatische Hydrolyse von Acetylthiocholin und die nachgeschaltete Oxidation des entstandenen Thiocholins an der Arbeitselektrode bestimmt. Der Anteil aktiver BZE-AChE wird aus dem Verhältnis des Oxidationsstroms vor und nach der Chlorpyrifos-oxon-Injektion berechnet. Abbildung 3.9 zeigt die Abhängigkeit der AChE-Restaktivität von der eingesetzten CPO-Konzentration. Der dynamische, quasi-lineare Bereich liegt ungefähr zwischen

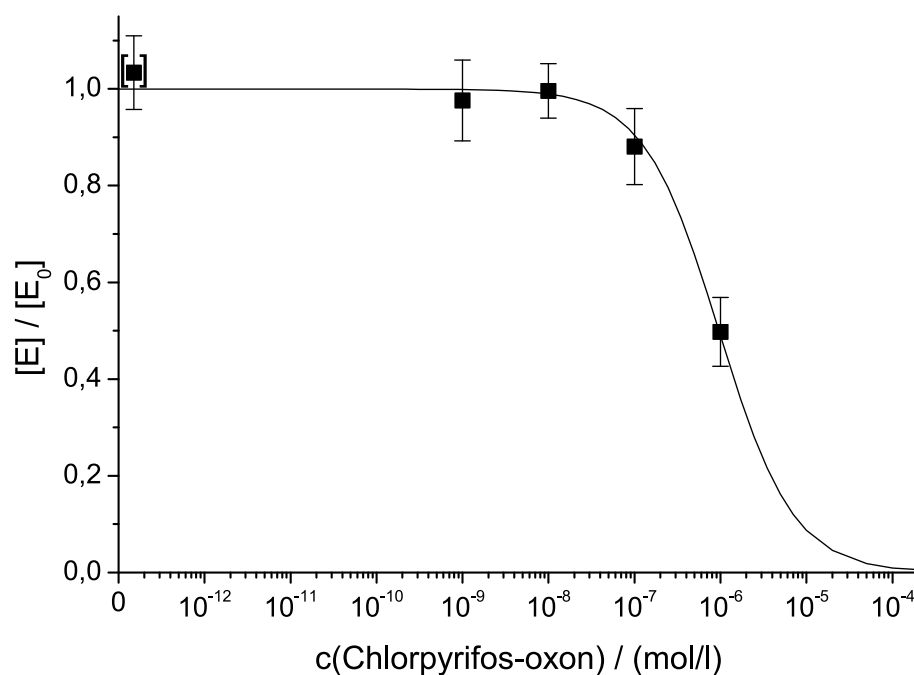


Abbildung 3.9.: Konzentrationsabhängigkeit für Chlorpyrifos-oxon; der Datenpunkt in Klammern stellt die relative Aktivität nach 20 min Pufferfluss an Stelle von CPO dar.

$5 \cdot 10^{-6}$ M und $5 \cdot 10^{-8}$ M CPO. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem photometrischen Test für die Detektion von Chlorpyrifos-oxon in Mikrotiterplatten (siehe Abb. 3.8). Konzentrationen $> 10^{-6}$ M konnten aufgrund der komplizierten Aufbereitung des Inhibitors aus Cyclohexan nicht getestet werden. In vorherigen Arbeiten, in denen mit DFP vorinkubierte EeAChE untersucht wurde, konnte bei vollständiger Inhibition ein Abfallen des Signals auf 3,2% der Ausgangsaktivität nachgewiesen werden [75].

Auch andere Arbeitsgruppen konnten mit EeAChE ähnliche Abhängigkeiten bei der CPO-Inhibition feststellen. Jeanty u. a. [92] konnten $19 \mu\text{g/l}$ ($\cong 5,68 \cdot 10^{-8}$ M) als LOD erreichen. Der dynamische Bereich lag zwischen $1,3 \cdot 10^{-6}$ M und $6,3 \cdot 10^{-8}$ M. Für die *Drosophila* AChE konnte eine untere Nachweisgrenze von $1 \mu\text{g/l}$ ($\cong 3,0 \cdot 10^{-9}$ M) erreicht werden. Das Enzym wurde hier in einem lichtinduziert vernetzten PVA-SbQ-Polymer auf einem Platindraht immobilisiert. Ivanov u. a. [90] untersuchten verschiedene Mediatoren für die Verwendung von AChE und BChE in *screen-printed electrodes* (SPEs). Mit TCNQ (7,7',8,8'-Tetracyanochinodimethan) in Graphitpaste (SPEs vom ITB Stuttgart) konnte die Inhibition durch Chlorpyrifos-methyl nach Oxidation in diversen Fruchtsäften in einem Bereich von $8 \cdot 10^{-8}$ M bis $4 \cdot 10^{-7}$ M detektiert werden. Kralj u. a. [106] prüften unterschiedliche Oxidationsmethoden von Thiophosphonaten mit Hilfe von GC/MS. Die erhaltenen Oxo-Formen wurden mit einem AChE-Biosensor getestet. Das Enzym wurde auf porösen Glaspartikeln in einem

Durchflußreaktor immobilisiert. Als Detektionsmethode wurde die Absorption von 2-Nitro-5-thiobenzoessäure (TNB) mittels *Thermal Lens Spectrometry* (TLS) gemessen. Die Inhibition von Chlorpyrifos-oxon konnte im Bereich von 35-350 ppb ($\cong 10^{-7}\text{M} - 10^{-6}\text{M}$) nachgewiesen werden. Durch Benutzung anderer Acetylcholinesterasen kann die Nachweisgrenze noch weiter gesenkt werden. Wie bereits diskutiert wurde, konnten Jeanty u. a. für die *Drosophila* AChE eine um den Faktor 20 geringere, unterere Nachweisgrenze erreichen. Thirugnanam und Forgash [191] benutzten Hirnhomogenat von *Fundulus heteroclitis* aus der Gattung der Topelritzen zum Nachweis von CPS und CPO (nach Oxidation mit Bromwasser). Als IC_{50} -Werte wurden $7,2 \cdot 10^{-5}\text{M}$ bzw. $4,1 \cdot 10^{-9}\text{M}$ bestimmt. Dieser Nachweis ist noch einmal empfindlicher als der Assay mit DmAChE. Außerdem war auch hier die Oxo-Form des Organophosphats deutlich potenter als das ursprüngliche Thiophosphonat.

3.2. Experimente mit 2,4-D als Hapten

3.2.1. Charakterisierung der 2,4-D-AChE-Konjugate

Acetylcholinesterase und 2,4-D wurden mittels TNTU-Aktivierung gekoppelt. Dabei wurden unterschiedliche Molverhältnisse von 2,4-D zu AChE eingesetzt. In Tabelle 3.3 sind die Proteinkonzentration und die enzymatische Aktivität der AChE-Stammlösung sowie der erhaltenen 2,4-D-AChE-Konjugate aufgelistet. Die spezifische Aktivität der Konjugate ist mit Ausnahme der 2,6 : 1 Modifizierung leicht erhöht (ca. 10-15%). Das ist eher auf einen Aufreinigungseffekt denn auf eine chemisch bedingte Aktivierung zurückzuführen. Während der zahlreichen Filtrationsschritte gehen vor allem kleinere Proteine verloren, so dass sich der Anteil der Acetylcholinesterase am Gesamtproteingehalt erhöht.

Tabelle 3.3.: Eigenschaften der 2,4-D-AChE-Konjugate; Proben: unmodifizierte AChE bzw. 2,4-D-AChE-Konjugate (Molverhältnis 2,4-D : AChE)

Probe	EA in U/ml	c in $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	EA in U/mg
Stammlsg.	147,5	179,3	822,7
2,6 : 1	103,0	145,2	709,8
26 : 1	155,4	163,7	949,2
260 : 1	185,7	207,2	896,3

3.2.2. Einfluss von DMF auf die AChE-Aktivität

Wird TNTU-aktiviertes 2,4-D zur Cholinesteraselösung gegeben, so wird die Lösung weißlich trüb. Dieser Effekt, wenn auch in geringem Ausmaß, tritt auch bei den Zugaben von reinem DMF auf. Tabelle 3.4 zeigt die Ergebnisse der AChE-Aktivitätsbestimmung nach Inkubation mit unterschiedlichen DMF-Konzentrationen. Es werden die erreichten Umsatzraten (OD/min) im Verhältnis zur unbehandelten AChE zusammengefasst. In allen Fällen ist ein Absinken der Aktivität von 10-20% zu beobachten. Wird bei der Normalisierung auch die unterschiedliche Verdünnung der Proben berücksichtigt, so fällt das Ergebnis etwas weniger drastisch aus. Die Werte sind nur noch um 8-16% niedriger. Vor allem wird deutlich, dass bereits 1 Vol. % DMF für einen signifikanten Aktivitätsabfall sorgt. Der Unterschied zwischen 5 und 10 Vol. % ist jedoch marginal. Die Reihenfolge der Mischung von DMF und AChE-Lösung hat dagegen keinen Einfluss.

Tabelle 3.4.: Einfluss von DMF auf die AChE-Aktivität; % Maximum = normalisierte Aktivitätsbestimmung; % Maximum* = wie zuvor, verdünnungskorrigiert

Probe	c(DMF) in Vol. %	OD/min	VK	% Maximum	% Maximum*
Stammlsg.	0	0,467	2%	100%	100%
DMF ← AChE	10	0,367	4%	79%	87%
	5	0,384	2%	82%	87%
	1	0,425	2%	91%	92%
AChE ← DMF	10	0,353	3%	76%	84%
	5	0,381	2%	82%	86%
	1	0,427	2%	91%	92%

3.2.3. Test des 2,4-D-AChE-Konjugats in Mikrotiterplatten

Mikrotiterplatten wurden nacheinander mit Anti-Maus-AK und anti-2,4-D-AK (aus Maus) belegt. Die Bindung der 2,4-D-AChE and die anti-2,4-D-Antikörper wurde über die AChE-Aktivität getestet. Als Negativkontrolle wurde unmodifizierte AChE in der gleichen Konzentration wie die niedrigste Konjugatverdünnungsstufe gewählt.

Bei allen Konjugaten konnte eine erfolgreiche Kopplung von 2,4-D an die AChE nachgewiesen werden (Abb. 3.10 und 3.11). Allerdings ist das Signal der Negativkontrolle mit 20-25% relativ hoch. Mit höherer anti-2,4-D-Antikörper-Dichte kann die Bindung der unmodifizierten AChE zwar reduziert, aber nicht komplett verhindert werden. Deutlich ist auch das erreichte Maximum bei 0,05 OD/min. Dieser Wert wurde von allen Konjugaten in zehnfacher Verdünnung

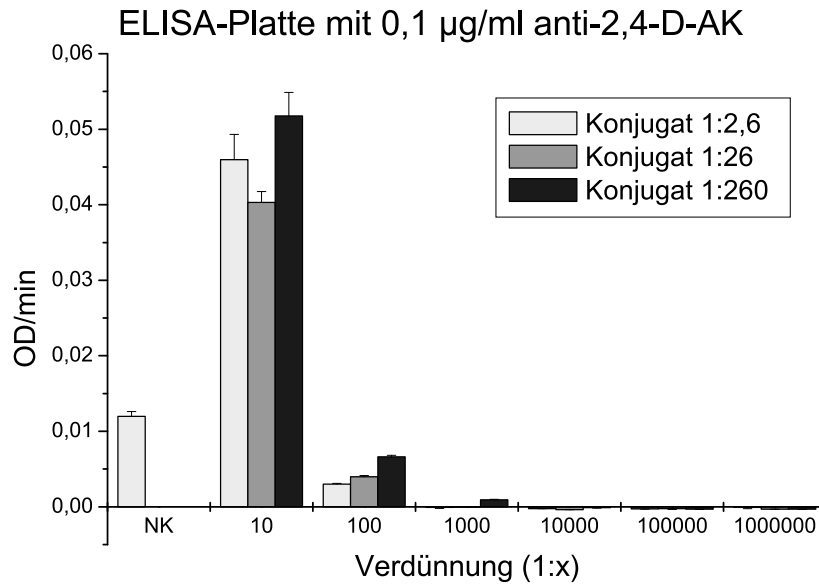


Abbildung 3.10.: Pseudo-ELISA mit 0,1 µg·ml⁻¹ anti-2,4-D-AK, 2,4-D-EeAChE-Konjugat in unterschiedlichen Verdünnungen (Dubletts), NK... Negativkontrolle (unmodifizierte EeAChE, Konzentration wie 1:10 verdünnte Konjugate, Mittelwert aus 6 Werten)

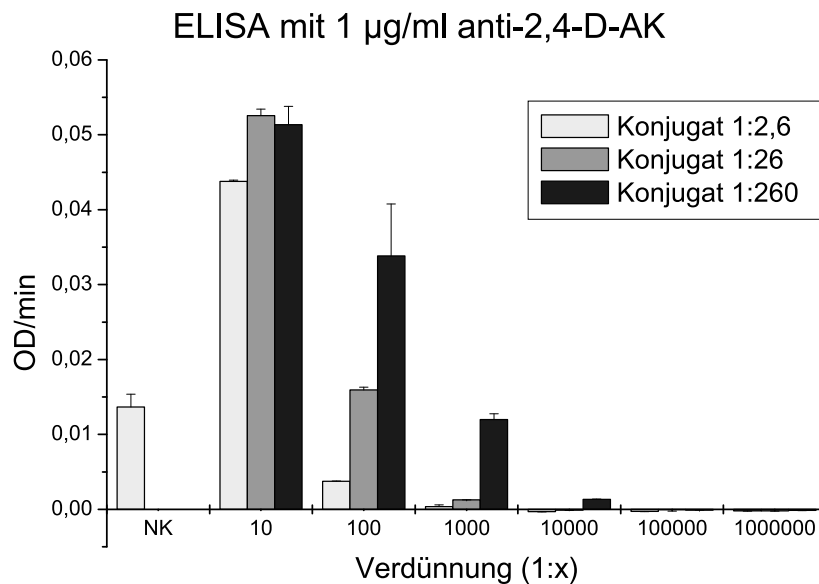


Abbildung 3.11.: Pseudo-ELISA mit 1 µg·ml⁻¹ anti-2,4-D-AK, 2,4-D-EeAChE-Konjugat in unterschiedlichen Verdünnungen (Dubletts), NK... Negativkontrolle (unmodifizierte EeAChE, Konzentration wie 1:10 verdünnte Konjugate, Mittelwert aus 6 Werten)

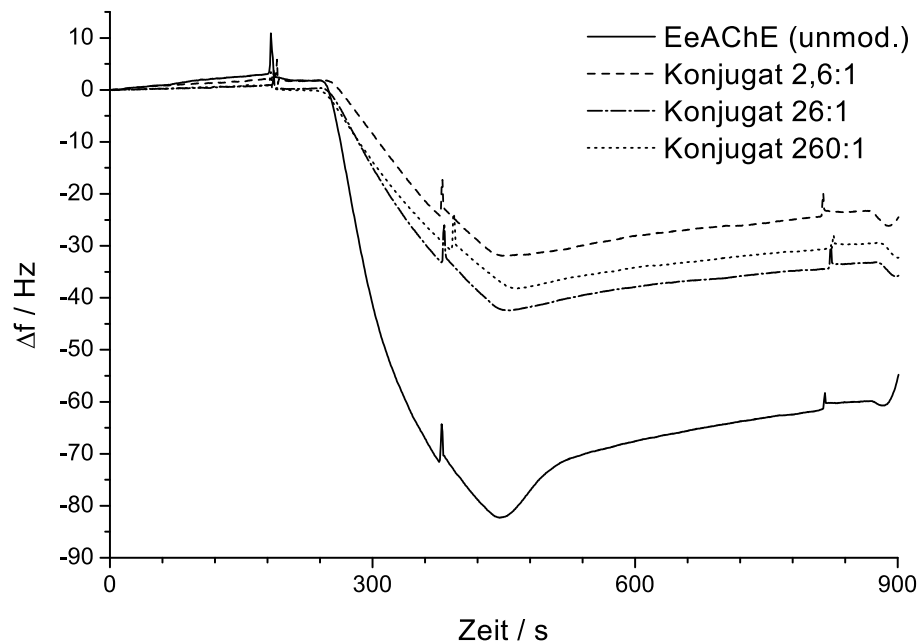


Abbildung 3.12.: Bindung der 2,4-D-AChE-Konjugate an Propidium-modifizierte Piezosensoren; Vergleich der Bindung von unmodifizierter AChE und der drei 2,4-D-AChE-Konjugate

sowohl bei der Belegung mit $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ als auch mit $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ anti-2,4-D-Antikörper erreicht. Erst in der 1:100 Verdünnung ist eine Unterscheidung der Konjugate möglich. Vor allem bei einer Konzentration von $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Antikörper (Abb. 3.11) wird deutlich, dass ein höherer 2,4-D-Überschuß während der Synthese eine bessere Bindung an die mit Antikörper beschichteten Mikrotiterplatten ermöglicht. Diese Tatsache und die geringe unspezifische Bindung sprechen für eine erfolgreiche und immunoaktive Modifizierung der Acetylcholinesterase.

3.2.4. EQCM mit 2,4-D-AChE an Propidium

Die erhaltenen 2,4-D-AChE-Konjugate wurden im EQCM-System zunächst auf ihre Bindungsfähigkeit zu Propidium untersucht. Abbildung 3.12 stellt die Ergebnisse dieser Untersuchungen dar. Bei gleicher Proteinkonzentration ist die erzielte Bindung nach 3 min Injektion bei den Konjugaten um ein Drittel schwächer im Vergleich zur unmodifizierten Acetylcholinesterase. Die Bindungsfähigkeit aller drei Enzymkonjugate zum Propidium bleibt aber erhalten. Weiterhin lässt sich zwischen den Konjugaten kein signifikanter Unterschied in der Affinität zum Propidium aufgrund der unterschiedlichen 2,4-D-Überschüsse in der Synthese ausmachen. Alle drei 2,4-D-AChE-Konjugate ermöglichen außerdem die amperometrische Aktivitätsmessung der oberflächengebundenen AChE. Abbildung 3.13 zeigt die

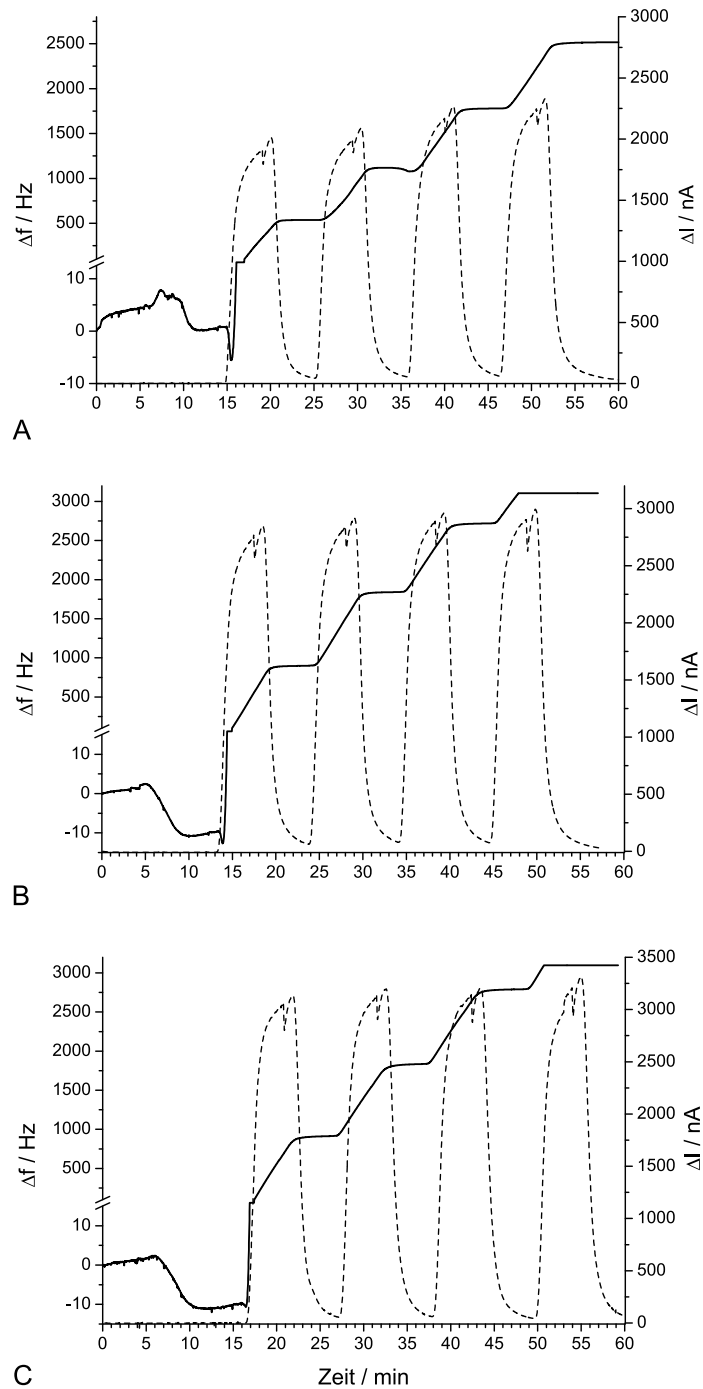


Abbildung 3.13.: Bindung und Aktivitätsbestimmung der 2,4-D-AChE-Konjugate am Propidium-modifizierten QCM-Sensor; Injektion der Konjugate mit anschließenden Injektion von Acetylthiocholin (Piezosignal: durchgezogen, Strommessung: gestrichelt), Konjugat 2,6:1 (A), 26:1 (B), 260:1 (C)

elektrochemisch messbaren Aktivitäten der drei Konjugate im Vergleich. Diese Ergebnisse spiegeln auch die Aktivitätsbestimmungen mit dem photometrischen Assay wider. Wie bereits in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, zeigt nur das 2,4-D-AChE-Konjugat 2,6 : 1 eine leicht reduzierte Aktivität. Für die beiden anderen 2,4-D-AChE-Konjugate wurden Werte bestimmt, die vergleichbar zu den Ergebnissen von Halamek u. a. [75] sind.

3.2.5. Bindungstest mit anti-2,4-D-Antikörpern

Nachdem die Bindung zwischen anti-2,4-D-Antikörper und 2,4-D-AChE bereits in Mikrotiterplatten nachgewiesen werden konnte, wurden die beiden Bindungspartner im Fließsystem getestet. Abbildung 3.14 zeigt die aufeinanderfolgende Bindung von 2,4-D-AChE und anti-2,4-D-Antikörper mit anschließender Regeneration durch Pepsin pH 2. Hier zeigt sich kein so deutlicher Unterschied wie beim Mikrotiterplattentest. Dies liegt darin begründet, dass hier vor allem die Kinetik der Bindung eine Rolle spielt und nicht der Gleichgewichtszustand (der in diesem Fall noch nicht erreicht wurde).

Bei der Antikörperbindung an unmodifizierte Acetylcholinesterase zeigt sich auch hier (Abb. 3.15) eine unspezifische Bindung von ca. 24%. Auf der anderen Seite ist die erreichte Frequenzdifferenz nicht sehr groß. Um dieses Signal zu verstärken, sollten Nanopartikel an die Antikörper gekoppelt werden, um so deren Masse zu erhöhen.

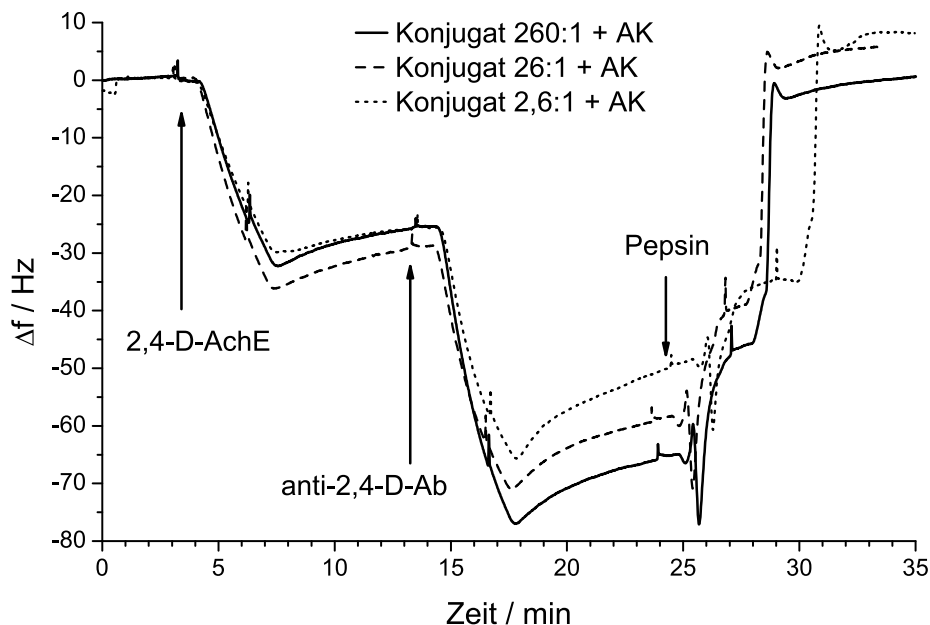


Abbildung 3.14.: Bindung von 2,4-D-AChE an den Propidium-modifizierten Sensor mit anschließender Injektion von $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ anti-2,4-D-Antikörper

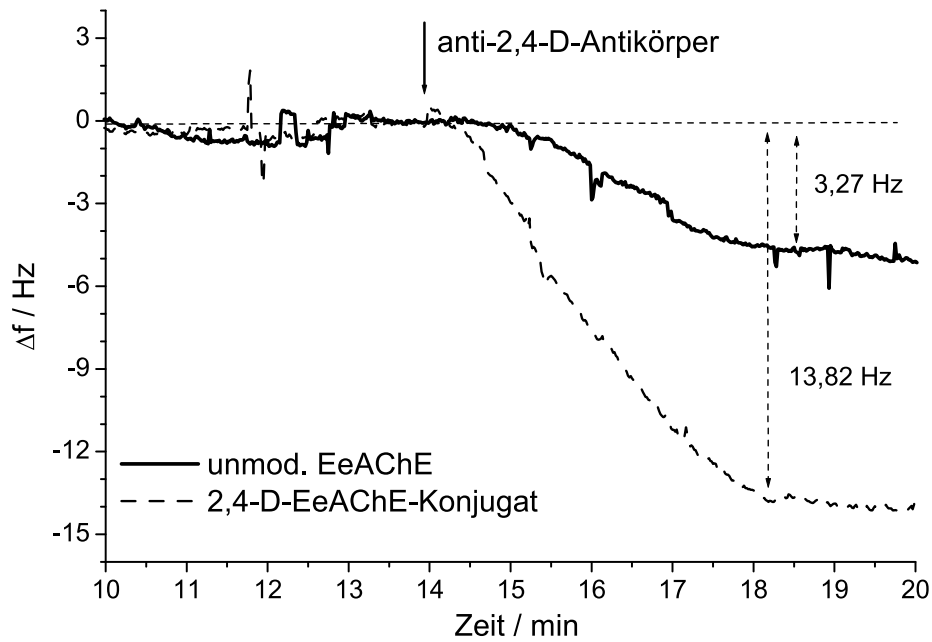


Abbildung 3.15.: Vergleich der Bindung des anti-2,4-D-Antikörpers an 2,4-D-AChE und der unspezifischen Wechselwirkung mit unmodifizierter EeAChE auf dem Propidium-modifizierten Sensor

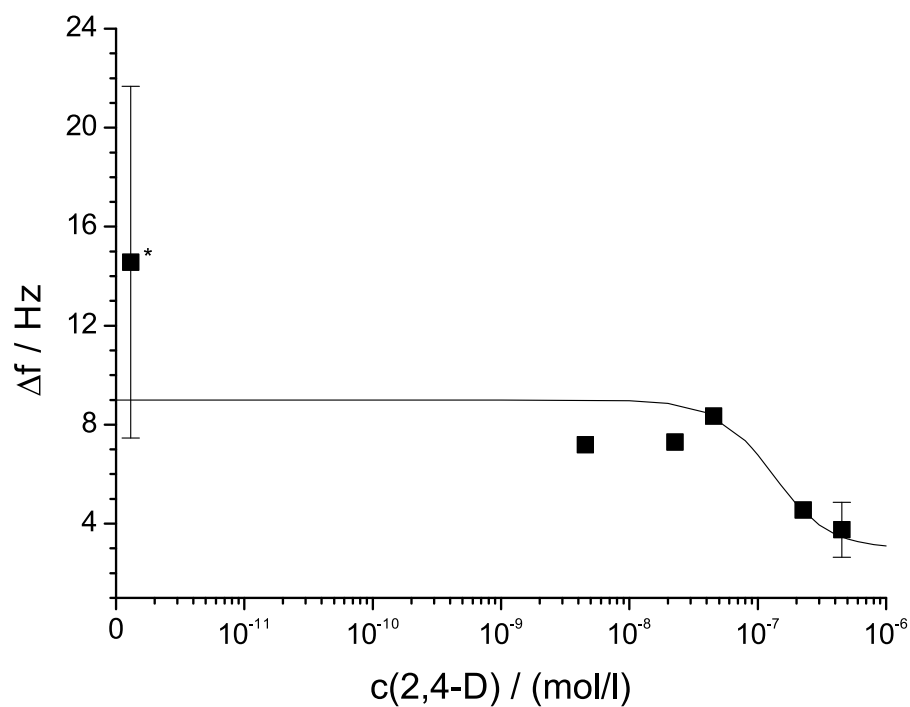


Abbildung 3.16.: Kompetitiver Immunoassay mit 2,4-D; Bindung des anti-2,4-D-Antikörpers an 2,4-D-AChE auf dem Propidium-modifizierten Piezosensoren; *... Positivkontrolle ohne 2,4-D; die Linie dient lediglich zur Orientierung

Abbildung 3.16 zeigt den kompetitiven Immunoassay mit 2,4-D im Fließsystem. Dazu wurde zunächst 2,4-D-AChE auf dem Propidium-modifizierten Sensor immobilisiert. Anti-2,4-D-Antikörper wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an 2,4-D vorinkubiert und anschließend ins Fließsystem injiziert. Das erhaltene Bindungssignal ist in Abb. 3.16 aufgetragen. Die erhaltenen Signale sind sehr niedrig und streuen zudem sehr stark (vgl. Frequenzdifferenz der 2,4-D-freien Probe). Daher ist es schwierig eine Aussage über die Empfindlichkeit des Systems zu treffen.

Die Ursache für die Verringerung des Signals ist vermutlich in der Geometrie der verwendeten Messzelle zu suchen. In Vorbereitung für die elektrochemischen Experimente wurde auch dieser Versuch in der Messzelle mit eingesteckter Referenzelektrode durchgeführt (zum Aufbau der Messzellen siehe Abbildung 5.4 auf Seite 80). Obwohl beide Zellen über ein ähnliches Innenvolumen verfügen, unterscheiden sich die aufgenommenen Bindungskurven deutlich voneinander. In der Kombizelle (mit Titan-Hilfselektrode und Referenzelektrode) sind die apparenten Bindungsgeschwindigkeiten kleiner. So wird ein niedrigeres Plateau bei gleicher Ligandenkonzentration erreicht (vergleiche Signal der 2,4-D-AChE-Bindung in Abb. 3.12 und 3.13). Die veränderte Geometrie der Messzelle führt offensichtlich zu deutlichen Unterschieden im Strömungsverhalten im Zellinneren. Dafür spricht auch die Tatsache, dass bei Verwendung der Kombizelle eine höhere Geschwindigkeit an der Peristaltikpumpe eingestellt werden muss, um den gleichen Nettovolumenstrom wie bei der Messzelle mit glattem Deckel (Abb. 5.4.C) zu erreichen.

3.2.6. Kompetitiver Immunoassay mit 2,4-D-modifizierten Sensoren

Für die nachfolgenden Untersuchungen der anti-2,4-D-Antikörper-modifizierten Nanopartikel wurde die Messplattform vereinfacht und 2,4-D über *p*-Aminothiophenol direkt auf dem Piezosensor immobilisiert (Schema siehe Abbildung 5.3 auf Seite 78). Zunächst wurde der unmodifizierte Antikörper auf die Bindungsfähigkeit zum 2,4-D auf dem QCM-Chip geprüft. Die Abbildungen 3.17 und 3.18 zeigen den kompetitiven Immunoassay mit 2,4-D im Fließsystem. Die 2,4-D-Proben wurden jeweils mit $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bzw. $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ anti-2,4-D-Antikörper vorinkubiert. Für die verwendeten Antikörper des Klons E2/G2 haben Brichta und Franek [24] einen IC_{50} von $2,0 \mu\text{g/l}$ ($\cong 9,0 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) bestimmt. In dieser Arbeit wurde ein IC_{50} von $6,5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ bzw. $7,1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ berechnet. Dabei wird deutlich, dass die Messwerte bei der niedrigen Antikörperkonzentration (Abb. 3.17) eine hohe Streuung zeigen. Für einen aussagekräftigen Nachweis ist die Konzentrationsabhängigkeit mit $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Antikörper besser geeignet. Horacek und Skladal [86] verwendeten ebenfalls den monoklonalen Antikörper E2/G2 für einen Nachweis mit einem piezoelektrischen Sensor. Die Oberfläche wurde

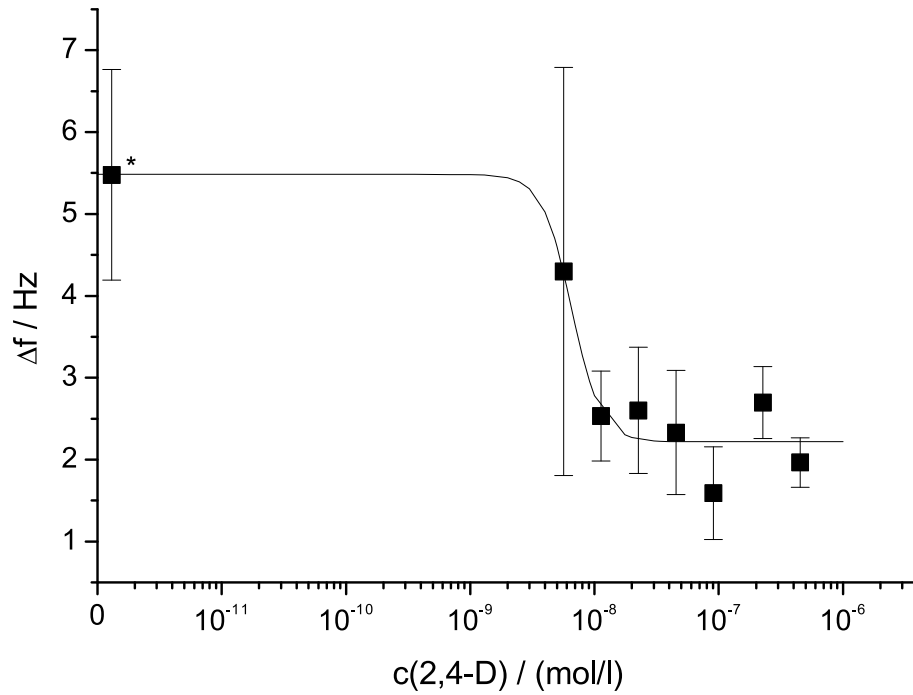


Abbildung 3.17.: Kompetitiver Immunoassay mit 2,4-D im Fließsystem mit $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ anti-2,4-D-Antikörper, *... Positivkontrolle ohne 2,4-D, $\text{IC}_{50} = 6,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

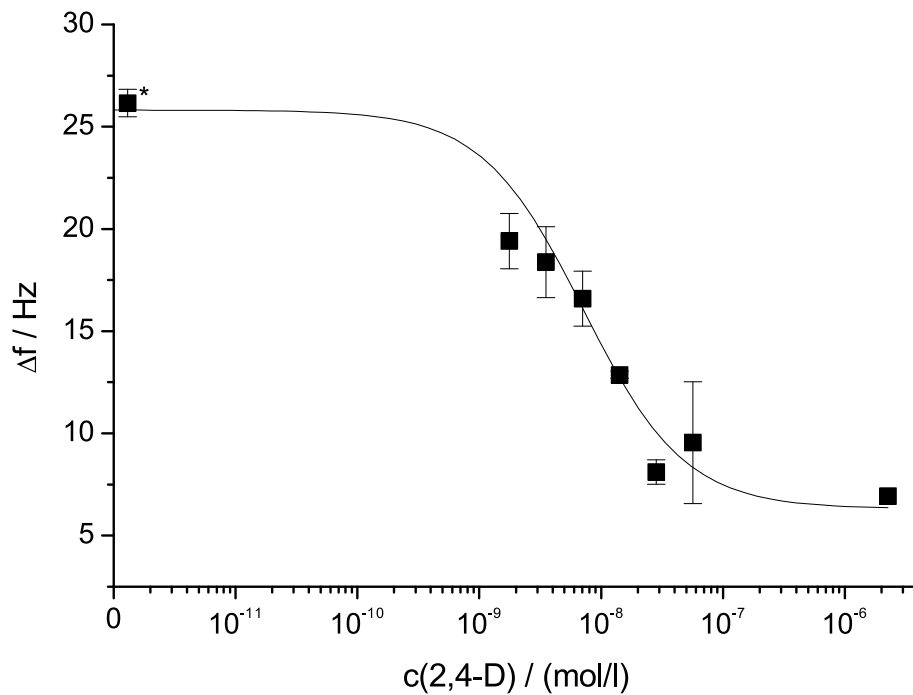


Abbildung 3.18.: Kompetitiver Immunoassay mit 2,4-D im Fließsystem mit $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ anti-2,4-D-Antikörper, *... Positivkontrolle ohne 2,4-D, $\text{IC}_{50} = 7,1 \cdot 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

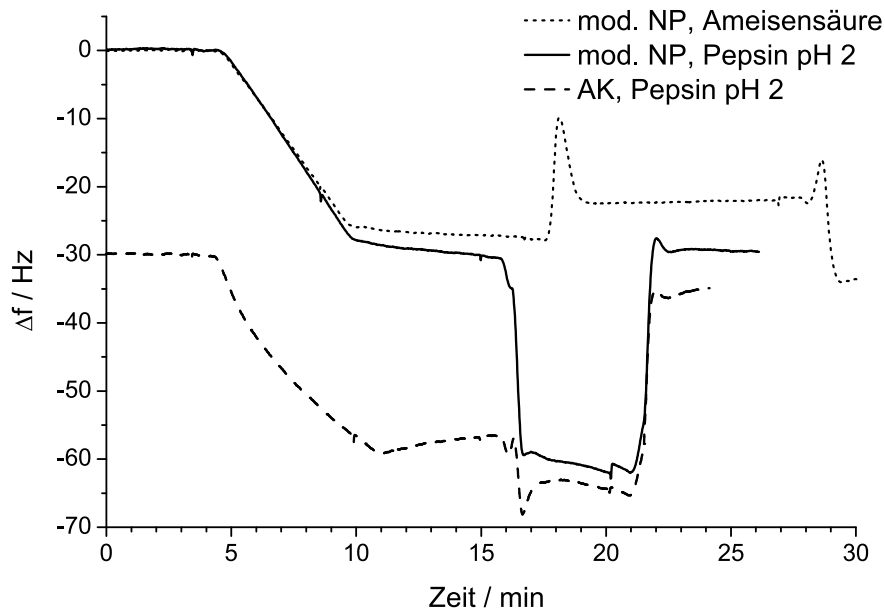


Abbildung 3.19.: Vergleich der Bindung von 2,4-D-Antikörpern (AK) und Antikörper-modifizierten Goldnanopartikeln (mod. NP) an 2,4-D-Piezosensoren; die Antikörper-Bindungskurve wurde zur besseren Übersicht um -30 Hz verschoben.

dabei mit hochmolekularen 2,4-D-Konjugaten modifiziert. Für 2,4-D-BSA konnte ein IC_{50} von $6,1 \mu\text{g/l}$ ($\cong 27,6 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) bestimmt werden. Im Fall von 2,4-D-Dextran lag der IC_{50} bei einem vergleichbaren Wert von $9,5 \mu\text{g/l}$ ($\cong 42,9 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Trotz der hohen Werte für den Testmittelpunkt lag die untere Nachweisgrenze in beiden Fällen bei ca. $0,25 \mu\text{g/l}$ ($\cong 1,1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$). In diese Arbeit konnte ein ähnlicher LOD-Wert erreicht werden, allerdings ist der dynamische Bereich auf nur zwei Zehnerpotenzen beschränkt.

3.2.7. Anti-2,4-Antikörper-modifizierte Goldnanopartikel

Zur Verstärkung des QCM-Signals der Antikörperbindung wurden diese an Nanopartikel gekoppelt. Als erste Variante wurden kolloidale Goldnanopartikel mit einem mittleren Durchmesser von 20 nm getestet. Die Antikörper wurden dabei zunächst durch simple Adsorption immobilisiert. Die so modifizierten anti-2,4-D-Goldnanopartikel wurden zunächst nur mit den 2,4-D-*p*-Aminothiophenol-modifizierten Piezosensoren (via TNTU-Kopplung S. 77) getestet.

Abbildung 3.19 zeigt die Bindung von freiem anti-2,4-D-AK und Ak-modifizierten Goldnanopartikeln im Vergleich. Umgerechnet auf die Zahl gebundener Antikörper pro Nanopartikel

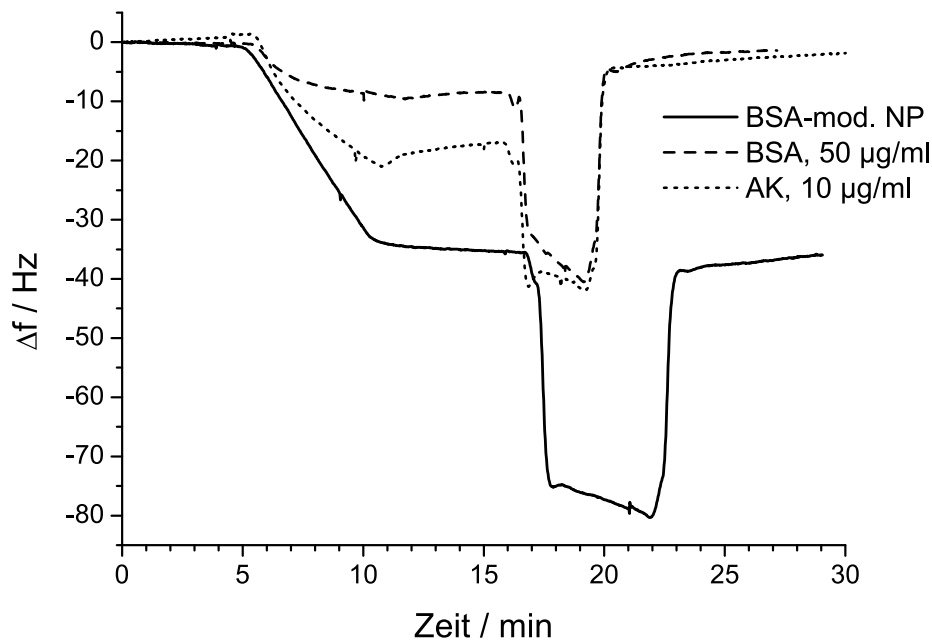


Abbildung 3.20.: Vergleich der Bindung von anti-2,4-D-Antikörpern (AK), BSA und BSA-modifizierten Goldnanopartikeln; Regeneration mit Pepsin pH 2

lässt sich mit den Nanopartikeln im Vergleich zur Lösung mit freiem Antikörper eine Signalverstärkung um den Faktor 10 erreichen. Deutlich ist außerdem die geringe Dissoziation der Antikörper-modifizierten Nanopartikel. Dies lässt sich sehr gut am nahezu linearen Verlauf der Bindungskurven sowohl im Bereich der Nanopartikelinjektion als auch in der Waschphase beobachten.

Zum Vergleich mit den 2,4-D-AK-modifizierten Goldnanopartikeln wurde eine Fraktion der Goldnanopartikel ausschließlich mit BSA beschichtet. In Abbildung 3.20 werden die Bindungskurven der BSA-Goldnanopartikel am 2,4-D-modifizierten QCM-Sensor dargestellt. Zunächst fällt auch hier auf, dass die Bindung der proteinmodifizierten Nanopartikel deutlich stärker als die Bindung des freien Proteins ist. Allerdings ist der Betrag dieser Bindung im Vergleich mit den Goldnanopartikeln, die mit anti-2,4-D-Antikörper und BSA beschichtet wurden (Abb. 3.19), nahezu identisch. Auch freies BSA in Lösung zeigt eine deutliche Affinität zum 2,4-D-modifizierten Sensor. Deshalb ist davon auszugehen, dass auch bei den Antikörper-modifizierten Nanopartikeln der BSA-Anteil die Bindung dominiert.

Deshalb wurde versucht, die unspezifische Proteinadsorption durch eine definierte Kopplungsstrategie zu ersetzen. Dazu wurden in Analogie zur Modifikation von Goldelektroden Versuche durchgeführt, eine Alkanthiol-Schicht mit reaktiven Kopfgruppen auf die Goldnanopartikel aufzubringen. Die Wahl fiel dabei zunächst auf ein Gemisch aus 11-Mercaptoundecansäure

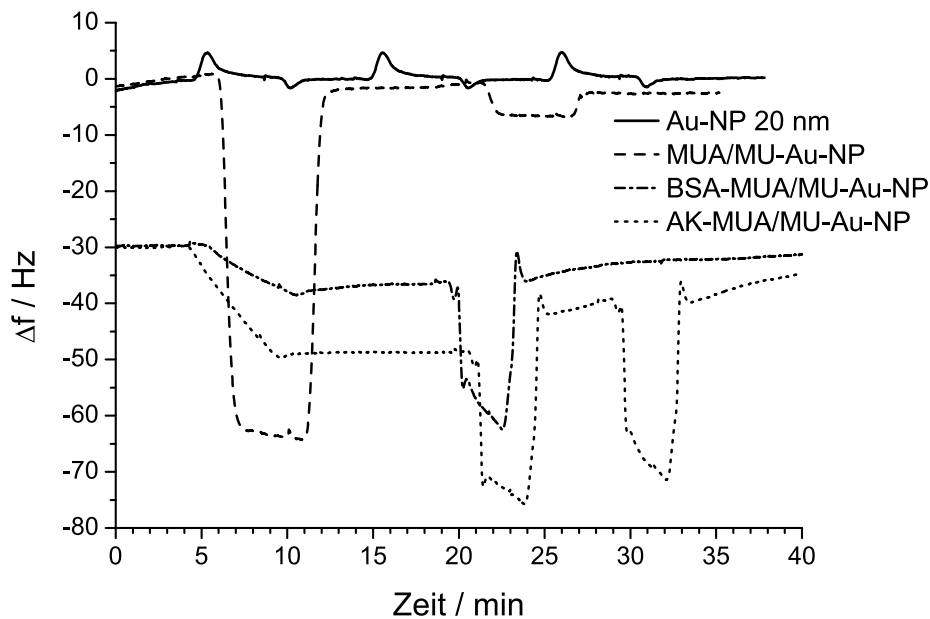


Abbildung 3.21.: Vergleich der Bindung von unmodifizierten Goldnanopartikeln (Au-NP), alkanthiol-modifizierten Au-NP und BSA und anti-2,4-D-Antikörper gekoppelt an alkanthiol-modifizierte Au-NP

(MUA) und 11-Mercaptoundecanol (MU) in einem molaren Verhältnis von 1 : 3 (MUA : MU). Abbildung 3.21 zeigt die mehrfache Injektion von unmodifizierten Goldnanopartikel (schwarz) und die Injektion von MUA/MU-modifizierten Nanopartikeln (rot) als Stammlösung und mit Puffer 1 : 10 verdünnt. In beiden Fällen zeigen die Frequenzkurven lediglich reversible, auf Viskositätsänderungen beruhende Ausschläge. Im Fall der MUA/MU-modifizierten Goldnanopartikel sind die Plateaus vom Betrag zwar deutlich größer, allerdings können die Nanopartikel durch einfachen Wechsel zum Fließpuffer wieder aus der Messzelle gespült werden. Bindet man nun BSA (grün) bzw. anti-2,4-D-Antikörper (blau) an die Carboxylgruppen der MUA/MU-modifizierten Partikel, so zeigt sich wiederum ein deutliches Signal der unspezifischen Bindung von BSA an den 2,4-D-modifizierten Sensor. Dies unterstreicht die vorangegangenen Experimente. Im Falle der anti-2,4-D-Antikörper, die hier nicht mit BSA koimmobilisiert werden, zeigt sich ein deutliches Bindungssignal.

Weiterhin wurde die Langzeitstabilität der erhaltenen Antikörper-modifizierten Goldnanopartikel untersucht. Unmodifizierte und auch alkanthiolverkapselte Goldnanopartikel zeigen in Pufferlösungen eine deutliche Tendenz zur Aggregation [99]. Dies wird in der Regel durch eine deutliche Erhöhung der optischen Dichte der Goldnanopartikel-Lösung und eine Verschiebung des Absorptionsmaximum zu höheren Wellenlängen deutlich. Bei den MUA/MU-modifizierten Nanopartikeln konnte zudem beobachtet werden, dass diese an der

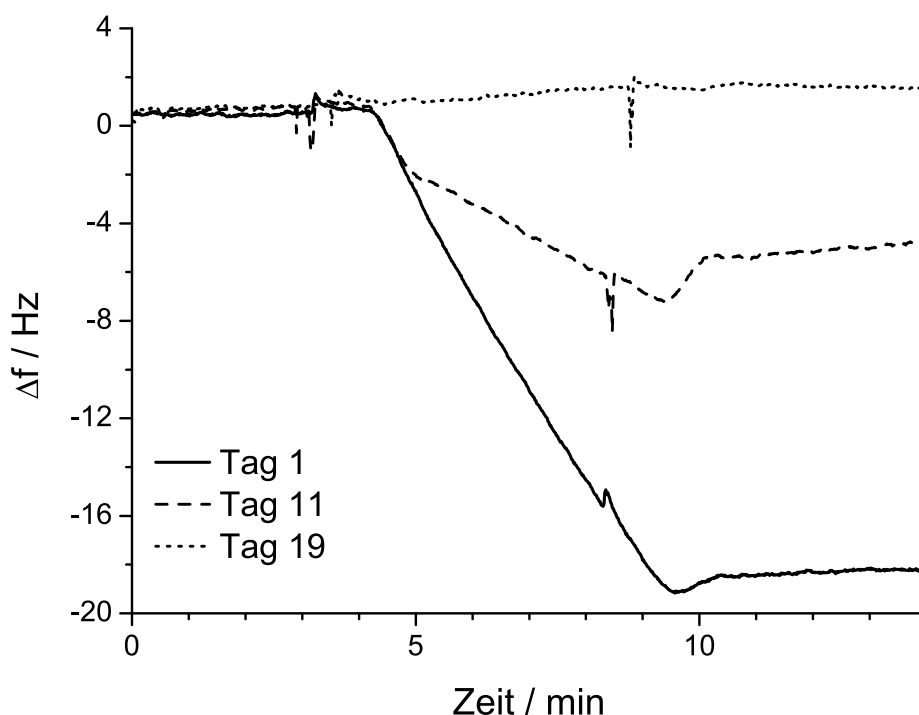


Abbildung 3.22.: Untersuchungen zur Langzeitstabilität der anti-2,4-D-AK-MUA-modifizierten Goldnanopartikel

Wand der Eppendorf-Reaktionsgefäße adsorbieren und sich nur sehr schwer (96% Ethanol und Ultraschallbad) resuspendieren lassen. Auch die Antikörper-modifizierten Goldnanopartikel scheinen diesem Trend zu folgen (siehe Abb. 3.22). Bereits nach einer Woche ist das Messsignal um die Hälfte gefallen. Im Verlauf von 19 Tagen ist die effektive Konzentration der Antikörper-Nanopartikel-Konjugate auf Null gesunken. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass Goldnanopartikel als Masselabel zur Verstärkung des Signals der Antikörperbindung in diesem System ungeeignet sind.

3.2.8. Antikörper-modifizierte Silica-Nanopartikel

Zum Erreichen einer definierten Kopplung der Antikörper an die Nanopartikel und einer höheren Stabilität wurde die Matrix – die Nanopartikel – gewechselt. Die Wahl fiel dabei auf Silica-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 80 nm und terminalen Carboxylgruppen, um die Kopplung der Antikörper via TNTU-Aktivierung zu ermöglichen.

Zur Charakterisierung der Silica-Nanopartikel wurde der photometrische Nachweis nach DIN ISO 16264 [137] verwendet. Die Partikel wurden dazu in Schwefelsäure aufgelöst. Das gebildete Silikat ist erforderlich für die Komplexbildung zum Molybdänblau. Abbildung 3.23

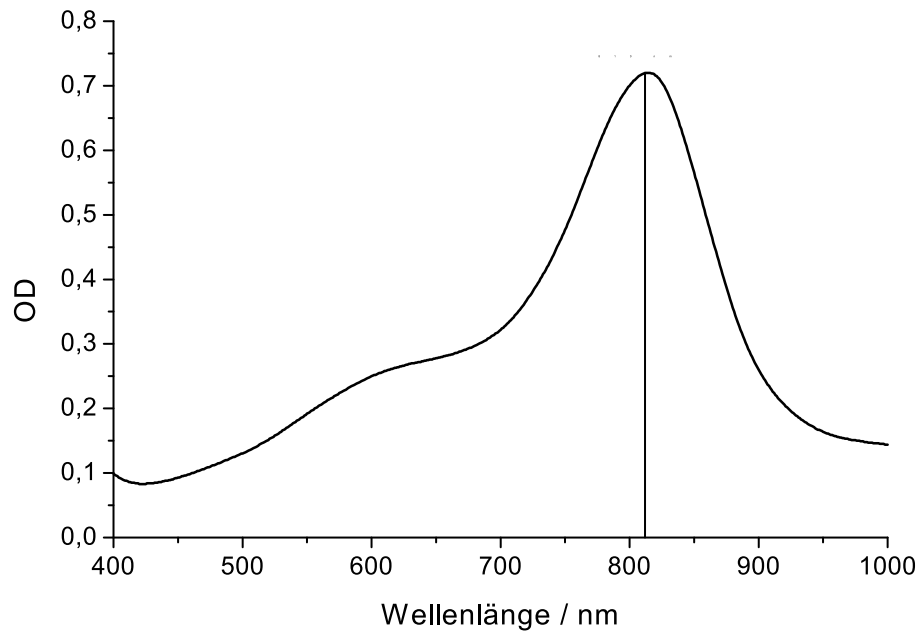


Abbildung 3.23.: Spektrum einer 5-fach verdünnten SNP-Suspension ($9,32 \cdot 10^{12}$ Partikel je ml) nach Auflösung und Komplexierung mit Molybdänblau

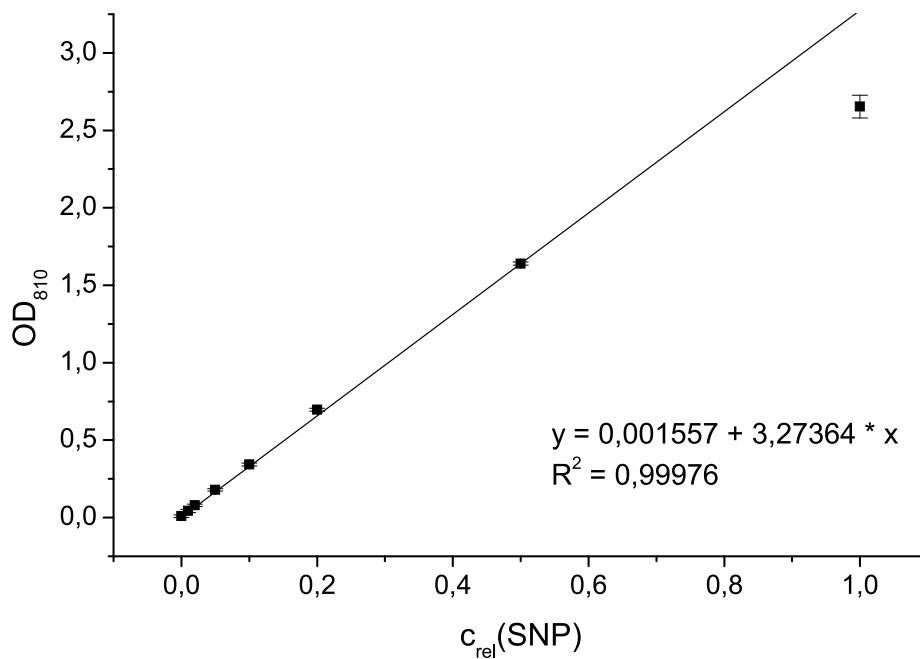


Abbildung 3.24.: Konzentrationsabhängigkeit für die Nachweisreaktion mit Molybdänblau ($n = 3$); Stammlösung $4,7 \cdot 10^{13}$ Partikel je ml; der Datenpunkt der unverdünnten SNP-Suspension wurde für die lineare Regression nicht verwendet.

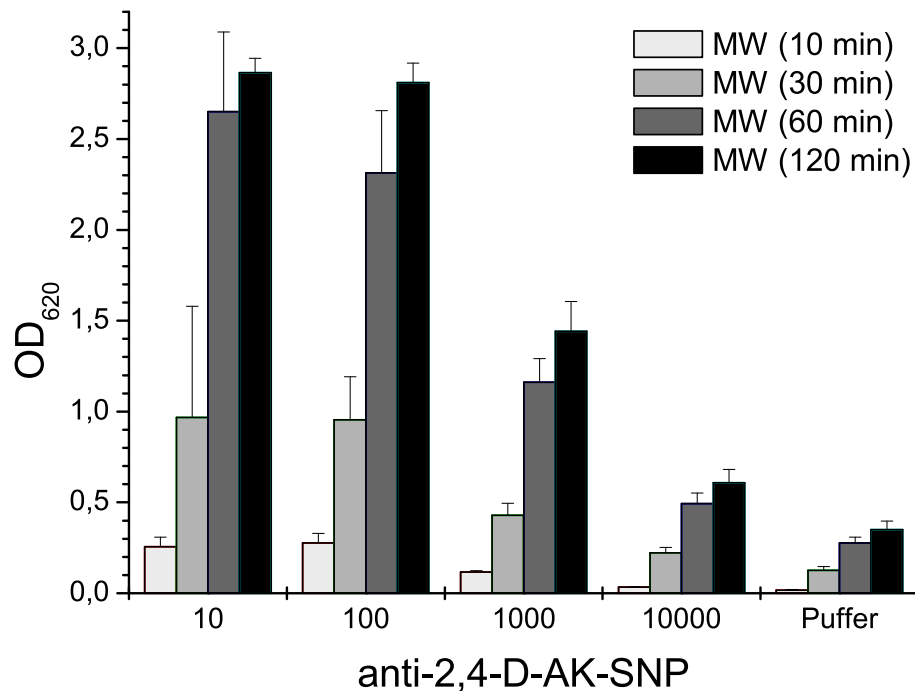


Abbildung 3.25.: Partikel-ELISA zum Nachweis der Bindung von anti-2,4-D-modifizierten SNP in unterschiedlichen Verdünnungen an 2,4-D-AChE, anti-Maus-AK-POD-Konjugat 1 : 10000, n = 4

zeigt das Spektrum des Farbkomplexes. Das Absorptionsmaximum liegt bei 810 nm. Diese Wellenlänge wurde für die nachfolgende Konzentrationsabhängigkeit als konstant gesetzt. Abbildung 3.24 zeigt die Ergebnisse des Küvettentests. Bis zu einer Partikelkonzentration von $2,3 \cdot 10^{13} \text{ ml}^{-1}$ besteht eine sehr gute lineare Korrelation zur optischen Dichte der Lösung. Dieser Test konnte daher auch zur Konzentrationsbestimmung der modifizierten Silica-Nanopartikel eingesetzt werden.

Erste Bindungstests mit den anti-2,4-D-modifizierten Silica-Nanopartikeln wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt. Als Reporterenzym wurde Peroxidase gekoppelt an anti-Maus-Antikörper verwendet. Die Mikrotiterplatte wurden mit dem 2,4-D-AChE-Konjugat beschichtet und anschließend mit unterschiedlichen Verdünnungen der anti-2,4-D-modifizierten SNP inkubiert (siehe Abschnitt 5.7.13 auf Seite 87). Abbildung 3.25 zeigt die Bindung des anti-Maus-Antikörpers (Verdünnung 1 : 10000) gemessen über die Farbentwicklung der Peroxidase-reaktion. Es wird deutlich, dass die Reaktion der Peroxidase äußerst empfindlich ist und schon nach einer Stunde nahezu die maximale Intensität des Farbstoffes erreicht. Eine weitere Stunde Inkubationszeit bringt keinen nennenswerten Absorptionszugewinn. Man sieht weiterhin, dass eine Verdünnung der modifizierten Silica-Nanopartikel von 1 : 100

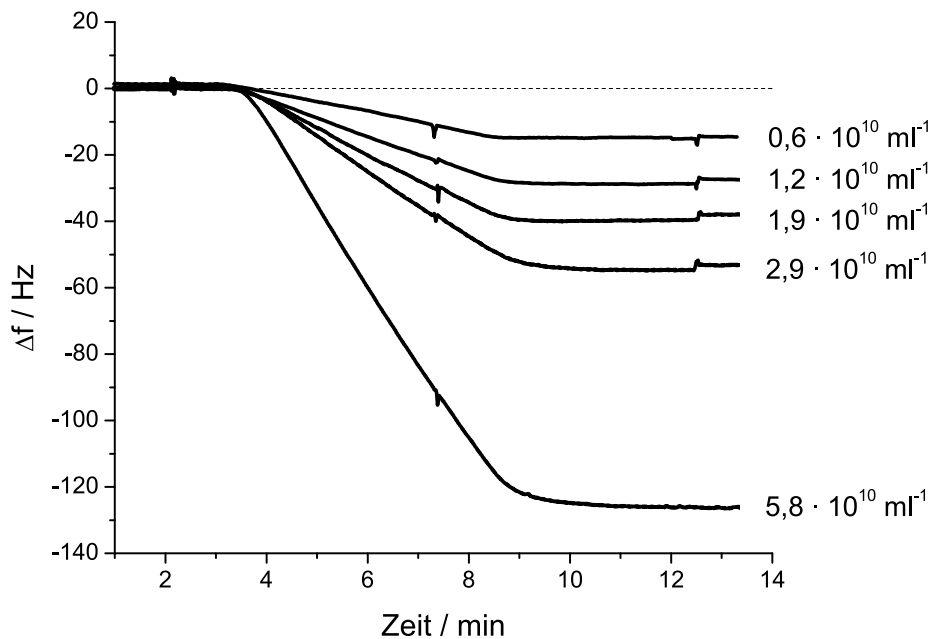


Abbildung 3.26.: Bindung von anti-2,4-D-Antikörper-modifizierten Silica-Nanopartikeln in unterschiedlichen Konzentrationen an 2,4-D-modifizierte Piezosensoren

bereits ausreichend ist, um eine fast vollständige Belegung der adsorbierten 2,4-D-AChE zu erreichen. Die höher konzentrierte 1 : 10 Verdünnung zeigt keine weitere Signalsteigerung. Außerdem wird in den Mikrotiterplatten- Wells, die keine modifizierten SNP enthielten, nur eine sehr geringe unspezifische Bindung des anti-Maus-Antikörpers gemessen. Diese Ergebnisse sprechen für eine erfolgreiche Kopplung der anti-2,4-D-Antikörper an die Silica-Nanopartikel.

Im folgenden wurde die Bindung der an Silica-Nanopartikel gekoppelten anti-2,4-D-Antikörper an die 2,4-D-modifizierte Sensoren untersucht. Das Bindungssignal wies eine sehr gute Konzentrationsabhängigkeit auf (siehe Abbildung 3.26). Allerdings wurde auch hier deutlich, dass Pepsin als Regenerationsreagens nicht sehr effizient funktioniert. Liu u. a. [114] benutzten in ihrem QCM-System verdünnte Natronlauge zur Regeneration der Sensoroberfläche nach Antikörperbindung. 10 mM NaOH hat einen pH \approx 12 und sollte dadurch in der Lage sein, die Silica-Nanopartikel direkt aufzulösen.

In Abbildung 3.27 ist eine Beispielmessung für eine Bindung der Antikörper-modifizierten Silica-Nanopartikel (AK-SNP) mit anschließender Regeneration mit 10 mM NaOH dargestellt. Deutlich wird die gute Regeneration der Oberfläche, so dass nach kurzem Spülen mit Laufpuffer die Ausgangsbasislinie wieder erreicht wird. Die gute Reproduzierbarkeit der AK-SNP-Bindung ist in Abbildung 3.28 gezeigt.

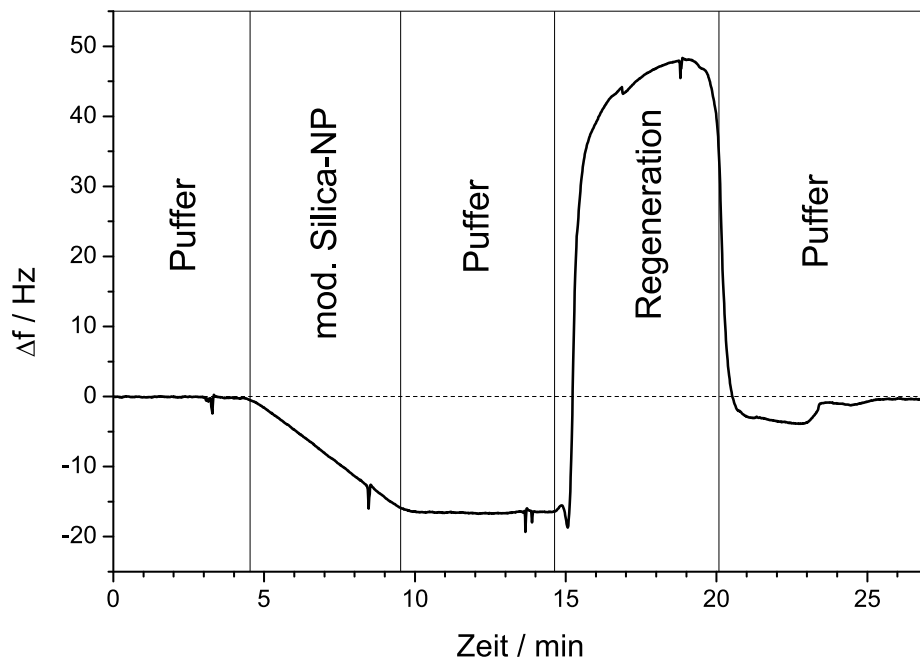


Abbildung 3.27.: Schema der Bindung von anti-2,4-D-AK-modifizierten Silica-Nanopartikeln mit anschließender Regenerierung mit 10 mM Natronlauge

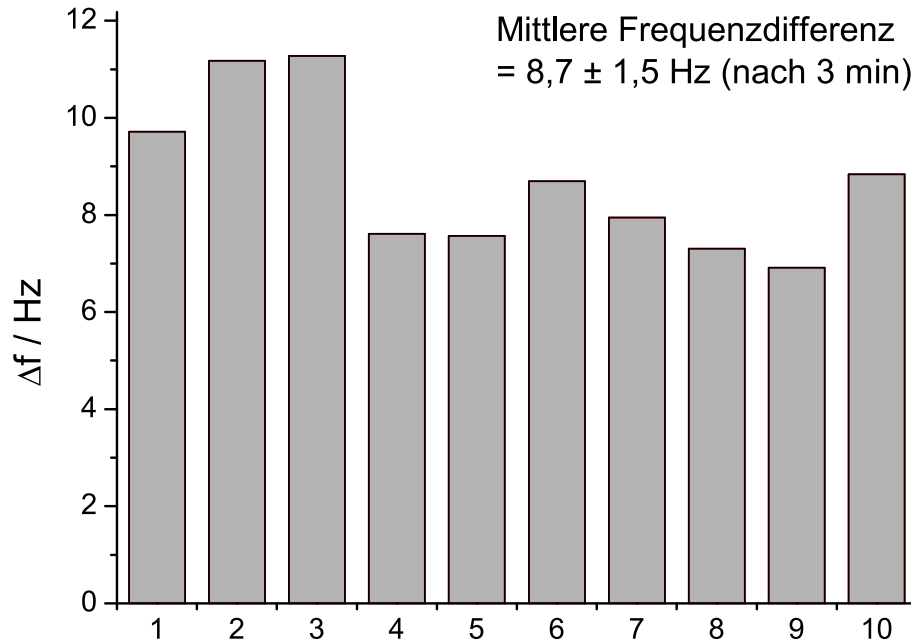


Abbildung 3.28.: Reproduzierbarkeit der Bindung von modifizierten Silica-Nanopartikeln an QCM-Sensoren mit 2,4-D; Regenerierung mit 10 mM NaOH

Allerdings greift die Natronlauge langfristig auch die QCM-Sensoren an (Quarz = SiO_2), so dass nach einer geeigneteren Regenerationsmethode gesucht werden musste. Die Wahl fiel letztendlich auf Guanidiniumthiocyanat, das im Wesentlichen zur Entfaltung der Antikörper führt und damit das Auswaschen der AK-modifizierten Nanopartikeln ermöglicht. Gleichzeitig hat die 3 M Guanidiniumlösung einen nahezu neutralen pH-Wert (geprüft per pH-Meter), so dass die Sensoren nicht beschädigt werden sollten.

Für die Konkurrenzexperimente mit 2,4-D wurden Antikörper-Silica-Nanopartikel-Konjugate in drei verschiedenen Kopplungsverhältnissen hergestellt. Über die Messung der Proteinkonzentration im Überstand nach der Kopplung wurde die Zahl der gebundenen Antikörper pro Silica-Nanopartikel bestimmt. Die Tabelle 3.5 gibt eine Übersicht über die erzielten Kopplungsverhältnisse. Wie erwartet bewirkt ein größerer Überschuss an Antikörpern während der Konjugationsreaktion auch ein höheres Kopplungsverhältnis von Antikörpern je Silica-Nanopartikel.

Tabelle 3.5.: Übersicht über die für die Kopplung eingesetzten Mengen an anti-2,4-D-Antikörper und die resultierenden Kopplungsverhältnisse an Antikörper je Silica-Nanopartikel

Molarer Überschuß	zur Kopplung eingesetzter Antikörper in μmol	% Antikörper gebunden an SNP	Verhältnis Antikörper : SNP
hoch	3,467	42,5%	18,9
mittel	1,733	58,1%	12,9
niedrig	0,347	38,4%	1,7

Tabelle 3.6.: Übersicht über die erreichte Verstärkung des QCM-Signals der Antikörperbindung durch die Kopplung an Silica-Nanopartikel im Vergleich zum Bindungssignal des freien anti-2,4-D-Antikörpers

Molarer Überschuß	Δf in Hz	Verstärkungsfaktor
hoch	39,7	6,5
mittel	19,2	4,6
niedrig	7,3	13,4

Vergleicht man die erhaltenen anti-2,4-D-modifizierten SNP in Hinblick auf ihre Bindung an 2,4-D-AChE mit den freien anti-2,4-D-Antikörpern, so fällt auf, dass die niedrig modifizierten SNP die größte Verstärkung erzielen (siehe Tabelle 3.6). Dies ist durch die Berechnung des Verstärkungsfaktors zu erklären. Bei rund zwei Antikörper-Molekülen je Nanopartikel (niedrig modifiziert) ist die Verstärkung des Massesignals je Antikörper-Bindungsstelle natürlich

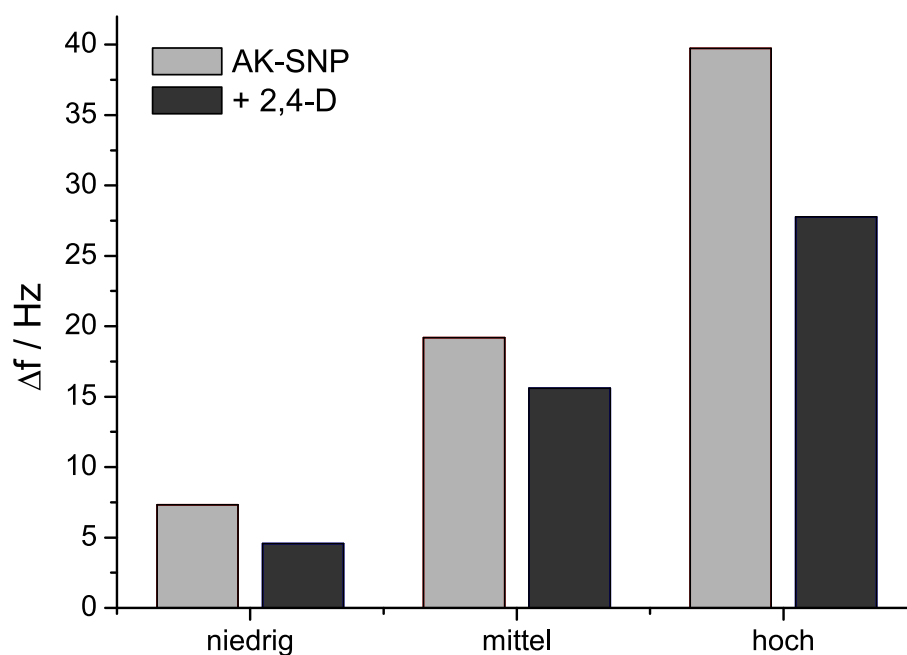


Abbildung 3.29.: Vergleich der Bindung der anti-2,4-D-AK-modifizierten Silica-Nanopartikel in Gegenwart (1 mM) und Abwesenheit von 2,4-D an den 2,4-D-modifizierten QCM-Sensor, Regeneration mit 3 M GuaSCN

höher als bei rund 20 Antikörper-Molekülen je SNP (hoch modifiziert). Dagegen verstärkt ein höherer Modifizierungsgrad das absolute Bindungssignal, das heisst die gemessene Frequenzdifferenz, deutlich gegenüber den niedrig modifizierten SNP, da bei letzteren die Orientierung des Antikörper-Nanopartikel-Konjugats einen hohen Einfluss auf die Bindungswahrscheinlichkeit hat.

In Abbildung 3.29 sind die Bindungssignale aus Tabelle 3.6 denen von anti-2,4-D-modifizierten Silica-Nanopartikeln in Gegenwart von 1 mM 2,4-D gegenüber gestellt. Mit der hohen Verstärkung des Antikörpersignals wird offensichtlich auch der Anteil der unspezifischen Antikörperbindung zu 2,4-D-AChE auf Propidium-modifizierten Sensoren verstärkt. Im Vergleich zum unmodifizierten anti-2,4-D-Antikörper (siehe Abbildung 3.16 auf Seite 44) konnte keine Verbesserung der Empfindlichkeit bei der Verwendung von 2,4-D-AChE als Erkennungselement festgestellt werden. Daher sollten auch andere Hapten-Antikörper-Paarungen untersucht werden.

3.3. Experimente mit Kokain als Hapten

3.3.1. Charakterisierung der BZE-AChE-Konjugate

Für die Synthese eines Konjugates aus BZE-DADDO und Acetylcholinesterase wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt. Da Kokain (Benzoyllecgoninmethylester) auch ein schwacher kompetitiver Inhibitor von Cholinesterasen ist [74, 176], besteht prinzipiell die Möglichkeit, dass BZE-DADDO – ein Kokainderivat – direkt oder nahe am aktiven Zentrum bindet. Daher wurde in einem zweiten Ansatz neben BZE-DADDO auch freies Kokain in zehnfachem Überschuss (bezogen auf die Stoffmenge an BZE-DADDO) hinzugegeben. Damit sollte eine Verdrängung des BZE-DADDO aus dem aktiven Zentrum gewährleistet werden.

Tabelle 3.7.: Vergleich der erhaltenen BZE-AChE-Konjugate; relative Sensorbeladung: normalisierte Frequenzdifferenz nach 5 min Injektion von $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ BZE-AChE

	Konjugat A	Konjugat B
Proteinkonzentration in $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	945	1335
Spezifische Aktivität (% urspr.)	2%	66%
Relative Sensorbeladung	100%	98,5%

Tabelle 3.7 fasst die Ergebnisse der Konjugatsynthese zusammen. Bei beiden Konjugaten konnte ein Großteil des eingesetzten Proteins nach der Synthese und Aufreinigung wiedergefunden werden. Der größte Unterschied offenbarte sich jedoch in der spezifischen Enzymaktivität der BZE-AChE-Konjugate. In Abwesenheit von Kokain sank die spezifische Aktivität auf 2% der Ausgangsaktivität. Wurde jedoch Kokain im Überschuss bei der Synthese zugegeben, blieben gut zwei Drittel der ursprünglichen Aktivität erhalten. Dies bestätigte die anfangs aufgestellte Hypothese, dass BZE-DADDO aufgrund seiner Eigenschaft als schwacher kompetitiver Inhibitor in der Nähe oder direkt im aktiven Zentrum (zunächst nicht-kovalent) binden kann. Befinden sich noch NHS-aktivierte Carboxylgruppen in räumlicher Nähe, so kann BZE-DADDO in dieser Position kovalent fixiert werden. In Folge dessen wird eine derart modifizierte AChE-Untereinheit nur sehr geringe bis gar keine enzymatische Aktivität aufweisen. Wie Konjugat B zeigt, kann eine solche Inaktivierung erfolgreich durch eine Zugabe von freiem Kokain während der Kopplung vermieden werden. In diesem Fall verdrängt das Kokain aufgrund seiner höheren Konzentration das BZE-DADDO aus dem aktiven Zentrum. Dadurch kommt es nicht zu einer kovalenten Modifizierung des aktiven Zentrums wie beim Konjugat A und die Aktivität der Cholinesterase bleibt weitestgehend erhalten. Trotz der unterschiedlichen Aktivität zeigen beide Konjugate bei der Verwendung im Fließsystem eine nahezu identische Affinität zum Propidium-modifizierten Sensor, das

heißt nach 5 min Injektion bei einer Proteinkonzentration von $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ erreichen beide BZE-AChE-Konjugate eine ähnliche Frequenzdifferenz. Weiterhin ergab die die elektrophoretische Auftrennung der Konjugate im SDS-Polyacrylamidgel, dass durch die EDC/NHS-Kopplung auch die Tertiärstruktur des AChE-Tetramer kovalent fixiert wird (Daten nicht gezeigt). Außerdem kommt es zur Verknüpfung der Tetramere zu Multimeren höherer Ordnung, die nicht mehr aus dem Sammelgel ins Trenngel wandern können.

3.3.2. Untersuchung der Bindungskinetik des anti-BZE-Antikörpers

Durch die Verwendung eines haptensierten Enzyms als Bindungsplattform für den anti-BZE-Antikörper sind deutlich weniger Bindungsstellen als zum Beispiel bei direkter Modifikation der Sensoroberfläche mit dem Antigen (siehe [72, 73]) vorhanden. Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Antikörperbindung wurden anti-BZE-Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen zu einer definierten BZE-AChE-Beladung des Propidium-modifizierten Sensors injiziert. Die Echtzeitbindungskurven wurden anschließend einer nicht-linearen Regression unterzogen, die die gewünschten Affinitätsparameter lieferte. Bei piezoelektrischen Experimenten kann analog zu SPR-Bindungsstudien [142] von folgender Reaktionsgleichung ausgegangen werden:



In Anlehnung an die Literatur zur Oberflächenplasmonresonanz wird hier die gleiche Nomenklatur verwendet. Der Ligand L ist auf dem Sensor immobilisiert. Der Analyt A stellt die mobile Komponente des Affinitätspaares dar. Das Verhältnis der beiden Geschwindigkeitskonstanten k_a (Assoziation) und k_d (Dissoziation) bestimmt nach dem Massenwirkungsgesetz (Gl. 3.11) die Gleichgewichtskonstante K_D .

$$K_D = \frac{[L] \cdot [A]}{[LA]} = \frac{k_d}{k_a} \quad (3.11)$$

Der Geschwindigkeitsansatz für die Bildung des Ligand-Analyt-Komplexes LA , das heißt des eigentlichen Messsignals, lautet wie folgt:

$$\frac{d[LA]}{dt} = k_a[L][A] - k_d[LA] \quad (3.12)$$

Aufgrund der Sauerbrey-Gleichung 1.2 kann eine Proportionalität zwischen Ligand-Analyt-Komplex und gemessener Frequenzdifferenz Δf vorausgesetzt werden. Nach Einsetzen, Umformen und Integration ergibt sich Gleichung 3.13. Die genaue Herleitung ist in der

Literatur beschrieben [185, 187].

$$\Delta f(t) = \frac{k_a \cdot c \cdot \Delta f_{max}}{k_a \cdot c + k_d} \cdot \left(1 - e^{-(k_a \cdot c + k_d)(t - t_0)}\right) \quad (3.13)$$

Dabei ist Δf_{max} die Frequenzdifferenz, die sich bei der Beladung aller verfügbaren Bindungsstellen auf dem Sensor ergibt. Die molare Konzentration des Analyten wird mit c bezeichnet. Zusätzlich wird der Parameter t_0 zur Bestimmung des Injektionszeitpunkts genutzt.

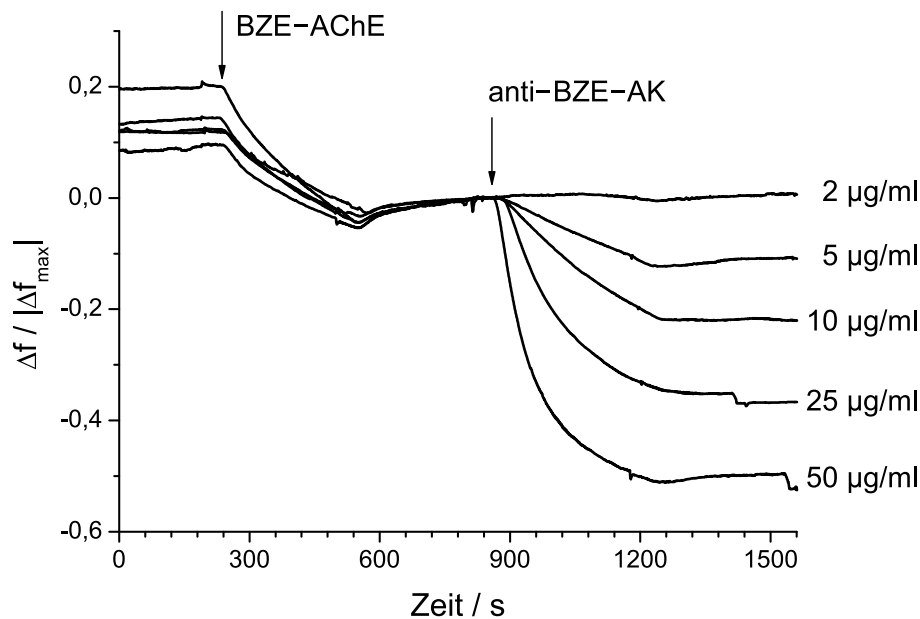


Abbildung 3.30.: Konzentrationsreihe des anti-BZE-Antikörpers für die Bestimmung der Affinitätskonstanten; Auftragung der normalisierten Frequenzdifferenz gegen die Zeit

Abbildung 3.30 zeigt die normalisierten Frequenzkurven für die Bindung der BZE-AChE an den Propidium-modifizierten QCM-Sensor und von anti-BZE-Antikörper an den BZE-AChE-bedeckten QCM-Sensor. Der Abschnitt mit der Bindung des anti-BZE-Antikörpers wurde einer nicht-linearen Regression nach Gleichung 3.13 unterzogen. Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten wurden über alle Werte der Konzentrationsreihe gemittelt und deren Standardabweichung bestimmt. Für die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_a ergab sich ein Wert von $(12911 \pm 1147) \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Die entsprechende Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_d wurde mit $(2,89 \cdot 10^{-3} \pm 1,49 \cdot 10^{-3}) \text{ s}^{-1}$ berechnet. Damit ergibt sich eine Gleichgewichtskonstante K_D von $2,239 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Tabelle 3.8 fasst diese Ergebnisse zusammen und zeigt einen Vergleich mit anderen Werten aus der Literatur. So wurde für die Bindung des anti-BZE-Antikörpers an BZE-DADOO-modifizierte QCM-Sensoren ein k_a von $17100 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [72] bzw. $22200 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [73] bestimmt. Diese Werte sind vergleichbar zu

Tabelle 3.8.: Vergleich der Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten des anti-BZE-Antikörpers am BZE-DADOO-Sensor, der EeAChE am Propidium-modifizierten Sensor und des anti-BZE-Antikörpers an BZE-AChE (auf dem Propidium-modifizierten Sensor)

	k_a ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
anti-BZE-AK + BZE-DADOO-Sensor [72]	17100	$1,05 \cdot 10^{-4}$	$6,14 \cdot 10^{-9}$
anti-BZE-AK + BZE-DADOO-Sensor [73]	22200	$9,60 \cdot 10^{-5}$	$4,32 \cdot 10^{-9}$
EeAChE + Propidium-Sensor [186]	12987	$3,52 \cdot 10^{-4}$	$2,71 \cdot 10^{-8}$
anti-BZE-AK + BZE-AChE (diese Arbeit)	12911	$2,89 \cdot 10^{-3}$	$2,24 \cdot 10^{-7}$

der hier errechneten Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_a . Allerdings unterscheiden sich die k_d -Werte aus der Literatur um den Faktor 30 von dem in dieser Arbeit bestimmten Wert.

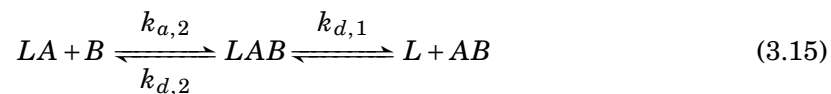
Dies kann verschiedene Gründe haben. Zum einen unterscheidet sich das angewendete Regressionsverfahren in [72] und [73] von dem hier verwendeten. Zum anderen ist zu diskutieren, in wie weit das verwendete Bindungsmodell den experimentellen Gegebenheiten entspricht.

In [72] und [73], sowie in vielen anderen Arbeiten [101, 118, 166], werden die kinetischen Parameter in zwei Schritten bestimmt. Zunächst wird Gleichung 3.13 durch Einführung der beiden Substitutionen k_{obs} und Δf_{Eq} vereinfacht.

$$\begin{aligned}
 k_{obs} &= k_a \cdot c + k_d \\
 \Delta f_{Eq} &= \frac{k_a \cdot c \cdot \Delta f_{max}}{k_{obs}} \\
 \Delta f(t) &= \Delta f_{Eq} \cdot (1 - e^{k_{obs}(t_0-t)})
 \end{aligned} \tag{3.14}$$

Die erhaltenen k_{obs} -Werte aus der nicht-linearen Kurvenanpassung mit Gleichung 3.14 werden anschließend gegen die Analytkonzentration aufgetragen. Nach einer zweiten, linearen Regression erhält man so die gewünschten Werte für k_a und k_d . Wie bereits in [185] und [187] diskutiert, hat dieses Verfahren zwei entscheidende Nachteile. Zum einen sind die beiden Parameter k_{obs} und Δf_{Eq} nicht von einander unabhängig, was eine der Grundvoraussetzungen für die nicht-lineare Regressionsanalyse ist [94]. Zum anderen birgt die Anwendung von zwei auf einander folgenden Regressionsverfahren eine zusätzliche Ungenauigkeit. So können unter Umständen k_d -Werte sehr nahe bei Null oder sogar negative Werte erhalten werden [73].

Als zweite Möglichkeit für die Abweichungen zu den Literaturwerten kann auch das verwendete Bindungsmodell diskutiert werden. Die in Gleichung 3.10 gezeigte Reaktion geht davon aus, dass der Ligand fest auf dem Sensor immobilisiert ist. Dies ist auch der Fall für die untersuchten Bindungsreaktionen in [72, 73, 186]. Das hier untersuchte System für die Antikörperbindung entspricht eher einem Modell verketteter Liganden [100]. Dabei bindet Propidium (den stationären Liganden L) zunächst die BZE-AChE (A); diese fungiert wiederum als Binder für den anti-BZE-Antikörper (B). Beim Zerfall des ternären Komplexes LAB müssen daher beide Interaktionspaare – $L \leftrightarrow A$ sowie $A \leftrightarrow B$ – berücksichtigt werden.



Da keine freie BZE-AChE im Pufferstrom vorhanden ist, kann man die Assoziation der BZE-AChE am Propidium für den Geschwindigkeitsansatz der Bildung des LAB -Komplexes vernachlässigen und muss nur die Dissoziation berücksichtigen.

$$\begin{aligned} \frac{d[LAB]}{dt} &= k_{a,2}[LA][B] - k_{d,2}[LAB] - k_{d,1}[LAB] \\ &= k_{a,2}[LA][B] - (k_{d,2} + k_{d,1})[LAB] \end{aligned} \quad (3.16)$$

In diesem Fall kann der beobachtete k_d -Wert als Summe zweier unterschiedlicher k_d -Werte verstanden werden: $k_{d,beob} = k_{d,2} + k_{d,1}$.¹ In der Tat ist der erhaltene k_d -Wert deutlich größer als die bereits für die einzelnen Bindungsreaktionen bestimmten Werte [73, 186]. Beide Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten bei der nicht-linearen Regression zu bestimmen, ist schwierig, da das Verhältnis der beiden zunächst ebenfalls unbekannt ist. Nur wenn eine der beiden Dissoziationsgeschwindigkeiten deutlich größer als die andere ist, lässt sich diese durch die beobachtete Konstanten $k_{d,beob}$ annähern [100]. Da dies hier nicht möglich war (siehe k_d -Werte in Tabelle 3.8), wurde diese komplexe Dissoziation nicht berücksichtigt.

3.3.3. Kompetitiver Immunoassay mit Kokain und BZE-AChE

Der kompetitive Immunoassay im Fließsystem mit Kokain wurde für beide BZE-AChE-Konjugate durchgeführt. Dabei wurde eine feste Konzentration des anti-BZE-Antikörpers von $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ gewählt (siehe S. 90). Da in diesem Fall die Antikörper-Konzentration zu niedrig ist, um das Gleichgewicht schnell zu erreichen, wurde der Anstieg der Bindungskurven berechnet. Dieser kann nach Edwards [52] und Piehler [144] als Indikator für die Konzentration an

1. Selbst dieser Fall ist noch stark vereinfacht, da durch die Dissoziation der BZE-AChE vom Propidium auch ein Masseverlust und eine Abnahme von Bindungsstellen für den Antikörper einhergeht. Das Gleichungssystem, das sich daraus ergibt, lässt sich allerdings nur noch numerisch und nicht analytisch lösen [95].

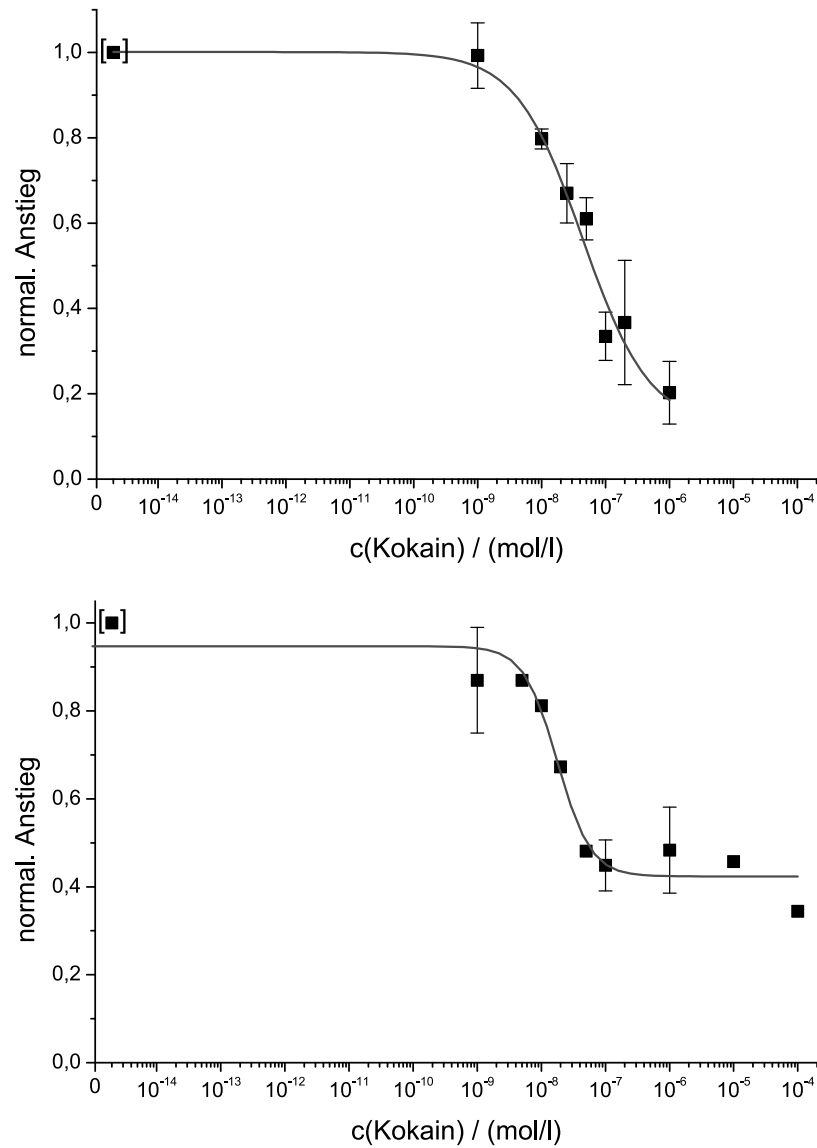


Abbildung 3.31.: Kompetitiver Immunoassay mit BZE-AChE-Konjugat A (oben) und B (unten); Kokain in unterschiedlichen Konzentrationen; der Datenpunkt in eckigen Klammern repräsentiert den Nullwert

freiem Antikörper herangezogen werden. Zur Verbesserung der Präzision von Tag zu Tag (*interday precision*) wurden die Werte einer Meßreihe auf den Nullwert (Antikörper ohne Kokain) normalisiert.

Tabelle 3.9.: Daten vom logistischen Fit für die Konkurrenz von BZE-ACHE mit Kokain um die Bindungsstellen des anti-BZE-Antikörpers; Fitkurven in Abb. 3.31

Parameter	Konjugat A		Konjugat B	
χ^2	1,14728		0,31437	
R^2	0,96835		0,96106	
A_1	1,00092	$\pm 0,06216$	0,94712	$\pm 0,07558$
A_2	0,12584	$\pm 0,11798$	0,42365	$\pm 0,05217$
IC_{50}	$4,40 \cdot 10^{-8}$	$\pm 1,9 \cdot 10^{-9}$	$1,77 \cdot 10^{-8}$	$\pm 8,5 \cdot 10^{-9}$

Die Ergebnisse auf Basis der beiden BZE-AChE-Konjugate sind in Abbildung 3.31 gezeigt. Die entsprechenden Parameter für den logistischen Fit sind in Tabelle 3.9 zusammengefasst. Beide Konjugate zeigen einen ähnlichen Testmittelpunkt: $IC_{50} = 4,40 \cdot 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ für Konjugat A bzw. $IC_{50} = 1,77 \cdot 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ für Konjugat B. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit zuvor publizierten Assays. Halamek u. a. [73] benutzten mit BZE-DADDO-MUA beschichtete Piezosensoren. In diesem Fall wurde zwar ein ähnlicher Testmittelpunkt $IC_{50} \approx 1 \cdot 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, aber eine geringere untere Nachweisgrenze von $10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ erreicht. Die Ursache dafür liegt vermutlich in der deutlich höheren Ligandendichte aufgrund der direkten Modifizierung der Quarzsensoren mit BZE-DADDO. Ein ähnlich niedriger LOD-Wert ($0,38 \cdot 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) wurde von Bauer u. a. [17] publiziert. Dazu wurde BZE-DADDO in einer Affinitäts-Chromatographie-Säule immobilisiert. Die Detektion erfolgte elektrochemisch mit Alkalischer Phosphatase und Tyrosinase als Verstärkersystem.

Trotz des ähnlichen Testmittelpunkts unterscheiden sich beide Assays deutlich in der Höhe der nicht-spezifischen Bindung. Diese erreicht im Falle des BZE-AChE-Konjugats B ca. 40%. Die Ursache dafür liegt höchstwahrscheinlich in einer zunehmenden Verschlechterung der Qualität der Oberflächenmodifikation im Laufe der Experimente. Die Propidium-modifizierten Sensoren sind bei Benutzung von Pepsin bei pH 2 als Regenerationsreagens sehr stabil und für 40 – 50 Messungen geeignet [185, 186]. Für die Immunoassays mit Kokain wurde mit einem Sensor gearbeitet, der zwischenzeitlich auch für elektrochemische Messungen genutzt wurde, so dass hier offensichtlich die Grenzen der reproduzierbaren Nutzbarkeit erreicht wurden.

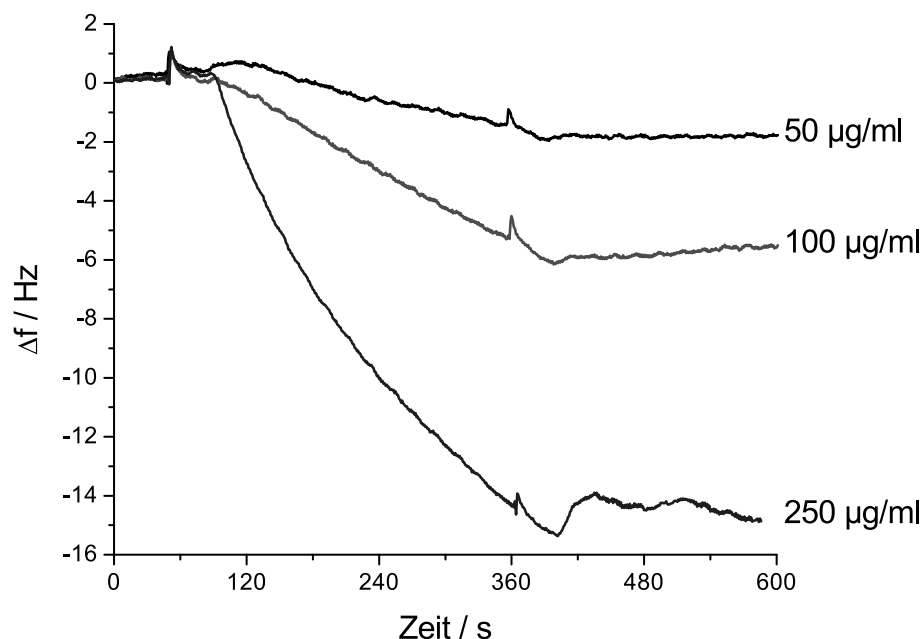


Abbildung 3.32.: Wechselwirkung zwischen huBChE und der immobilisierten BZE-AChE; Injektion verschiedener Konzentrationen an huBChE

3.4. Test weiterer Erkennungselemente

3.4.1. Bindung von Butyrylcholinesterase an BZE-AChE

Das in der Natur vorkommende Isomer (-)-Kokain ist auch ein Substrat der Butyrylcholinesterase. Aufgrund der vergleichsweise niedrigen Umsatzgeschwindigkeit ($k_{\text{cat}} = 3,9 \text{ min}^{-1}$ [208]) und einer moderaten Affinität ($K_M = 14 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ [208], $K_i = 5,4 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ [18]) wurde humane BChE bereits in Sensoren mit Kokain als Erkennungselement genutzt [74, 101]. Daher sollte untersucht werden, ob die BChE auch an die mit dem Kokain-Derivat modifizierte AChE bindet. Abbildung 3.32 zeigt das Bindungsverhalten unterschiedlicher Konzentrationen an BChE, die mit der vorimmobilisierten BZE-AChE interagieren. Man sieht, dass die erhaltene Frequenzdifferenz zwar konzentrationsabhängig, aber doch deutlich geringer im Vergleich zur Bindung des anti-BZE-Antikörpers ist. Die Ursache hierfür ist vor allem in der im Vergleich zum Antikörper geringen Affinität der BChE zum Kokain und in der relativ geringen Ligandendichte zu suchen.

Auf Grundlage der Sauerbrey-Gleichung (Gl. 1.2 nach Sauerbrey [158]) ist es möglich, die Anzahl der auf der Oberfläche gebundenen Moleküle zu berechnen. Für die verwendeten 10 MHz-Kristalle ergibt sich nach Gleichung 1.3 (siehe S. 14) eine Empfindlichkeit von

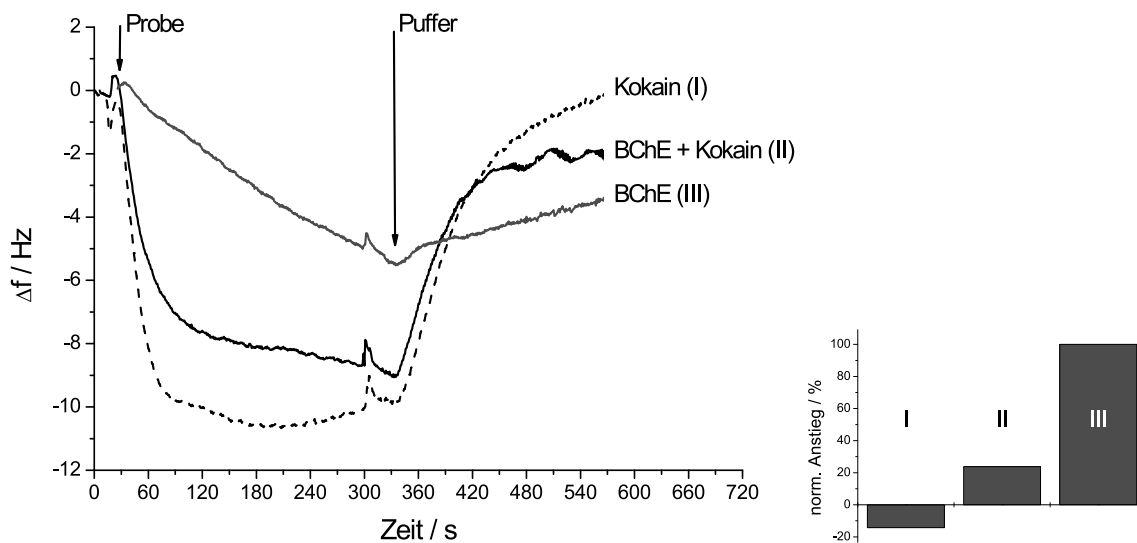


Abbildung 3.33.: Blockierung der Affinitätsbindung der huBChE an der BZE-ACHE durch einen Überschuss an Kokain;
 Links: Injektion von $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ huBChE in Abwesenheit und in Gegenwart von 1 mM Kokain (durchgezogene Linien), Sensorantwort auf die Injektion von 1 mM Kokain (gestrichelte Linie);
 Rechts: Vergleich des Frequenzanstiegs von 120 s bis 320 s, normalisiert auf den Anstieg bei freier huBChE

$0,86 \text{ ng/Hz}$. Unter Berücksichtigung der entsprechenden Molmassen der bindenden Proteine ergeben sich folgende molare Verhältnisse: $3,6 \text{ fmol/Hz}$ für die BZE-AChE, $2,4 \text{ fmol/Hz}$ für die huBChE und $5,7 \text{ fmol/Hz}$ für den anti-BZE-Antikörper. Daraus ergibt sich für die aufeinanderfolgende Injektion von $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ BZE-AChE und $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ huBChE ein Bindungsverhältnis von einem BChE-Tetramer zu fünf immobilisierten BZE-AChE-Tetrameren. Überträgt man diese Rechnung auf die Antikörper-Bindungsstudien (Abb. 3.30 auf Seite 59), so ergeben sich deutlich andere Verhältnisse. Bei der Injektion des Antikörpers in Konzentrationen von 10, 25 bzw. $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ binden ca. ein, zwei bzw. drei anti-BZE-Antikörper pro BZE-AChE-Tetramer. Dieser Vergleich unterstreicht nochmals den deutlichen Affinitätsunterschied zwischen BChE und Antikörper.

Zum Nachweis der Spezifität der Bindung der Butyrylcholinesterase an BZE-AChE wurde versucht, die Wechselwirkung zwischen den beiden Bindungspartnern durch einen Überschuss an Kokain zu blockieren. Die Ergebnisse dazu sind in Abbildung 3.33 dargestellt. Es wird deutlich, dass nach einer 30 minütigen Vorinkubation mit 1 mM Kokain die Bindung der BChE an die BZE-AChE nahezu vollständig unterbunden ist. Der schnelle Frequenzabfall am Anfang der Injektion ist als Viskositätsänderung vom Phosphatpuffer hin zur relativ

hoch konzentrierten Kokain-Lösung zu deuten. In der Tat verursacht auch die Injektion einer 1 mM Kokain-Lösung ohne BChE einen ähnlichen Frequenzabfall. Das Plateau, das in Gegenwart von 1 mM Kokain erreicht wird, ist in Kombination mit BChE deutlich kleiner als bei der reinen Kokain-Probe. Da Kokain ein kompetitiver Inhibitor der BChE ist und ebenso wie Cholinester durch die BChE hydrolysiert wird [177], kann während der 30-minütigen Inkubationszeit bereits ein Teil des Kokains durch die BChE umgesetzt werden. Dadurch sinkt die effektive Kokain-Konzentration in der Probe und damit auch die Viskosität der Lösung, so dass ein geringeres Signalplateau erreicht wird [96]. Der für die Spezifität der BChE-Wechselwirkung wesentliche Unterschied zwischen den Kurven ist daher in dem Anstieg der Kurven im Bereich von 120 s bis 300 s zu suchen. Hier zeigt sich, dass der durch die Bindung der BChE verursachte Anstieg in Abwesenheit von Kokain deutlich steiler als in Gegenwart von 1 mM Kokain ist (siehe Abb. 3.33, rechts). Bei Injektion der Probe, die ausschließlich Kokain enthält, lässt sich kaum ein Anstieg der Kurve im Bereich von 120 s bis 300 s messen.

Auf der einen Seite bestätigen diese Ergebnisse die Spezifität der Bindung der BChE an die BZE-AChE. Damit konnte erfolgreich die Kombination mehrere molekularer Erkennungselemente demonstriert werden. Die Propidium-Plattform ermöglicht den Aufbau einer Architektur aus verschiedenen Cholinesterasen, die über unterschiedliche Bindungsstellen wechselwirken. Sowohl freie als auch BZE-modifizierte AChE können über die Affinität zum Propidium auf dem QCM-Sensor immobilisiert werden. Mit Kokain als Substrat der Butyrylcholinesterase kann Benzoyllecgonin nicht nur als Epitop für die Bindung eines Antikörpers, sondern auch als Erkennungselement für die BChE genutzt werden. Auf der anderen Seite erschwert die geringe Affinität der BChE im Gegensatz zum anti-BZE-Antikörper den Einsatz dieses Systems für analytische Zwecke. Durch die Verwendung anderer Ligand-Enzym-Kombinationen lässt sich das in dieser Arbeit vorgestellte Konzept noch weiter ausbauen und ermöglicht damit die Entwicklung von „einfachen“ molekularen Erkennungselementen (MRE) hin zu „multifunktionellen“ Erkennungselementensystemen.

4. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird die Entwicklung eines bifunktionellen Biosensors nach dem Vorbild eines Baukastensystems beschrieben. Das Ziel wird durch die Kombination verschiedenster molekularer Erkennungselemente erreicht. Solche molekularen Erkennungselemente im verwendeten System sind:

- Propidium und die periphere anionische Bindungsstelle der Acetylcholinesterase (AChE)
- Organophosphate und das aktive Zentrum der AChE
- ein an die AChE gekoppeltes Hapten und das Epitop eines Antikörpers
- ein an die AChE gekoppeltes Hapten, das als Ligand ein weiteres Enzym bindet

Neben dem molekularen Erkennungselement wird ein Biosensor ebenso durch die Art des Transducers charakterisiert. Hier werden Quarzplättchen mit Goldelektroden zur Signalumwandlung eingesetzt. Die Verwendung solcher Sensoren mit einem EQCM-Gerät (*electrochemical quartz crystal microbalance*) ermöglicht es zwei Messsignale gleichzeitig aufzunehmen: die piezoelektrische Bestimmung einer Massebeladung und die amperometrische Detektion von Enzymaktivität auf der Sensoroberfläche.

Für die Analytik stehen somit zwei verschiedene Assay-Varianten zur Verfügung: die Bestimmung der Inhibition der AChE-Aktivität und ein Bindungstest über des Hapten. Die Basis beider Tests ist die Modifizierung der piezoelektrischen Kristalle mit Propidium – einem reversiblen Inhibitor der Acetylcholinesterase. Dies ermöglicht die Beladung des Sensors mit AChE über die Wechselwirkung mit der peripheren anionischen Bindungsstelle des Enzyms. Die Aktivität der so immobilisierten AChE und die Inhibition durch Organophosphate (Pestizide) werden amperometrisch bestimmt. Durch die chemische Kopplung eines Haptens an die Cholinesterase wird ein weiteres Erkennungselement eingeführt. Das eröffnet die Möglichkeit, an die auf dem Propidium-modifizierten Sensor immobilisierte, haptenisierte Cholinesterase einen Antikörper zu binden.

Als Voraussetzung für elektrochemische Bestimmung der AChE-Aktivität wurde zunächst die Optimierung der amperometrischen Messmethode vorgenommen. Die Oxidationspotentiale

für die Detektion von Thiocholin wurden im Bereich von 150 mV bis 300 mV variiert. Dabei wurde für die nachfolgenden Untersuchungen ein Arbeitspotential von 200 mV (vs. Ag/AgCl) festgelegt, da hier das beste Verhältnis von gemessenem Oxidationsstrom und Langzeitstabilität der Propidium-modifizierten Sensoren erzielt wurde. Dieses Potential war deutlich geringer als die bisher publizierten Mediator-freien AChE-Biosensoren.

Es wurde ein Vergleich verschiedener Organophosphate über ihre Inhibitionskonstanten durchgeführt, um diejenigen herauszufinden, die möglichst schnell mit dem aktiven Zentrum der Acetylcholinesterase reagieren. Das verwendete Messsystem beruht nicht auf der Vorinkubation der AChE und damit einer Einstellung des Inhibitionsgleichgewichts. Stattdessen wurde die Inhibition der AChE direkt im Fließsystem verfolgt. Daher war eine schnelle Inhibitionskinetik für einen empfindlichen Organophosphat-Nachweis erforderlich. Da einige Inhibitoren nur als Phosphothionate vorlagen, wurde die Überführung dieser Substanzen in die entsprechenden Oxo-Formen mittels *N*-Bromsuccinimid untersucht. Die NBS-Aktivierung wurde erfolgreich durchgeführt, die erwartete Inhibitionsstärke konnte jedoch aufgrund hydrolytischer Vorgänge nicht erreicht werden. Untersuchungen mit Diisopropylfluorophosphat (DFP) und Chlorpyrifos-oxon (CPO) konnten die Voruntersuchungen über die Inhibitionskinetik in Bezug auf die erreichten Nachweisgrenzen von $2 \cdot 10^{-6}$ M für DFP und $5 \cdot 10^{-8}$ M für CPO bestätigen.

Für die chemische Modifizierung der Acetylcholinesterase wurde zunächst 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) als Hapten ausgewählt. 2,4-D wird als Herbizid eingesetzt und in der EU über die Gewässerschutzrichtlinie reguliert. 2,4-D konnte in unterschiedlichen molaren Verhältnissen von 2,6 : 1 bis 260 : 1 (2,4-D : AChE) nach Aktivierung mit einem Norbornendicarboximido-Derivat an die AChE gekoppelt werden. Dabei konnte die spezifische Aktivität der Acetylcholinesterase erhalten und die Bindung eines anti-2,4-D-Antikörpers ermöglicht werden. Zur Verstärkung des piezoelektrischen Signals der Antikörperbindung wurden die Immunglobuline zunächst an Goldnanopartikel gekoppelt. Damit konnte eine Verstärkung um den Faktor 10 erreicht werden. Allerdings waren die Antikörper-modifizierten Goldnanopartikel nicht langzeitstabil. Daher wurden auch Silica-Nanopartikel als Matrix für die Antikörperkopplung getestet. Mit diesem System konnte eine Verstärkung um den Faktor von 5 bis 13 je nach Grad der Beladung des Nanopartikel mit Antikörper bestimmt werden. Die hohe unspezifische Bindung der Antikörper-Nanopartikel-Konjugate an den Propidium-modifizierten QCM-Sensor konnten keinen empfindlichen 2,4-D-Nachweis ermöglichen.

Als Alternative wurde Kokain (Benzoylcegonin, BZE) als Hapten an die Acetylcholinesterase gekoppelt. Da Kokain selbst auch als Inhibitor im aktiven Zentrum der AChE binden kann, wurden zwei verschiedene Strategien zur Konjugatsynthese verfolgt. Durch Zugabe von Kokain während der Kopplung sollte die kovalente Fixierung des Kokain-Derivats BZE-DADDO

im aktiven Zentrum verhindert werden (Konjugat B). In der Tat konnten mit dieser Synthesestrategie 67% der spezifischen Cholinesterase-Aktivität erhalten werden, während im Kokain-freien Ansatz (Konjugat A) nur 2% der Ausgangsaktivität wiedergefunden wurden.

Das BZE-AChE-Konjugat ermöglichte auch die Untersuchung der Bindungskinetik der anti-BZE-Antikörper. Dabei konnte eine Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_a von $12911 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ berechnet werden. Dieser Wert ist trotz der vergleichsweise geringen Oberflächenbeladung vergleichbar mit den in der Literatur angegebenen Werten. Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante ist mit $2,89 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ um den Faktor 30 höher als der Literaturwert. Diese Abweichung ist auf Unterschiede im Bindungsmodell zurückzuführen. Mit beiden BZE-AChE-Konjugaten konnte ein kompetitiver Immunoassay mit Kokain im Fließsystem durchgeführt werden. Dabei zeigte sich für beide Konjugate ein ähnlicher Testmittelpunkt: $\text{IC}_{50} = 4,40 \cdot 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ für Konjugat A bzw. $\text{IC}_{50} = 1,77 \cdot 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ für Konjugat B. Diese Werte sind vergleichbar zu bereits publizierten Kokainassays im Fließsystem.

Wie vorstehend beschrieben, bindet Kokain als Inhibitor auch im aktiven Zentrum von Cholinesterasen. Diese Eigenschaft wurde genutzt, um ein zweites Enzym – Butyrylcholinesterase (BChE) – an die BZE-AChE zu binden. Die Spezifität dieser Bindung konnte durch die Abwesenheit einer Affinität der BChE zum Propidium und durch die Blockierbarkeit der Bindung von BChE und BZE-AChE durch Kokain nachgewiesen werden.

Damit konnte erfolgreich die Kombination mehrere molekularer Erkennungselemente demonstriert werden. Die Propidium-Plattform ermöglicht den Aufbau einer Architektur aus verschiedenen Cholinesterases, die über unterschiedliche Bindungsstellen wechselwirken. Sowohl freie als auch BZE-modifizierte AChE können über die Affinität zum Propidium auf dem EQCM-Sensor immobilisiert werden. Mit Kokain als Substrat der Butyrylcholinesterase kann Benzoyllecgonin nicht nur als Epitop für die Bindung eines Antikörpers, sondern auch als Erkennungselement für die BChE genutzt werden. Auf der anderen Seite erschwert die geringe Affinität der BChE im Gegensatz zum anti-BZE-Antikörper den Einsatz dieses Systems für analytische Zwecke. Durch die Verwendung anderer Ligand-Enzym-Kombinationen lässt sich das in dieser Arbeit vorgestellte Konzept noch weiter ausbauen und ermöglicht damit eine Entwicklung ausgehend von „einfachen“ molekularen Erkennungselementen (MRE) hin zu „multifunktionellen“ Erkennungselementensystemen. In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass der Aufbau solch komplexer Systeme möglich ist, ohne Abstriche in Bezug auf die Empfindlichkeit der einzelnen Assays hinzunehmen.

5. Experimenteller Teil

5.1. Enzyme & Antikörper

In dieser Arbeit wurden sowohl verschiedene kommerziell verfügbare Enzyme und Antikörper, als auch einige rekombinate Cholinesterasen anderer Arbeitsgruppen eingesetzt.

HuBChE: humane Butyrylcholinesterase, ein tetrameres Enzym mit einem Molekulargewicht von 360 kD; Produkt der Firma Roche, Mannheim, Deutschland

EeAChE: Acetylcholinesterase des Zitteraals *Electrophorus electricus*, ein tetrameres Enzym mit einem Molekulargewicht von 240 kD; Produkt der Firma Fluka, Buchs/Schweiz

anti-2,4-D-AK: monoklonaler Antikörper gegen 2,4-D; Milzzellen von mit 2,4-D-BSA immunisierten Mäusen wurden mit Myelomzellen fusioniert. Der hier verwendete Antikörper wurden vom Hybridomklon E2/G2 sezerniert. Franek u. a. [62] haben für diesen AK einen IC_{50} von 2,0 ng/ml 2,4-D ($\cong 9,05$ nM) in ELISA-Experimenten bestimmt.

Dieser Antikörper wurde uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. M. Franek vom Veterinärforschungsinstitut Brno, Tschechische Republik zur Verfügung gestellt.

anti-BZE-AK: polyklonaler Antikörper gegen Kokain (Benzoyllecgoninmethylester); der Schafantikörper wurden mit Ammoniumsulfat gefällt und anschließend mittels Ionenaustausch-Chromatographie gereinigt. Eine apparente Affinität K_A von $3,9 \cdot 10^9$ l·mol⁻¹ wurde mittels BIACORE bestimmt (Daten von Boehringer-Mannheim laut [54]). Die Antikörperpräparation wurde von der Fa. Boehringer-Mannheim zur Verfügung gestellt.

anti-Maus-IgG-AK: polyklonaler Ziegen-Antikörper gegen den Fc-Teil von Maus-IgG; Freier Antikörper (M8642) und Antikörper-Peroxidase-Konjugat (A2554) wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen.

POD: Meerrettich-Peroxidase, Reinheitszahl 3,5, Sigma-Aldrich

5.2. Chemikalien

Substanz	Hersteller
Aceton (Seccosolv)	Merck, Darmstadt
Acetylthiocholiniodid	Fluka, Buchs
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Ameisensäure	Roth, Karlsruhe
Aminoperoxosulfat	Roth, Karlsruhe
Ammoniummolybdat	Merck, Darmstadt
Ascorbinsäure	Fluka, Buchs
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Borsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA	Boehringer, Mannheim
BSA-Standard (Bradford)	Pierce, Rockford
BZE-DADDO	Boehringer, Mannheim
Butyrylthiocholiniodid	Fluka, Buchs
Chlorpyriphos	Riedel-de Haën, Seelze
Chlorpyriphos-oxon	Dr. Ehrenstorfer GmbH
Citronensäure	Chemapol, Prag
Coomassie-Brilliantblau	Pierce, Rockford
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
DTNB	Fluka, Buchs
DMF	Fluka, Buchs
EDC	Fluka, Buchs
Essigsäure	Fluka, Buchs
Ethanol (96%)	Merck, Darmstadt
Goldnanopartikel (\varnothing 20 nm)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Serva, Heidelberg
Guanidinthiocyanat	Fluka, Buchs
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kokainhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Roth, Karlsruhe
11-Mercaptoundecanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
11-Mercaptoundecansäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Morpholinoethansulfonsäure	Sigma-Aldrich
Natriumcarbonat	Riedel-de Haën, Seelze

Substanz	Hersteller
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
<i>N</i> -Bromsuccinimid	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>N</i> -Hydroxysuccinimid	Fluka, Buchs
<i>N</i> -Methylmorpholin	Fluka, Buchs
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin	Serva, Heidelberg
<i>p</i> -Aminothiophenol	Fluka, Buchs
Pepsin (aus Schweinemagen)	Fluka, Buchs
Phosphorsäure (85%)	Merck, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteinstandard (<i>Electrophoresis Calibration Kit for low molecular weight proteins</i>)	Pharmacia, Freiburg
Salzsäure (rauchend, 37%)	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure (2 M)	Roth, Karlsruhe
sicastar [®] COOH-terminierte Silica-Nanopartikel (∅ 80 nm)	micromod, Rostock
Terbufos	Riedel-de Haën, Seelze
TMB	Merck, Darmstadt
TNTU	Calbiochem, San Diego
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasserstoffperoxidlösung (30%)	Merck, Darmstadt
L-(+)-Weinsäure	Fluka, Buchs

Alle Chemikalien wurden in der höchsten verfügbaren Reinheit bezogen und wurden, sofern nicht anders beschrieben, verwendet wie geliefert.

5.3. Puffer

Zur Herstellung der Puffer und in allen weiteren Experimenten wurde (sofern nicht anders angegeben) doppelt deionisiertes Wasser verwendet.

40 mM Britton-Robinson-I-Puffer pH 8,0: je 40 mM Essigsäure, Borsäure, Phosphorsäure, mit 1 M Natronlauge eingestellt

50 mM Phosphatpuffer nach Sørensen pH 7,5: Kaliumdihydrogenphosphat und Natriumhydrogenphosphat-dihydrat, je 50 mM und durch Zusammengeben auf den pH-Wert von 7,5 eingestellt

50 und 100 mM Carbonatpuffer pH 9,0: Natriumhydrogencarbonat und Natriumcarbonat jeweils in der benötigten Konzentration angesetzt und durch Zusammengeben auf den pH-Wert von 9,0 eingestellt

ELISA-Waschpuffer: 40 mM Natriumdihydrogenphosphat, 0,85% Natriumchlorid, 0,05% Tween 20, auf pH 7,2 mit Natronlauge eingestellt

PBS: 40 mM Natriumdihydrogenphosphat, 0,85% Natriumchlorid, auf pH 7,2 mit Natronlauge eingestellt

0,5 M MES-Puffer pH 5,5 und 0,1 M MES-Puffer pH 6,6: 2-Morpholinoethansulfonsäure-monohydrat (MES) mit Natriumcarbonat der gleichen Konzentration auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt

Citronensäure-Phosphat-Puffer nach McIlloine pH 4,4: 200 mM Citronensäure mit 400 mM Natriumdihydrogenphosphat auf pH 4,4 eingestellt

1 M Tris/HCl pH 6,8 und pH 8,7: 12,1 g Tris in 80 ml lösen, mit Salzsäure auf den erforderlichen pH einstellen und mit Wasser auf 100 ml ergänzen

Probenpuffer: 0,23 g SDS, 100 µl 1 % Bromphenolblau, 500 µl 2-Mercaptoethanol, 625 µl 1 M Tris/HCl pH 6,8 und 1 ml Glycerin gemischt und mit Wasser auf 10 ml ergänzt

Laufpuffer: 1 g SDS, 3 g Tris und 14,4 g Glycin mit Wasser auf 1 l ergänzt

Entfärber: 100 ml Methanol und 70 ml Essigsäure mit Wasser auf 1 l ergänzt

Trocknungslösung: 250 ml Methanol, 40 ml Glycerin und 710 ml Wasser vermischt

5.4. Standardmethoden

5.4.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford [23] erfolgte auf der Grundlage eines Protein-Farbstoff-Komplexes. Dazu wurde aus einer BSA-Standardlösung eine Konzentrationsreihe von 2,5, 5, 10, 15 und 20 µg/ml in 0,9% NaCl hergestellt. Die Cholinesteraseproben wurden ebenfalls in 0,9% NaCl verdünnt. In Mikrotiterplatten wurden je 150 µl der Standardverdünnung oder Probe mit 150 µl Coomassie-Brilliantblau gemischt. Von allen Standards

und Proben wurden Dreifachbestimmungen gemacht. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Absorption bei 595 nm mit dem Mikrotiterplatten-Readers Genios (Fa. Tecan, Crailsheim) bestimmt. Aus den Werten der Standardreihe wurde die Proteinkonzentration der Proben errechnet.

5.4.2. Cholinesterase-Aktivitätsbestimmung nach Ellman

Die Bestimmung der Cholinesteraseaktivität orientierte sich an der von Ellman u. a. [53] beschriebenen Methode. Dazu wurde die Cholinesteraseprobe mit Britton-Robinson-I-Puffer pH 8,0 entsprechend der erwarteten Aktivität verdünnt. In den Mikrotiterplattenwells wurden 210 μl 40 mM Britton-Robinson-I-Puffer pH 8,0 vorgelegt. Dazu wurden 30 μl einer 25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DTNB-Lösung und 30 μl der vorverdünnten Cholinesteraseprobe gegeben. Die Messung wurde durch die Zugabe von 30 μl einer 30 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Acetylthiocholiniodidlösung (bzw. Butyrylthiocholiniodid für BChE) gestartet. Die Bildung des Farbstoffs, d.h. des reduzierten TNB^- aus 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (Reaktion siehe Abb. 5.1), wurde in einem Mikrotiterplattenreader gemessen. Aus dem Anstieg der Absorption bei 412 nm über 10 min wurde die katalytische Aktivität berechnet (Gleichungen 5.1 und 5.2). Als Maß für die katalytische Aktivität gilt die *Unit*. Eine Unit entspricht der Zahl an Cholinesterasemolekülen, die notwendig ist, um 1 μmol Acetyl- bzw. Butyrylcholin pro Minute zu hydrolysieren. In der Tabelle 5.2 sind die verwendeten Faktoren erklärt und deren Standardwerte aufgelistet.

$$\text{Volumenaktivität: } EA[U/ml] = \frac{\Delta A/min \cdot \text{Verdünnung} \cdot V_{\text{Well}}}{\epsilon(\text{TNB}^-) \cdot d \cdot \text{Verstärkung} \cdot V_{\text{Probe}}} \quad (5.1)$$

$$\text{SpezifischeAktivität: } EA[U/mg] = \frac{\Delta A/min \cdot \text{Verdünnung} \cdot V_{\text{Well}}}{\epsilon(\text{TNB}^-) \cdot d \cdot \text{Verstärkung} \cdot V_{\text{Probe}} \cdot c_{\text{Probe}}(\text{Protein})} \quad (5.2)$$

Tabelle 5.2.: Faktoren und deren Standardwerte für die Berechnung der Enzymaktivität

Variable	Erläuterung	Standardwert
$\Delta A/min$	Anstieg der Absorption (berechnet durch die Auswertesoftware)	–
<i>Verdünnung</i>	Faktor der Vorverdünnung der Probe	10 – 10000
V_{Well}	Gesamtvolumen des Reaktionsgemisches in der Kavität	300 μl
V_{Probe}	Zupipettiertes Probenvolumen	30 μl
$\epsilon(\text{TNB}^-)$	Extinktionskoeffizient des reduzierten Farbstoffs	13,6 $\text{ml}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
<i>Verstärkung</i>	Optische Verstärkung des SLT-Gerätes	10
$c_{\text{Probe}}(\text{Protein})$	Proteinkonzentration der Probe nach <i>Bradford</i>	x mg/ml

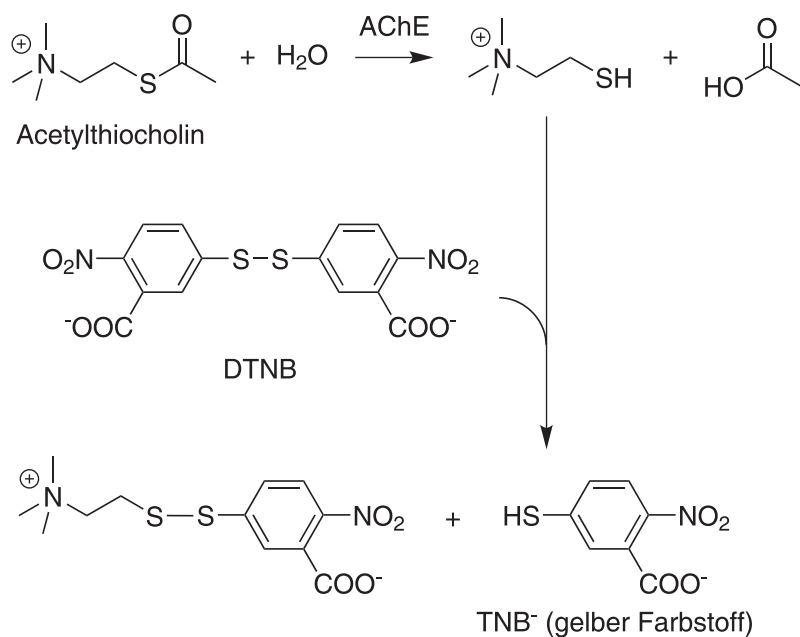


Abbildung 5.1.: Reaktionsschema von *Ellmans* Methode

5.5. Modifizierung der piezoelektrischen Sensoren

5.5.1. Modifizierung mit Propidium

Die unmodifizierten Sensoren wurden zunächst zwei Stunden in Aceton gewaschen und anschließend mit Stickstoff getrocknet. Die Sensoren wurden dann in 2 ml $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 11-Merapto-undecansäure (MUA) in 96% Ethanol für 48 Stunden inkubiert. In dieser Zeit bildete sich eine Monoschicht von MUA auf der Goldoberfläche. Es wurde eine $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Lösung von Propidiumiodid (0,82 mg in 121 μl) in DMF hergestellt. Weiterhin wurde eine 50 mol/l Lösung von *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) (1,66 mg in 166 μl) in DMF angesetzt. Beide Lösungen wurden jeweils 1:10 in DMF verdünnt. Es wurden 5 Volumenteile der $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Propidiumiodidlösung, 1 Volumenteil der $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DCC-Lösung und 14 Volumenteile an DMF gemischt. Von diesem Reaktionsgemisch wurden 800 μl in Teflonkavitäten gefüllt. Die Sensoren mit den selbstassemblierten Monoschichten wurden in diese Kavitäten getaucht und mit Parafilm versiegelt über Nacht inkubiert. Das entsprechende Reaktionsschema ist in Abbildung 5.2 gezeigt. Die Sensoren wurden abschließend mit DMF, 96% Ethanol und deionisiertem Wasser ab gespült. Anschließend wurden die modifizierten Sensoren mit Parafilm versiegelt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

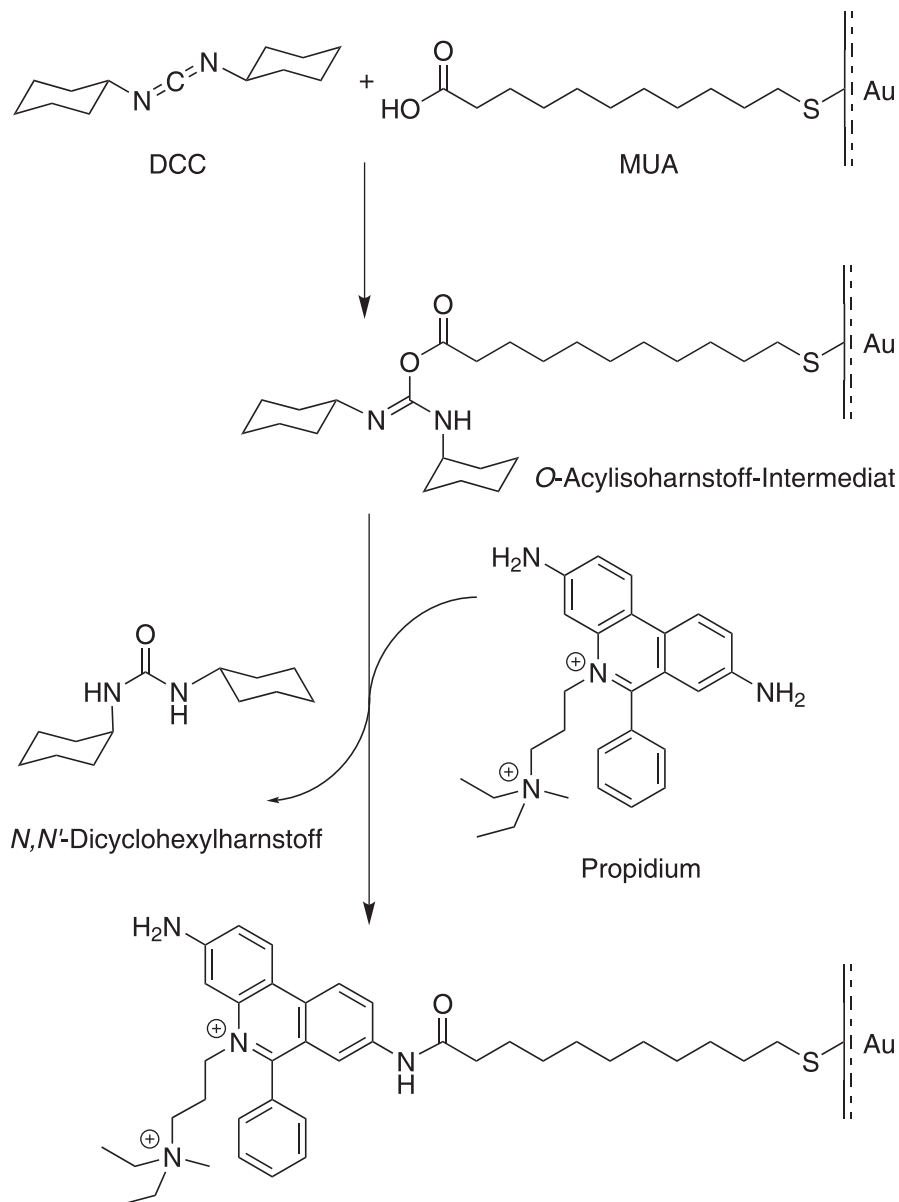


Abbildung 5.2.: Immobilisierung von Propidium auf einer MUA-Monoschicht

5.5.2. Modifizierung mit 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure

Die Piezosensoren wurden zunächst in Aceton gewaschen, um Produktionsrückstände zu entfernen. Es wurden 2 ml einer 20 mM Lösung von *p*-Aminothiophenol in DMSO bereitet. Hiervon wurden 800 μ l in Teflonwells gegeben und die gereinigten Sensoren darin für 48 h inkubiert. Zur 2,4-D-Aktivierung wurden 1,68 mg 2,4-D (\cong 7,6 μ mol) und 5,8 mg TNTU

($\cong 15,9 \mu\text{mol}$) in einem Gemisch von 200 μl DMF und 2 μl *N*-Methylmorpholin gelöst. Die Lösung wurde über Nacht inkubiert. In dieser Zeit bildete sich der 2,4-D-Aktivester unter Abspaltung von *N,N,N,N*-Tetramethylharnstoff (siehe Abb. 5.3). Dieses Reaktionsgemisch wurde 1:10 mit DMF verdünnt. Die mit der *p*-Aminothiophenol-Monoschicht präparierten Sensoren wurden in je 800 μl dieser Verdünnung getaucht und über Nacht inkubiert. Danach wurden die Sensoren nacheinander mit DMF, 96% Ethanol und Wasser gespült.

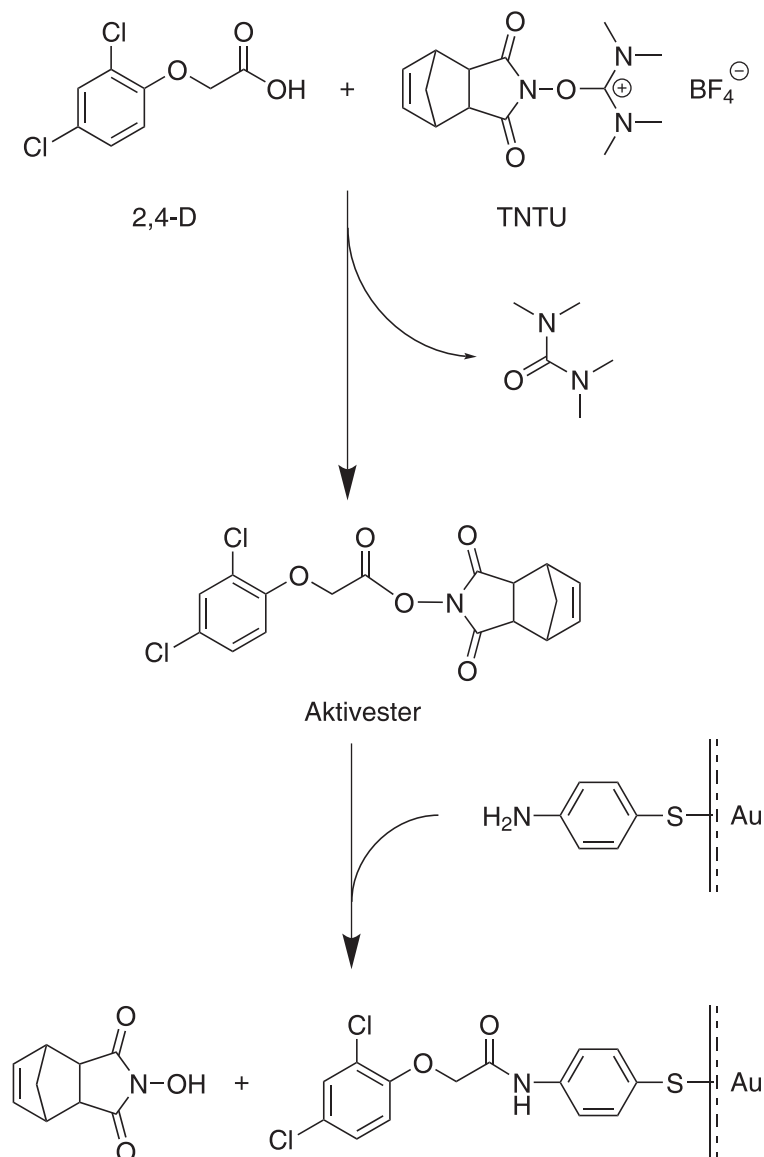


Abbildung 5.3.: Kopplung von 2,4-D an eine *p*-Aminophenol-Monoschicht

5.5.3. Modifizierung mit BZE-DADDOO

Für die Herstellung der BZE-DADDOO-modifizierten Sensoren wurden zunächst BZE-DADDOO und MUA kovalent verknüpft und anschließend zur Ausbildung der Sensorschicht auf die Elektroden der Quarzplättchen aufgebracht [73, 74]. Dazu wurden 1,77 mg MUA ($\cong 8,0 \mu\text{mol}$) und 2,9 mg TNTU ($\cong 7,9 \mu\text{mol}$) in einem Gemisch von 1 μl NMM ($\cong 9,6 \mu\text{mol}$) und 100 μl DMF gelöst. Die Lösung wurde für 15 min bei RT inkubiert. Weiterhin wurden 200 μl einer 10 mM BZE-DADDOO-Lösung durch Lösen von 0,84 mg BZE-DADDOO in 100 mM Carbonat-Puffer pH 8,5 angesetzt. 22 μl des MUA-TNTU-Reaktionsgemisches und 200 μl der BZE-DADDOO-Lösung wurden vermischt und für 90 min bei RT inkubiert. Das so erhaltene MUA-BZE-DADDOO-Konjugat kann für eine spätere Verwendung tiefgefroren werden. Für die Modifizierung der QCM-Sensoren wurden 30 μl des MUA-BZE-DADDOO-Konjugates auf die gereinigte Elektrodenoberfläche aufgetropft und für 48 h bei 4 °C unter annähernd 100% Luftfeuchte inkubiert. Danach wurden die Sensoren mit deionisiertem Wasser gespült und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert.

5.6. Messapparatur

Der verwendete piezoelektrische Detektor MULTILAB 3900 wurde von der Firma J. Kitlička (Brno, Tschechische Republik) bezogen. Die theoretische Auflösung beträgt 1 mHz bei einer Aufzeichnungsgeschwindigkeit von einem Messpunkt pro Sekunde. Die entsprechende Messsoftware LABTOOLS wurde von Prof. Petr Skládal (Masaryk Universität, Brno, Tschechische Republik) entwickelt. Da der Datenexport nur sehr unzureichend funktionierte (u. a. wurden Datenpunkte abgeschnitten oder das falsche Dezimaltrennzeichen verwendet), wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Perl-Skript (siehe Anhang, Seite 113) zum Export der piezoelektrischen und amperometrischen Messdaten in tabulator-separierte ASCII-Dateien geschrieben.

Die Messapparatur enthält neben dem EQCM-Detektor eine Peristaltikpumpe von Abimed Gilson (Langenfeld, Deutschland). Die Fließgeschwindigkeit wurde auf 20 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ eingestellt. Die Pumpe wird dem Detektor nachgeschaltet, so dass Puffer aus der Messzelle abgesaugt wird. Dadurch werden die Pulsationen vermindert und eine stabilere Basislinie ermöglicht. Außerdem ist es in dieser Anordnung einfacher, Luftblasen aus der Messzelle zu entfernen. Abbildung 5.4.A zeigt den Aufbau der Messapparatur. Für die Messungen wurden zwei verschiedene Messzellen eingesetzt. Beide sind Sonderanfertigungen der Werkstatt der Analytischen Biochemie. Die Messzellen haben ein Innenvolumen von 8–10 μl . Der Messquarz (Abb. 5.4.B) wird zwischen zwei Gummi-O-Ringen festgehalten. Dabei ist für die Messungen stets nur eine Sensorseite im Kontakt mit dem Puffer bzw. der Proteinlösung (Abb. 5.4.C).

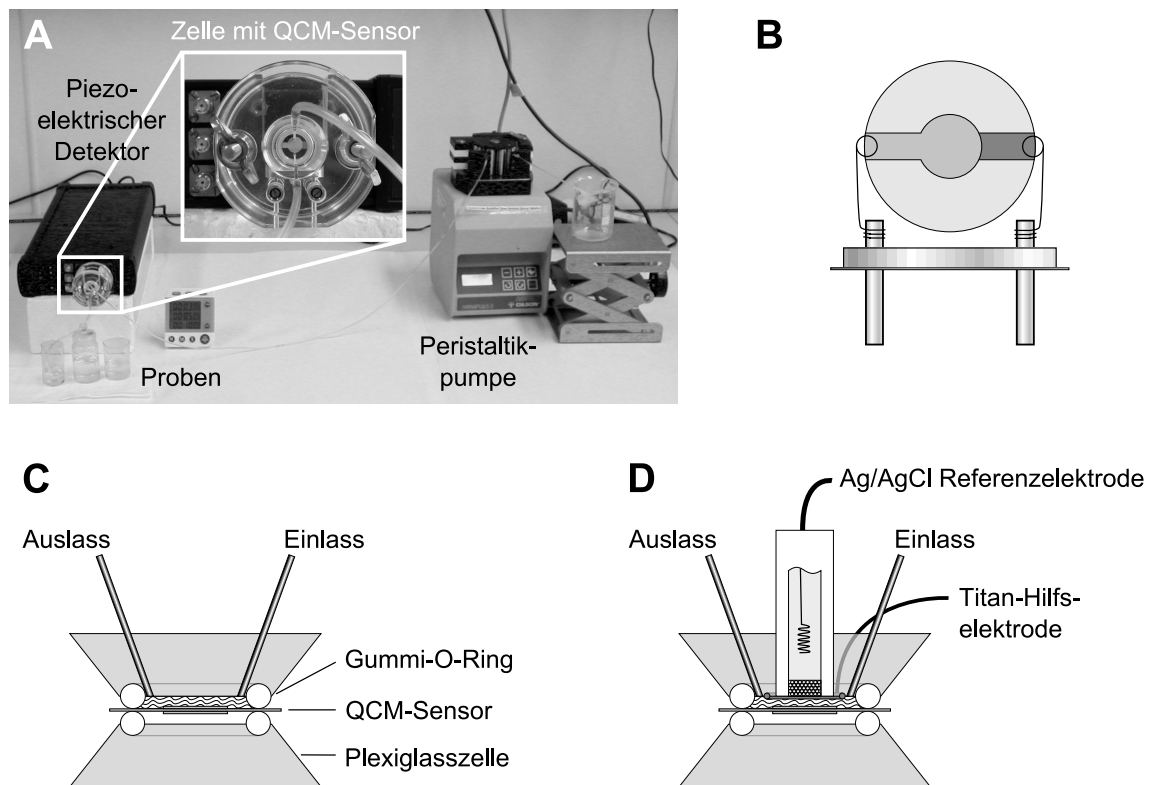


Abbildung 5.4.: Übersicht über die verwendete Apparatur; A... Aufbau des Fließsystems mit QCM-Detektor; B... Schema des QCM-Sensors; C... Querschnitt durch die Messzelle für ausschließlich piezoelektrische Experimente; D... Querschnitt durch die Kombizelle für amperometrische und piezoelektrische Messungen

Für die zusätzlichen amperometrischen Messungen wurden zwei Elektroden im Deckel der Messzelle (Abb. 5.4.D) montiert. Die Goldelektrode am Quarzplättchen, die im Kontakt mit der Flüssigkeit ist, wurde als Arbeitselektrode verwendet. Das Drei-Elektroden-System wird durch eine Ag/AgCl-Referenzelektrode (Microelectrodes Inc., Belford, USA) und eine ringförmige Titandrahtelektrode im Deckel komplettiert.

Bei der Beschreibung der piezoelektrischen Experimente wird im Allgemeinen vom „Sensor“ geschrieben. Damit ist in der Regel nur eine Seite des auf sowohl auf der Vorderseite als auch auf der Rückseite modifizierten Quarzplättchens gemeint. Im Laufe der wiederholten Benutzung einer Sensorseite kommt es zu einer zunehmenden Zerstörung oder Abtragung der Modifikation von der Goldelektrode, so dass diese Seite nicht mehr (so gut) zur Analytbindung geeignet ist. Solange allerdings die Goldelektrode unbeschädigt ist, kann diese Seite (rückseitig in Luft) immer noch die Untersuchung von Bindungsvorgängen ermöglichen. Obwohl das dann faktisch immer noch der gleiche QCM-Sensor wäre, werden im Experimentellen Teil die

modifizierte Vorder- und Rückseite als separate Sensoren betrachtet.

5.7. Experimente mit 2,4-D als Hapten

5.7.1. Synthese des 2,4-D-AChE-Konjugates

Zunächst wurde die kommerziell erhältliche Cholinesterase von kleineren Proteinen gereinigt. Dazu wurden 1,63 mg EeAChE eingewogen und in 1 ml 100 mM Carbonatpuffer pH 9 gelöst. Davon wurden 10 µl für Aktivitäts- und Proteinbestimmung abgenommen. Die restliche Proteinlösung wurde in Centrisart-I-Röhrchen (100'000 MWCO, PES-Membran, Vivascience) überführt und in der Kühlzentrifuge Sigma 3K12 (Fa. B. Braun) bei 2000 g, 10 min und 4 °C umgepuffert. Jeweils 200 µl blieben zurück und wurden mit 1 ml Carbonatpuffer ergänzt. Insgesamt wurden vier Durchläufe gefahren. Nach dem letzten Durchgang wurden 800 µl Carbonatpuffer ergänzt.

Nach dem Filtrieren wurden alle Proben in ihrer AChE-Aktivität und ihrer Proteinkonzentration bestimmt. Die notwendigen Verdünnungen erfolgten mit 40 mM Brittonpuffer pH 8. Die Aktivitätsmessung erfolgte wie unter 5.4.2 beschrieben. Für die Aktivierung wurden 1,94 mg 2,4-D (= 8,8 µmol) und 2,8 mg TNTU eingewogen und in einem Gemisch von 1 µl *N*-Methylmorpholin und 100 µl DMF gelöst. Die Lösung wurde kurz mit dem Vortexer gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Die 2,4-D-Konzentration betrug $8,69 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Dieser Aktivierungsmix wurde anschliessend mit Carbonatpuffer verdünnt (siehe Tab. 5.3). Von

Tabelle 5.3.: Verdünnung des Aktivierungsmix und endgültige Molverhältnisse

Verdünnung	c(2,4-D) in $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$	n(2,4-D) in mol	n(EeAChE) in mol	Molverh. 2,4-D : EeAChE
1 : 10	$8,69 \cdot 10^{-3}$	$3,04 \cdot 10^{-7}$	$1,17 \cdot 10^{-9}$	260 : 1
1 : 100	$8,69 \cdot 10^{-4}$	$3,04 \cdot 10^{-8}$	$1,17 \cdot 10^{-9}$	26 : 1
1 : 1000	$8,69 \cdot 10^{-5}$	$3,04 \cdot 10^{-9}$	$1,17 \cdot 10^{-9}$	2,6 : 1

diesen Verdünnungen wurden je 35 µl mit 300 µl EeAChE-Stammlösung ($934,2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ bzw. $3,89 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) vermischt (daraus ergaben sich auch die berechneten 2,4-D-Überschüsse in Tabelle 5.3). Die Konjugatansätze wurde kurz gevortext und 90 min bei RT stehen gelassen. Anschließend wurden die drei Ansätze gegen 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,5 umgepuffert (in Centrisart-I-Röhrchen, MWCO 20'000 CTA-Membran, Vivascience).

Von diesen drei Ansätzen wurden nochmals die Proteinkonzentration und die katalytischen Aktivitäten bestimmt.

5.7.2. Einfluss von DMF auf die Enzymaktivität von AChE

Von der EeAChE wurden 0,54 mg eingewogen und in 800 μl Brittonpuffer gelöst. Für die Versuche wurden zwei Mischungsstrategien verfolgt. Zum einen wurde erst DMF vorgelegt und dann AChE-Lösung dazu gegeben. Im zweiten Fall wurde das DMF direkt in der AChE-Lösung verdünnt. Die Endkonzentration an DMF betrug 1, 5 bzw. 10 Vol. %. Die Ansätze wurden kurz auf dem Vortexer gemischt und dann für 90 min bei RT inkubiert (wie während der Konjugatsynthese 5.7.1). Parallel dazu wurde ein Aliquot der AChE-Stammlösung 90 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden von allen Proben die AChE-Aktivität nach Ellman gemessen.

5.7.3. ELISA mit 2,4-D-AChE

Die Mikrotiterplatte wurde mit anti-Maus-AK ($5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ in 50 mM Carbonatpuffer pH 9,6) je 100 μl pro Well belegt. Die Platte wurde über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte viermal mit Waschpuffer gespült.

Die Platte wurde in zwei Hälften aufgeteilt. Diese wurden mit 100 μl von $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bzw. $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ anti-2,4-D-AK in PBS belegt. Die Platte wurde abgeklebt und für 2 h auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Anschließend wurde wieder viermal mit Waschpuffer (200 μl je Well) gewaschen.

Die unverdünnten Konjugate hatten im Mittel eine EeAChE-Konzentration von $7 \cdot 10^{-7}$ M. Als Negativkontrolle wurde eine Lösung von unmodifizierter EeAChE benutzt. Die Stammlösung hatte eine Konzentration von $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($4,2 \cdot 10^{-6}$ M). Diese wurde 1:60 mit PBS verdünnt (Endkonzentration $6,94 \cdot 10^{-8}$ M). Die 2,4-D-AChE-Konjugate wurden in einer dekadischen Reihe (1 : 10 bis 1 : 10^6) verdünnt, das heißt die Endkonzentrationen reichten von $7 \cdot 10^{-8}$ M bis $7 \cdot 10^{-13}$ M. Von den Verdünnungen wurden zeilenweise je 100 μl in ein Well pipettiert. Die Platte wurde zwei Stunden auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Danach wurde abermals viermal mit je 200 μl Waschpuffer je Kavität gewaschen.

Die Aktivität der gebundenen 2,4-D-AChE wurde nach *Ellmans* Methode (siehe 5.4.2) bestimmt. Da der Schritt der AChE-Zugabe entfiel, wurde stattdessen mit 240 μl Puffer gearbeitet. Die Zunahme der Absorption bei 412 nm wurde im Genios-Reader vermessen.

5.7.4. Bindung von anti-2,4-D-AK an 2,4-D-AChE

Der anti-2,4-D-Antikörper (E2G2) lag gefroren in Aliquoten á 5 µg in 10 µl (= 500 µg·ml⁻¹ \cong 3,33 · 10⁻⁶ mol·l⁻¹) vor. Ein Aliquot wurde mit 490 µl Phosphatpuffer ergänzt. Die Endkonzentration an Antikörper betrug 10 µg·ml⁻¹ (\cong 66,7 nmol·l⁻¹). Zunächst wurde eine 50 µg·ml⁻¹ 2,4-D-AChE für 5 min ins Fließsystem injiziert und so auf dem Propidium-modifizierten Sensor immobilisiert. Nach 5 min Pufferfluss wurde der Antikörper injiziert. Die Regeneration erfolgte mit 2 mg·ml⁻¹ Pepsin in 50 mM Phosphatlösung pH 2.

5.7.5. Kompetitiver Assay mit 2,4-D im Fließsystem

Von einer 2,4-D-Stammlösung wurden unterschiedliche Konzentrationen von 10⁻⁹ mol·l⁻¹ bis 10⁻⁴ mol·l⁻¹ in Phosphatpuffer pH 7,5 hergestellt. Der anti-2,4-D-Antikörper wurde in zwei Verdünnungen – bei 10 µg·ml⁻¹ und 20 µg·ml⁻¹ – eingesetzt. 270 µl dieser Antikörperlösung wurden mit 30 µl einer 2,4-D-Lösung gemischt. Die endgültige 2,4-D-Konzentration war daher um den Faktor zehn kleiner. Als Positivkontrolle wurden 30 µl Puffer zu der Antikörperlösung gegeben. Die Proben wurden je 30 min vor der Injektion ins Fließsystem inkubiert. Als Messsignal wurde die erreichte Frequenzdifferenz nach 5 min gemessen. Die Regeneration erfolgte mit 100 mM Ameisensäure.

5.7.6. Kopplung von anti-2,4-D-AK an Goldnanopartikel

Die Kopplung an Goldnanopartikel erfolgte nach dem Protokoll von Pieper-Fürst u. a. [145]. Zunächst wurde ein Spektrum von 1 ml der Goldnanopartikelsuspension (20 nm) gegen Wasser aufgezeichnet (Shimadzu UV-1601) herangezogen. Die Absorption bei 520 nm beträgt 0,975, die Konzentration laut Sigma war 4,9 · 10¹¹ Partikel pro ml. 1 ml der Nanopartikelsuspension wurde 2 h bei 4 °C und 5000 rpm (\cong 4166×g, Kühlzentrifuge Sigma, B. Braun) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 488 µl 2 mM Phosphatpuffer pH 6 und 12 µl der anti-2,4-D-AK-Stammlösung (500 µg·ml⁻¹, Endkonz. 12 µg·ml⁻¹) resuspendiert. Bei einem MG der Antikörper von 150'000 g/mol entspricht dies einem Überschuß von 50 : 1 Antikörper zu Nanopartikel. Das Gemisch wurde kurz gevortext und 10 min im Überkopfschüttler inkubiert.

400 µl 0,1 mg/ml BSA in 2 mM Phosphatpuffer pH 6 wurden zugegeben und nochmals 10 min geschüttelt. 100 µl 10% NaCl wurden zupipettiert und nochmals 15 min geschüttelt. 10 µl 10 mg/ml BSA in 2 mM Phosphatpuffer pH 6 wurden zugegeben und das gesamte Reaktionsgemisch für 30 min bei 4 °C und 5000 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml 1 mg/ml BSA in 2 mM Phosphatpuffer pH 6 resuspendiert und nochmals 30 min bei 4 °C und 5000 rpm zentrifugiert. Beim Resuspendieren wurde die Probe kurz (1-2 s) im Ultraschallbad inkubiert und 10-20 s gevortext. Die Zentrifugation wurde noch einmal wiederholt. Beim letzten Durchgang wurde das Nanopartikel-Pellet in 1 ml 1 mg/ml BSA in 2 mM Phosphatpuffer pH 6 resuspendiert. Von dieser Lösung wurde nochmals ein Spektrum von 350-700 nm gegen 2 mM Phosphatpuffer pH 6 aufgezeichnet.

Die Anfangskonzentration von ca. $4,9 \cdot 10^{11}$ Partikel pro ml sank während des Experiments auf ca. $3,44 \cdot 10^{11}$ Partikel pro ml in Folge der Aggregation der Nanopartikel während der Modifizierung. Ein weiteres Anzeichen dafür war das Ansteigen der Absorption bei höheren Wellenlängen, z.B. OD(580 nm) von 0,255 auf 0,414.

Als Vergleich zu den Antikörper-modifizierten Goldnanopartikeln wurden auch mit BSA-modifizierte Goldnanopartikel hergestellt. Dazu wurde zunächst das Spektrum von 1 ml Goldnanopartikelsuspension aufgezeichnet. Die optische Dichte bei 520 nm betrug 0,959 ($\hat{=}$ $4,9 \cdot 10^{11}$ Partikel/ml). Die Partikel wurden wie zuvor (vgl. Abschnitt 5.7.7) für zwei Stunden bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Partikel in 500 μ l 1 mg/ml BSA in 2 mM Phosphatpuffer pH 6 resuspendiert. Nach 15 min im Überkopfschüttler wurde nochmals zentrifugiert und BSA in Phosphatpuffer zugegeben. Nach drei Zugaben von BSA wurden die Nanopartikel gegen 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 umgepuffert.

5.7.7. Test der AK-modifizierten Goldnanopartikel

Vor den piezoelektrischen Experimenten wurden die Au-Nanopartikelsuspension gegen 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 umgepuffert. Die Lösung wurde 30 min bei 4 °C und 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet anschließend in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 aufgenommen. Die Zentrifugation wurde noch zweimal wiederholt. Von der endgültigen Suspension der anti-2,4-D-beschichteten Goldnanopartikel wurde ein Spektrum von 350-700 nm gegen 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 aufgezeichnet.

Ablauf der piezoelektrischen Experimente:

- 3 min Puffer (Basislinie)
- 5 min Probe
- 5-8 min Puffer (Dissoziation)

- 5-10 min Regeneration mit 2 mg/ml Pepsin in Phosphatlösung pH 2,0 bzw. 0,5 M Ameisensäure
- 3 min Puffer (Basislinie)

Die piezoelektrischen Bindungsexperimente wurden bei einer Fließgeschwindigkeit von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ aufgezeichnet.

5.7.8. Kopplung von MUA/MU an Goldnanopartikel

Von 11-Mercaptoundecanol (MU) und 11-Mercaptoundecansäure (MUA) wurden je 5 mM Lösungen in 96% Ethanol hergestellt. Davon wurden ein Volumenteil MUA und drei Volumenteile MU gemischt. 1 ml der Au-Nanopartikelsuspension wurde 2 h bei 5000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Partikelniederschlag wird in 1 ml des MUA/MU-Gemisches resuspendiert und für 48 h im Überkopfschüttler bei ca. 50 rpm inkubiert. Anschließend werden die Partikel dreimal mit Phosphatpuffer pH 7,5 gewaschen.

5.7.9. Kopplung von anti-2,4-D-AK an carboxy-terminierte Goldnanopartikel

Der Aktivierungsmix bestand aus 2,15 mg TNTU ($\cong 5,9 \cdot 10^{-6}$ mol) in 100 μl DMF und 1 μl NMM. Nach 15 min Reaktionszeit wurden die Antikörper zu den Partikeln gegeben. Die anti-2,4-D-Antikörper-Stammlösung (500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) wurde 1:100 mit 100 mM Carbonatpuffer pH 9 verdünnt. Von dieser Antikörper-Verdünnung wurden 900 μl zu den rund 100 μl Partikelsuspension gegeben und für 90 min inkubiert. Abschließend wurden die modifizierten Partikel mit 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 gewaschen. Dazu wurden sie für eine Stunde bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert und in 1 ml Puffer resuspendiert.

5.7.10. Piezoelektrische Experimente mit anti-2,4-D-Goldnanopartikeln

Die modifizierten Goldnanopartikel (MUA/MU, BSA bzw. anti-2,4-D-AK) wurden auf ihre Bindung an 2,4-D-modifizierte Sensoren untersucht. Die Partikel wurden direkt aus den in Phosphatpuffer umgepufferten Lösungen oder in Verdünnungen verwendet. Als Positivkontrolle wurde anti-2,4-D-Antikörper in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ verwendet.

Injektionsschema:

- 3 min Puffer (Basislinie)
- 5 min Probe

- 5-8 min Puffer (Dissoziation)
- 5-10 min Regeneration mit 2 mg/ml Pepsin in Phosphatlösung pH 2,0 bzw. 0,5 M Ameisensäure
- 3 min Puffer (Basislinie)

Die piezoelektrischen Bindungsexperimente wurden bei einer Fließgeschwindigkeit von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ aufgezeichnet.

5.7.11. Kopplung von anti-2,4-D-AK an Silica-Nanopartikel

Die Silica-Nanopartikelsuspension enthielt 25 mg/ml, d.h. bei einem mittleren Partikeldurchmesser von 80 nm enthielt 1 ml ca. $5,8 \cdot 10^{12}$ Partikel ($\cong 9,6 \cdot 10^{-12}$ mol). 1 ml der Partikelsuspension wurde mit der Beckmann-Tischzentrifuge für 10 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 2,73 mg TNTU ($\cong 7,5 \cdot 10^{-6}$ mol), 1 μl NMM und 100 μl DMF gemischt und zu den Partikeln gegeben. Die Durchmischung erfolgte durch kurze (30 s) Ultraschallbehandlung und anschließendes Vortexen. Das Gemisch wurde für 15 min bei RT inkubiert.

0,6 mg Maus-anti-2,4-D-Antikörper wurden eingewogen und in 1 ml Carbonatpuffer gelöst. Davon wurden 500 μl (enthalten ca. $2 \cdot 10^{-9}$ mol) zu den aktivierten Partikeln gegeben und gevortext. Das entspricht einem ca. 208fachen Überschuss an Antikörpern gegenüber Silicatpartikeln. Die restlichen 500 μl der Antikörperlösung wurden zur späteren Verwendung eingefroren. Das Reaktionsgemisch aus Partikeln und Antikörpern wurde 90 min im Überkopfschüttler inkubiert.

Danach wurde mit der Beckmann-Tischzentrifuge (10 min) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Phosphatpuffer (pH 7,5) resuspendiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt.

Als Referenz für die piezoelektrischen Experimente wurde 1 ml der unmodifizierten Partikelsuspension nach Zentrifugation in Phosphatpuffer überführt.

5.7.12. Photometrische Detektion von Silica-Nanopartikeln

Zur schnellen Bestimmung der Konzentration an Silica-Nanopartikeln (SNP) wurde eine modifizierte Methode nach DIN EN ISO 16264 [137] verwendet. Diese Methode basiert auf dem quantitativen Silicatnachweis mit Molybdänblau. Für den Test wurden zunächst

folgende Stammlösungen in PE-Plastikgefäßen angesetzt: 20% L-(+)-Weinsäure, 5% Schwefelsäure, 5% Ascorbinsäurelösung und 5% Ammoniummolybdatlösung ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$). Die Silica-Nanopartikel wurden gegebenenfalls mit deioniertem Wasser vorverdünnt. Der Küvettenansatz wurde wie folgt in Eppendorfgefäßen vorbereitet:

- 100 µl Probe (Leerwert = Wasser)
- + 20 µl 5% Schwefelsäure
- + 20 µl 5% Ammoniummolybdat
- gevortext und 5 min inkubiert
- + 20 µl 20% Weinsäure
- gevortext und 5 min inkubiert
- + 20 µl 5% Ascorbinsäure
- gevortext und 5 min inkubiert
- + 820 µl Wasser (gesamt 1 ml)

Die Proben wurden in PMMA-Halbmikroküvetten überführt und am Shimadzu-Spektrometer UV-1602 vermessen. Von den Silica-Nanopartikeln wurde ein Spektrum von 400 bis 1000 nm aufgenommen. Für die SNP-Verdünnungsreihe wurde die Absorption bei 810 nm bestimmt.

5.7.13. Partikel-ELISA mit anti-2,4-D-SNP

Die Mikrotiterplatte wurde mit 2,4-D-AChE ($5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5) je 100 µl pro Well belegt. Die Platte wurde über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte viermal mit Waschpuffer gespült.

Die Platte wurde zeilenweise mit mit 100 µl von anti-2,4-D-SNP in PBS belegt. Die modifizierten Silica-Nanopartikel wurden in einer dekadischen Reihe (1 : 10 bis 1 : 10000) verdünnt. Als Negativkontrolle wurde lediglich PBS in die betreffende Wells gegeben. Die Platte wurde abgeklebt und für 2 h auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Anschließend wurde wieder viermal mit Waschpuffer (200 µl je Well) gewaschen.

Das anti-Maus-AK-POD-Konjugat wurde in drei Verdünnungstufen von 1 : 10^4 bis 1 : 10^6 in PBS eingesetzt. Von den Verdünnungen wurden spaltenweise je 100 µl in ein Well pipettiert. Die Platte wurde zwei Stunden auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Danach wurde abermals viermal mit je 200 µl Waschpuffer je Kavität gewaschen.

Die Aktivität der gebundenen anti-Maus-Antikörper wurde über die Peroxidase-Aktivität bestimmt. Dazu wurden je Well 240 μl Citronensäure-Phosphat-Puffer pH 4,4 vorgelegt und 30 μl 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ TMB in 96% Ethanol zupipettiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 30 μl Wasserstoffperoxid-Lösung (11,5 μl 30% in 10 ml deionisiertem Wasser) gestartet. Die Absorption bei 620 nm wurde im SLT-Reader nach 10, 30, 60 und 120 min vermessen. Die Wells, die weder modifizierte SNP nach anti-Maus-AK-POD-Konjugat enthielten, wurden für die Messung des Leerwertes verwendet.

5.7.14. Piezoelektrische Experimente mit anti-2,4-D-Silica-Nanopartikeln

Die Bindungsexperimente wurden an 2,4-D-modifizierten Piezosensoren durchgeführt. Dabei wurde die horizontale Lage der Messzelle gewählt, um ein besseres Auswaschen der Nanopartikel zu gewährleisten.

Ablauf der piezoelektrischen Experimente:

- 3 min Puffer (Basislinie)
- 5 min Probe
- 5 min Puffer (Dissoziation)
- 5-10 min Regeneration
- 3 min Puffer (Basislinie)

Die piezoelektrischen Bindungsexperimente wurden bei einer Fließgeschwindigkeit von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ aufgezeichnet. Die Antikörper-modifizierten Silica-Nanopartikel wurden dabei in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Außerdem wurde die Regenerierung mit 10 mM Natronlauge ($\text{pH} \approx 12$) an Stelle von Pepsin bei pH 2 getestet [114]. Da NaOH auch die QCM-Sensoren angreift, wurde zu 3 M Guanidinthiocyanat (neutraler pH) gewechselt.

5.8. Experimente mit Kokain als Hapten

5.8.1. Synthese des BZE-AChE-Konjugates

Für die chemische Modifizierung der EeAChE wurde die bewährte EDC/NHS-Kopplung gewählt. Cholinesterase, EDC und NHS wurden in einem molaren Verhältnis von 1 : 1000 : 2000 gemischt. Dazu wurden 2,08 mg EeAChE ($\cong 8,67$ nmol) in 500 μl 0,5 M MES-Puffer pH 5,5 gelöst. Zu dieser Proteinlösung wurden 50 μl einer 181 mM EDC-Lösung in MES-Puffer und

25 μl einer 683 mM NHS-Lösung (ebenfalls in MES-Puffer) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für zwei Stunden bei RT im Überkopfschüttler inkubiert. Der nächste Schritt war bei den erhaltenen BZE-AChE-Konjugaten verschieden. Konjugat A und Konjugat B unterschieden sich darin, dass die folgende Reaktion in Abwesenheit bzw. in Gegenwart von Kokain statt fand.

Konjugat A: BZE-DADDOO (3,89 mg \cong 9,27 μmol) wurde in 325 μl of 0,1 M MES-Puffer pH 6,6 gelöst und zur NHS-aktivierten AChE gegeben. Dadurch wird ein 1000facher Überschuß an BZE-DADDOO gegenüber der Cholinesterase gewährleistet. Insgesamt wurden 60 μl of NaOH (1 M Stammlösung) in 10 μl Schritten hinzugegeben, um den pH-Wert des Reaktionsgemisches über 6,0 anzuheben (überprüft mit pH-Teststreifen von Machery & Nagel). Dieses Gemisch wurde für vier Stunden bei RT im Überkopfschüttler inkubiert.

Konjugat B: 3,87 mg BZE-DADDOO (\cong 9,22 μmol) wurden in 100 μl 0,1 M MES-Puffer pH 6,6 gelöst. Zusätzlich wurden 31,48 mg Kokain (\cong 92,64 μmol) in 300 μl des gleichen Puffers gelöst. Die 100 μL der BZE-DADDOO-Lösung und 275 μL der Kokain-Lösung wurden zu der NHS-aktivierten AChE gegeben. 70 μl 1 M Natronlauge wurden tropfenweise zugegeben, um den pH-Wert des Reaktionsgemisches über 6,0 anzuheben (überprüft mit pH-Teststreifen von Machery & Nagel). Die Endkonzentration an Kokain im Reaktionsansatz betrug 100 mM. Die erhaltene Lösung wurde wie für Konjugat A beschrieben für 4 h bei RT im Überkopfschüttler inkubiert.

Nach Ende der Reaktion wurden beide Konjugate wieder der gleichen Prozedur unterworfen. Zunächst wurden die Konjugate in 2 ml Vivaspin-Konzentratoren in der Kühlzentrifuge Sigma 3K12 (Fa. B. Braun) bei 3000 g und 4 °C für 10 min filtriert. Nach jedem Durchlauf wurde das Filtrat verworfen und 1 ml 50 mM Phosphat-Puffer pH 7,5 zum Konzentrat gegeben. Nach drei Durchläufen wurde der reine Puffer durch ein Gemisch aus 100 μl 30 mM Acetylcholin und 900 μl Phosphat-Puffer ersetzt. Dies geschah mit der Absicht, nicht gekoppeltes BZE-DADDOO und das überschüssiges Kokain zu entfernen. Nach weiteren drei Filtrationsläufen wurde wieder zu reinem Phosphat-Puffer gewechselt, um überschüssiges Acetylcholin und dessen Hydrolyseprodukte auszuwaschen. Nach dem letzten Durchgang wurde mit Phosphat-Puffer auf ein Endvolumen von 1 ml ergänzt. Die Proteinkonzentration und die Aktivität der modifizierten AChE wurde nach Bradfords bzw. Ellmans Methode bestimmt (siehe 5.4.1 bzw. 5.4.2).

5.8.2. Kinetik der Bindung des anti-BZE-Antikörpers an BZE-AChE

Zur Untersuchung der Bindung von anti-BZE-Antikörper an die BZE-AChE-Konjugate wurde folgendes Injektionsschema verwendet:

- 3 min Pufferfluss (Basislinie)
- 5 min Injection von $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ BZE-AChE
- 5 min Pufferfluss
- 5 min Injection des anti-BZE-Antikörpers in unterschiedlichen Konzentrationen
- 5 min Spülen mit Puffer
- 5 min Regeneration mit Pepsin-Lösung pH 2

Die Antikörperstammlösung wurde mit Phosphatpuffer pH 7,5 auf Endkonzentrationen von 2, 5, 10, 25 und $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ verdünnt. Die aufgenommenen Bindungskurven wurde nicht-linear nach einem 1-zu-1-Bindungsmodell (siehe [186, 209]) gefittet, um die Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Antikörper-Bindung zu erhalten.

5.8.3. Kompetitiver Immunoassay im Fließsystem

Der kompetitive Immunoassay mit Kokain wurde nach dem gleichen Injektionsschema wie bei den Kinetik-Messungen mit dem anti-BZE-AK durchgeführt. Im Unterschied zu den vorherigen Messungen wurde der Antikörper nun mit unterschiedlichen Kokain-Konzentrationen vorinkubiert. Die Antikörperkonzentration wurde bei $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ für alle folgenden Messungen festgelegt.

Es wurde zunächst eine 10 mM Stammlösung von Kokain in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 hergestellt. Diese Stammlösung wurde in Zehnerschritten mit Puffer weiter verdünnt. Im dynamischen Bereich der Dosisabhängigkeitskurve wurden weitere Zwischenverdünnungen hergestellt. Jeweils 30 min vor der Injektion wurden 30 μl der jeweiligen Kokainverdünnung mit 270 μl Antikörper-Lösung vermischt. Die Endkonzentration an Kokain lag im Bereich von $10^{-6} - 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Da die Injektionszeit zu kurz war, um das Gleichgewicht der Antikörper-Bindung zu erreichen, wurde der Anstieg der resultierenden Frequenzänderung berechnet und für die folgenden Auswertungen herangezogen. Die gemessenen Anstiege wurden auf den Anstieg des Antikörpers

ohne Hapten normalisiert. Dazu wurde Antikörper ohne Kokain (270 μL + 30 μL Phosphatpuffer) injiziert. Insgesamt wurden drei Konzentrationreihen je BZE-AChE-Konjugat vermessen.

5.8.4. Bindung von Butyrylcholinesterase an BZE-AChE

In diesem Fall wurde ebenfalls das Injektionschema für die Antikörperuntersuchung herangezogen und leicht verändert. An Stelle des anti-BZE-AK wird nun Butyrylcholinesterase injiziert und auf ihre Affinität zum BZE-AChE-Konjugat hin untersucht:

- 3 min Pufferfluss
- 5 min Injektion von 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ BZE-AChE
- 5 min Pufferfluss
- 5 min Injektion von 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ huBChE; freies Enzym bzw. mit Kokain vorinkubiert
- 5 min Spülen mit Puffer
- 5 min Regeneration mit Pepsin-Lösung pH 2

5.8.5. SDS-Gelelektrophorese der BZE-AChE-Konjugate

Die Gele wurden in folgender Zusammensetzung gegossen:

Tabelle 5.4.: Zusammensetzung der Gele

Trenngel (15 %)	Sammelgel (5 %)
2,7 ml 50 % Acrylamid/Bisacrylamid	0,4 ml 50 % Acrylamid/Bisacrylamid
3,38 ml Tris/HCl pH 8,7	0,5 ml Tris/HCl pH 6,8
2,7 ml Wasser	3,1 ml Wasser
90 μl SDS	40 μl SDS
68 μl APS	24 μl APS
4 μl TEMED	4 μl TEMED

Die Proben wurden zunächst im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer versetzt und dann 15 min bei 75 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit einer Hamiltonspritze in die Taschen des vorbereiteten Gels aufgetragen. Es konnten maximal 25-30 μl Probe pro Tasche aufgetragen werden. Als Marker wurde das *Electrophoresis Calibration Kit for low*

molecular weight proteins verwendet. Die Elektrophorese (Gelelektrophoreseapparatur Mini-Protean II; Fa. BIORAD) wurde in Laufpuffer zunächst bei 50 V (Sammelgel) und dann bei 150 V (Trenngel) betrieben. Anschließend wurden die Gele kurz in Wasser gespült und dann für 30 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt. Die Entfärbung der Gele wurde über Nacht durchgeführt. Nach kurzem Spülen in Wasser wurden die Gele zusammen mit zwei Bögen Acetatfolie 30 min in Trocknungslösung inkubiert und dann in der Acetatfolie (Elwiphan, Wittenberge) haltbar gemacht.

5.9. Experimente zur Inhibierung *in-situ* immobilisierter AChE

5.9.1. Inhibition mit Diisopropylfluorophosphat

Der piezoelektrische Detektor kann ebenfalls für amperometrische Messungen eingesetzt werden. Dabei wird die Goldelektrode des Quarzsensors, die im Kontakt mit dem Pufferstrom ist, als Arbeitselektrode genutzt. Die verwendete Messzelle enthält zusätzlich eine Ag/AgCl-Referenz- und eine Platinhilfselektrode (siehe Abb. 5.4.D auf Seite 80). Die Aktivität der *in-situ* immobilisierten AChE wird über die enzymatische Hydrolyse von Acetylthiocholin (ATC) bestimmt. Das entstehende Thiocholin kann an der Arbeitselektrode bei einem Potential von +200 mV vs. Ag/AgCl oxidiert werden. Da ATC in verdünnten Lösungen bei pH 7,5 bereits eine signifikante Eigenhydrolyse zeigt, wurde eine 30 mM ATC-Stammlösung bereitete und bei 4 °C gelagert. Diese Stammlösung wurde jeweils kurz vor der Injektion mit Phosphatpuffer auf 0,5 mM verdünnt. Die Arbeitselektrode wird erst während der ATC-Injektion und dem nachfolgenden Spülen eingeschaltet. Während der übrigen Messzeit bleibt sie stromfrei.

Diisopropylfluorophosphat (DFP) wurde als 1 mM Stammlösung durch Verdünnen von 1,8 µl DFP in 10 ml deionisiertem Wasser bereitete. Die DFP-Stammlösungen wurden täglich frisch bereitete, da DFP in deionisiertem Wasser über 24 Stunden fast vollständig hydrolysiert. Weitere Verdünnungen der DFP-Stammlösung wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt.

Das Injektionsschema war wie folgt:

- 3 min Pufferfluss
- 5 min Injektion von 50 µg·ml⁻¹ BZE-AChE
- 3 min Pufferfluss
- 3 min Injektion von 0.5 mM Acetylthiocholin (ATC), frisch verdünnt
- 3 min Pufferfluss

- 6 min wiederholte Injektion von ATC und Puffer
- 3 min Injektion der Organophosphat-Lösung
- 3 min Spülen mit Puffer
- 12 min: zwei weitere Injektionen von frisch verdünntem ATC wie zuvor beschrieben
- 5 min Regeneration mit Pepsin-Lösung pH 2

5.9.2. Chemische Aktivierung von Chlorpyrifos und Terbufos

Die Oxidation von Phosphothionaten mit *N*-Bromsuccinimid (NBS) folgt im wesentlichen dem von Schulze u. a. [161] beschriebenen Protokoll. Zunächst wurden Stammlösungen von 0,4 g/l (\cong 2,25 mM) NBS und 4 g/l (\cong 22,7 mM) Ascorbinsäure vorbereitet. 1,95 mg Chlorpyrifos (\cong 5,56 μ mol) wurden eingewogen und in 10 ml Wasser gelöst. 2 μ l Terbufos (\cong 7,66 μ mol) wurden in 10 ml Wasser verdünnt. Für die Reaktion mit dem Phosphothionat wurden NBS und Ascorbinsäure jedoch in höheren Überschüssen als in [161] angegeben eingesetzt. Je Ansatz wurden 9,1 ml Wasser vorgelegt und darin 100 μ l des Phosphothionats verdünnt. Dazu wurden 400 μ l der NBS-Lösung gegeben, kurz geschüttelt und 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Dann wurden 400 μ l der Ascorbinsäure-Lösung hinzugegeben und nochmal 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Die erhaltenen Oxo-Formen der Organophosphate wurden in Mikrotiterplatten auf ihre Inhibitionsfähigkeit getestet. Der Test orientierte sich an der unter 5.4.2 beschriebenen Aktivitätsbestimmung nach Ellman. Dazu wurden 180 μ l Britton-Puffer pH 8,0 und 30 μ l der 1:10000 verdünnten EeAChE-Stammlösung (1 mg/ml) vorgelegt. Hierzu wurden 30 μ l Wasser (Negativkontrolle) bzw. 30 μ l der Organophosphat-Lösung (gegebenenfalls mit Wasser verdünnt) pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde 10-30 min bei RT auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Anschließend wurde die verbliebene AChE-Aktivität nach Zugabe von 30 μ l DTNB und 30 μ l ATC gemessen.

5.9.3. Inhibition mit Chlorpyrifos-oxon

Chlorpyrifos-oxon (CPO) ist kommerziell als Lösung (1 ng/ml) in Cyclohexan erhältlich. Da dieses Lösungsmittel nicht mit Wasser mischbar ist, wurden 200 μ l Aliquote der Stammlösung in Eppendorfgläsern am Rotationsverdampfer bei 20-30 mbar und RT getrocknet. Der verbleibende Feststoff wurde in Phosphatpuffer aufgenommen und gegebenenfalls weiter verdünnt.

Auch für die Inhibitionsuntersuchungen mit Chlorpyrifos-oxon wurde die kombinierte Messzelle für piezoelektrische und amperometrische Experimente eingesetzt. An der Arbeitselektrode wurde 200 mV vs. Ag/AgCl angelegt. Das Schema der Elektrodenbeschaltung und der Fließinjektion wurde von den Versuchen mit DFP (siehe Abschnitt 5.9.1 auf Seite 92) übernommen.

Literaturverzeichnis

- [1] ALBAREDA-SIRVENT, M. ; MERKOCI, A. ; ALEGRET, S.: Pesticide Determination in Tap Water and Juice Samples Using Disposable Amperometric Biosensors Made Using Thick-Film Technology. In: *Analytica Chimica Acta* 442 (2001), Nr. 1, S. 35–44
- [2] ALDRIDGE, W.N.: Some properties of specific acetylcholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E605) and analogues. In: *Biochemical Journal* 46 (1950), S. 451–456
- [3] ALDRIDGE, W.N.: The Differentiation of True and Pseudo Cholinesterase by Organophosphorus Compounds. In: *Biochemical Journal* 53 (1953), S. 62–67
- [4] ALVAREZ, A. ; ALARCON, R. ; OPAZO, C. ; CAMPOS, E.O. ; MUÑOZ, F.J. ; CALDERON, F.H. ; DAJAS, F. ; GENTRY, M.K. ; DOCTOR, B.P. ; DE MELLO, F.G. ; INESTROSA, N.C.: Stable Complexes Involving Acetylcholinesterase and Amyloid- β Peptide Change the Biochemical Properties of the Enzyme and Increase the Neurotoxicity of Alzheimer's Fibrils. In: *The Journal of Neuroscience* 18 (1998), S. 3213–3223
- [5] ANDREESCU, S. ; FOURNIER, D. ; MARTY, J.L.: Development of Highly Sensitive Sensor Based on Bioengineered Acetylcholinesterase Immobilized by Affinity Method. In: *Analytical Letters* 36 (2003), Nr. 9, S. 1865–1885
- [6] ANDREOU, V.G. ; CLONIS, Y.D.: A Portable Fiber-Optic Pesticide Biosensor Based on Immobilized Cholinesterase and Sol-Gel Entrapped Bromocresol Purple for in-Field Use. In: *Biosensors & Bioelectronics* 17 (2002), Nr. 1-2, S. 61–69
- [7] ARDUINI, Fabiana ; AMINE, Aziz ; MOSCONE, Danila ; RICCI, Francesco ; PALLE-SCHI, Guisepe: Fast, sensitive and cost-effective detection of nerve agents in the gas phase using a portable instrument and an electrochemical sensor. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388 (2007), S. 1049–1057
- [8] ARIAS, Hugo R.: Localization of agonist and competitive antagonist binding sites on nicotinic acetylcholine receptors. In: *Neurochemistry International* 36 (2000), S. 595–645
- [9] ATACK, J.R. ; PERRY, E.K. ; BONHAM, J.R. ; PERRY, R.H.: Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in human plasma and cerebrospinal fluid. In: *Journal of Neurochemistry* 48 (1987), S. 1845–1850
- [10] BACHMANN, T.T. ; LECA, B. ; VILATTE, F. ; MARTY, J.L. ; FOURNIER, D. ; SCHMID, R.D.: Improved Multianalyte Detection of Organophosphates and Carbamates with

- Disposable Multielectrode Biosensors Using Recombinant Mutants of *Drosophila* Acetylcholinesterase and Artificial Neural Networks. In: *Biosensors & Bioelectronics* 15 (2000), Nr. 3-4, S. 193–201
- [11] BACHMANN, T.T. ; SCHMID, R.D.: A Disposable Multielectrode Biosensor for Rapid Simultaneous Detection of the Insecticides Paraoxon and Carbofuran at High Resolution. In: *Analytica Chimica Acta* 401 (1999), Nr. 1-2, S. 95–103
- [12] BADIA, A. ; ARNOLD, S. ; SCHEUMANN, V. ; ZIZLSPERGER, M. ; MACK, J. ; JUNG, G. ; KNOLL, W.: Probing the electrochemical deposition and/or desorption of self-assembled and electropolymerizable organic thin films by surface plasmon spectroscopy and atomic force microscopy. In: *Sensors and Actuators B* 54 (1999), S. 145–165
- [13] BAIN, Colin D. ; TROUGHTON, Barry E. ; TAO, Yu-Tai ; EVALL, Joseph ; WHITESIDES, George M. ; NUZZO, Ralph G.: Formation of Monolayer Films by the Spontaneous Assembly of Organic Thiols from Solution onto Gold. In: *Journal of the American Chemical Society* 111 (1989), S. 321–335
- [14] BAR-ON, P. ; MILLARD, C.B. ; HAREL, M. ; DVIR, H. ; ENZ, A. ; SUSSMAN, J.L. ; SILMAN, I.: Kinetic and Structural Studies on the Interaction of Cholinesterases with the Anti-Alzheimer Drug Rivastigmine. In: *Biochemistry* 41 (2002), Nr. 11, S. 3555–3564
- [15] BARAK, D. ; KRONMAN, C. ; ORDENTLICH, A. ; ARIEL, N. ; BROMBERG, A. ; MARCUS, D. ; LAZAR, A. ; VELAN, B. ; SHAFFERMAN, A.: Acetylcholinesterase Peripheral Anionic Site Degeneracy Conferred by Amino Acid Arrays Sharing a Common Core. In: *Journal of Biological Chemistry* 269 (1994), Nr. 9, S. 6296–6305
- [16] BARNETT, P. ; ROSENBERRY, T.L.: Functional Identity of Catalytic Subunits of Acetylcholinesterase. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 567 (1979), Nr. 1, S. 154–160
- [17] BAUER, C.G. ; EREMENKO, A.V. ; KUHN, A. ; KURZINGER, K. ; MAKOWER, A. ; SCHELLER, F.W.: Automated Amplified Flow Immunoassay for Cocaine. In: *Analytical Chemistry* 70 (1998), Nr. 21, S. 4624–4630
- [18] BERKMAN, C.E. ; UNDERINER, G.E. ; CASHMAN, J.R.: Stereoselective Inhibition of Human Butyrylcholinesterase by Phosphonothiolate Analogs of (+)- and (-)-Cocaine. In: *Biochemical Pharmacology* 54 (1997), Nr. 11, S. 1261–1266
- [19] BERMAN, H.A. ; DECKER, M.M.: Kinetic, Equilibrium, and Spectroscopic Studies on Dealkylation ("Aging") of Alkyl Organophosphonyl Acetylcholinesterase. Electrostatic Control of Enzyme Topography. In: *Journal of Biological Chemistry* 261 (1986), Nr. 23, S. 10646–10652
- [20] BONNET, Christine ; ANDREESCU, Silvana ; MARTY, Jean-Louis: Adsorption: an easy and efficient immobilisation of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes. In: *Analytica Chimica Acta* 481 (2003), S. 209–211

- [21] BOUBLIK, Yvan ; SAINT-AGUET, Pascale ; LOUGARRE, Andree ; ARNAUD, Muriel ; VILLATTE, Francois ; ESTRADA-MONDACA, Sandino ; FOURNIER, Didier: Acetylcholinesterase Engineering for Detection of Insecticide Residues. In: *Protein Engineering* 15 (2002), Nr. 1, S. 43–50
- [22] BOURNE, Y. ; TAYLOR, P. ; RADIC, Z. ; MARCHOT, P.: Structural Insights into Ligand Interactions at the Acetylcholinesterase Peripheral Anionic Site. In: *EMBO Journal* 22 (2003), Nr. 1, S. 1–12
- [23] BRADFORD, M.M.: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. In: *Analytical Biochemistry* 72 (1976), S. 248–254
- [24] BRICHTA, J. ; FRANEK, M.: Identification of Monoclonal Antibodies against 2,4-D Herbicide by Elisa and DNA Sequencing. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003), Nr. 21, S. 6091–6097
- [25] BROWNING, E.T.: Fluorometric Enzyme Assay for Choline and Acetylcholine. In: *Analytical Biochemistry* 46 (1972), Nr. 2, S. 624–638
- [26] CARMONA, Gilberto N. ; JUFER, Rebecca A. ; GOLDBERG, Steven R. ; GORELICK, David A. ; GREIG, Nigel H. ; YU, Qian-Sheng ; CONE, Edward J. ; SCHINDLER, Charles W.: Butyrylcholinesterase Accelerates Cocaine Metabolism: In Vitro and in Vivo Effects in Nonhuman Primates and Humans. In: *Drug Metabolism and Disposition* 28 (2000), Nr. 3, S. 367–371
- [27] CARUSO, F. ; RODDA, E. ; FURLONG, D.N.: Orientational Aspects of Antibody Immobilization and Immunological Activity on Quartz Crystal Microbalance Electrodes. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 178 (1996), Nr. 1, S. 104–115
- [28] CAVALLI, A. ; BOTTEGONI, G. ; RACO, C. ; DE VIVO, M. ; RECANATINI, M.: A Computational Study of the Binding of Propidium to the Peripheral Anionic Site of Human Acetylcholinesterase. In: *Journal of Medicinal Chemistry* 47 (2004), S. 3991–3999
- [29] CHAMBERS, J.E. ; MA, T. ; BOONE, H.W. S. C. S. Chambers: Role of detoxication pathways in acute toxicity levels of phosphorothionate insecticides in the rat. In: *Life Sciences* 54 (1994), S. 1357–1364
- [30] CHARPENTIER, A. ; MENOZZI, P. ; MARCEL, V. ; VILLATTE, F. ; FOURNIER, D.: A Method to Estimate Acetylcholinesterase-Active Sites and Turnover in Insects. In: *Analytical Biochemistry* 285 (2000), S. 76–81
- [31] CHATONNET, A. ; LOCKRIDGE, O.: Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. In: *Biochemical Journal* 260 (1989), S. 625–634
- [32] CLARK, Jr. L.C. ; WOLF, R. ; GRANGER, D. ; TAYLOR, Z.: Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. In: *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 6 (1953), S. 189–193

- [33] CONFERENCE OF THE STATE PARTIES: Reports on the Implementation of the Chemical Weapons Convention / Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons. 1997. – Annual Report. – Third session
- [34] COUSIN, X. ; BON, S. ; DUVAL, N. ; MASSOULIE, J. ; BON, C.: Cloning and Expression of Acetylcholinesterase from Bungarus Fasciatus Venom. A New Type of CooH-Terminal Domain; Involvement of a Positively Charged Residue in the Peripheral Site. In: *Journal of Biological Chemistry* 271 (1996), Nr. 25, S. 15099–15108
- [35] COUSSEN, F. ; AYON, A. ; LE GOFF, A. ; LEROY, J. ; MASSOULIE, J. ; BON, S.: Addition of a Glycophosphatidylinositol to Acetylcholinesterase. Processing, Degradation, and Secretion. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001), Nr. 30, S. 27881–27892
- [36] CUNHA, A.C. Borba d. ; ALDA, M.J. Lopez d. ; BARCELO, D. ; PIZZOLATO, T.M. ; SANTOS, J.H. dos: Multianalyte Determination of Different Classes of Pesticides (Acidic, Triazines, Phenyl Ureas, Anilines, Organophosphates, Molinate and Propanil) by Liquid Chromatography-Electrospray-Tandem Mass Spectrometry. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378 (2004), Nr. 4, S. 940–954
- [37] CURIE, Jaques ; CURIE, Pierre: Développement, par pression, de l'électricité polaire dans les cristaux hémihédres à faces inclinées. In: *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* 91 (1880), S. 294–295
- [38] CURIE, Jaques ; CURIE, Pierre: Les cristaux hémihédres à faces inclinées, comme sources constantes d'électricité. In: *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* 93 (1881), S. 204–207
- [39] CURIE, Jaques ; CURIE, Pierre: Dèformations électriques du quartz. In: *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* 95 (1882), S. 914–917
- [40] DANIELSSON, B. ; RIEKE, E. ; MATTIASSON, B. ; WINQUIST, F. ; MOSBACH, K.: Determination by the enzyme thermistor of cellobiose formed on degradation of cellulose. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* 6 (1981), S. 207–222
- [41] DAVIS, Frank ; LAW, Karen A. ; CHANIOTAKIS, Nikos A. ; FOURNIER, Didier ; GIBSON, Tim ; MILLNER, Paul ; MARTY, Jean-Louis ; SHEEHAN, Michelle A. ; OGURTSOV, Vladimir I. ; JOHNSON, Graham ; GRIFFITHS, John ; TURNER, Anthony P. ; HIGSON, Seamus P.: Ultra-sensitive determination of pesticides via cholinesterase-based sensors for environmental analysis. In: ALEGRET, Salvador (Hrsg.) ; MERKOÇI, Arben (Hrsg.): *Electrochemical Sensor Analysis* Bd. 49. Elsevier Science, 2007, Kapitel 15, S. 311–329
- [42] DECHER, Gero: Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. In: *Science* 277 (1997), S. 1232–1237
- [43] DEL CARLO, Michele ; MASCINI, Marcello ; PEPE, Alessia ; DILETTI, Gianfranco ; COMPAGNONE, Dario: Screening of Food Samples for Carbamate and Organophosphate Pesticides Using an Electrochemical Bioassay. In: *Food Chemistry* 84 (2004), Nr. 4, S. 651–656

- [44] DEVIC, Eric ; LI, Dunhai ; DAUTA, Alain ; HENRIKSEN, Peter ; CODD, Geoffrey A. ; MARTY, Jean-Louis ; FOURNIER, Didier: Detection of Anatoxin-a(S) in Environmental Samples of Cyanobacteria by Using a Biosensor with Engineered Acetylcholinesterases. In: *Applied and Environmental Microbiology* 68 (2002), Nr. 8, S. 4102–4106
- [45] DICKERT, F. L. ; BRUCKDORFER, Th. ; FEIGL, H. ; HAUNSCHILD, A. ; KUSCHOW, V. ; OBERMEIER, E. ; BULST, W.-E. ; KNAUER, U. ; MAGES, G.: Supramolecular detection of solvent vapours with QMB and SAW devices. In: *Sensors and Actuators B* 13-14 (1993), S. 297–301
- [46] DICKERT, Franz L. ; FORTH, Peter ; BULST, Wolf-Eckehard ; FISCHERAUER, Gerhard ; KNAUER, Ulrich: SAW devices-sensitivity enhancement in going from 80 MHz to 1 GHz. In: *Sensors and Actuators B* 46 (1998), S. 120–125
- [47] DICKERT, Franz L. ; HAYDEN, Oliver: Molecular imprinting in chemical sensing. In: *Trends in Analytical Chemistry* 18 (1999), S. 192–199
- [48] DICKERT, Franz L. ; LIEBERZEIT, Peter ; MIARECKA, Sylwia G. ; MANN, Karl J. ; HAYDEN, Oliver ; PALFINGER, Christian: Synthetic receptors for chemical sensors – subnano- and micrometre patterning by imprinting techniques. In: *Biosensors & Bioelectronics* 20 (2004), S. 1040–1044
- [49] DZYADEVYCH, S.V. ; SOLDATKIN, A.P. ; ARKHYPOVA, V.N. ; EL'SKAYA, A.V. ; CHOVELON, J.M. ; GEORGIU, C.A. ; MARTELET, C. ; JAFFREZIC-RENAULT, N.: Early-Warning Electrochemical Biosensor System for Environmental Monitoring Based on Enzyme Inhibition. In: *Sensors and Actuators B-Chemical* 105 (2005), Nr. 1, S. 81–87
- [50] *Kapitel Kommunikation innerhalb und zwischen Nervenzellen.* In: ECKERT, R. ; RANDALL, D. ; BURGGREN, W. ; FRENCH, K.: *Tierphysiologie*. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag, 2000, S. 196–197
- [51] EDWARDS, P.R. ; GILL, A. ; POLLARD-KNIGHT, D.V. ; HOARE, M. ; BUCKLE, P.E. ; LOWE, P.A. ; LEATHERBARROW, R.J.: Kinetics of Protein-Protein Interactions at the Surface of an Optical Biosensor. In: *Analytical Biochemistry* 231 (1995), Nr. 1, S. 210–217
- [52] EDWARDS, P.R. ; LEATHERBARROW, R.J.: Determination of Association Rate Constants by an Optical Biosensor Using Initial Rate Analysis. In: *Analytical Biochemistry* 246 (1997), Nr. 1, S. 1–6
- [53] ELLMAN, G.L. ; COURTNEY, K.D. ; ANDRES, Jr. V. ; FEATHER-STONE, R.M.: A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. In: *Biochemical Pharmacology* 7 (1961), S. 88–95
- [54] EREMENKO, A.V. ; BAUER, C.G. ; MAKOWER, A. ; KANNE, B. ; BAUMGARTEN, H. ; SCHELLER, F.W.: The Development of a Non-Competitive Immunoenzymometric Assay of Cocaine. In: *Analytica Chimica Acta* 358 (1998), Nr. 1, S. 5–13

- [55] ESTEVE-TURRILLAS, Francesc A. ; ARMENTA, Sergio ; MOROS, Javier ; GARRIGUES, Salvador ; PASTOR, Agustin ; GUARDIA, Miguel de l.: Validated, non-destructive and environmentally friendly determination of cocaine in euro bank notes. In: *Journal of Chromatography A* 1065 (2005), S. 321–325
- [56] EVTUGYN, G.A. ; IVANOV, A.N. ; GOGOL, E.V. ; MARTY, J.-L. ; BUDNIKOV, H.C.: Amperometric Flow-through biosensor for the determination of cholinesterase inhibitors. In: *Analytica Chimica Acta* 385 (1999), S. 13–21
- [57] FERRY, C. B. ; MARSHALL, Alan R.: The nature of the physiologically important cholinesterase at mammalian endplates. In: *European Journal of Pharmacology* 23 (1973), S. 111–114
- [58] FORGET, J. ; BOCQUENE, V.: Partial purification and enzymatic characterization of acetylcholinesterase from the intertidal marine copepod *Tigriopus brevicornis*. In: *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 123 (1999), S. 345–350
- [59] FORSBERG, Åke ; PUU, Gertrud: Kinetics for the inhibition of acetylcholinesterase from the electric eel by some organophosphates and carbamates. In: *European Journal of Biochemistry* 140 (1984), S. 153–156
- [60] FOURNIER, D. ; BRIDE, J.M. ; KARCH, F. ; BERGE, J.B.: Acetylcholinesterase from *Drosophila Melanogaster*. Identification of Two Subunits Encoded by the Same Gene. In: *FEBS Letters* 238 (1988), Nr. 2, S. 333–337
- [61] FOURNIER, Prof. D.: *Tableau des k_i (ki-insecticides4.xls)*. IPBS, Toulouse, 2002. – Persönliche Korrespondenz
- [62] FRANEK, M. ; KOLAR, V. ; GRANATOVA, M. ; NEVORANKOVA, Z.: Monoclonal ELISA for 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid - Characterization of Antibodies and Assay Optimization. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42 (1994), Nr. 6, S. 1369–1374
- [63] FUKADA, Eiichi ; YASUDA, Iwao: On The Piezoelectric Effect of Bone. In: *Journal of the Physical Society of Japan* 12 (1957), S. 1158–1162
- [64] GABL, R. ; FEUCHT, H.D. ; ZEININGER, H. ; ECKSTEIN, G. ; SCHREITER, M. ; PRIMIG, R. ; PITZER, D. ; WERSING, W.: First Results on Label-Free Detection of DNA and Protein Molecules Using a Novel Integrated Sensor Technology Based on Gravimetric Detection Principles. In: *Biosensors & Bioelectronics* 19 (2004), Nr. 6, S. 615–620
- [65] GEDDES, N. J. ; PASCHINGER, E. M. ; FURLONG, D. N. ; CARUSO, F. ; HOFFMANN, C. L. ; RABOLT, J. F.: Surface chemical activation of quartz crystal microbalance gold electrodes — analysis by frequency changes, contact angle measurements and grazing angle FTIR. In: *Thin Solid Films* 260 (1995), S. 192–199
- [66] GHINDILIS, Andrey L. ; SMITH, Maria W. ; SCHWARZKOPF, Kevin R. ; ROTH, Kristian M. ; PEYVAN, Kia ; MUNRO, Sandra B. ; LODES, Michael J. ; STÖVER, Axel G. ; BERNARDS, Karen ; DILL, Kilian ; MCSHEA, Andy: CombiMatrix oligonucleotide arrays: Genotyping

- and gene expression assays employing electrochemical detection. In: *Biosensors & Bioelectronics* 22 (2007), S. 1853–1860
- [67] GNAGEY, A.L. ; FORTE, M. ; ROSENBERRY, T.L.: Isolation and Characterization of Acetylcholinesterase from *Drosophila*. In: *Journal of Biological Chemistry* 262 (1987), Nr. 27, S. 13290–13298
- [68] GÜNTHER, Alexander ; BILITEWSKI, Ursula: Characterisation of inhibitors of acetylcholinesterase by an automated amperometric flow-injection system. In: *Analytica Chimica Acta* 300 (1995), S. 117–125
- [69] GOLIČNIK, Marko ; FOURNIER, Didier ; STOJAN, Jure: Acceleration of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase methanesulfonylation: peripheral ligand D-tubocurarine enhances the affinity for small methanesulfonyl fluoride. In: *Chemico-Biological Interactions* 139 (2002), S. 145–157
- [70] GRUNWALD, J. ; MARCUS, D. ; PAPIER, Y. ; RAVEH, L. ; PITTEL, Z. ; ASHANI, Y.: Large-Scale Purification and Long-Term Stability of Human Butyrylcholinesterase: A Potential Bioscavenger Drug. In: *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 34 (1997), Nr. 2, S. 123–135
- [71] GRUSS, R. ; SCHELLER, F. ; SHAO, M.J. ; LIU, C.C.: Electrochemical determination of cholinesterase activity and indication of its inhibitors using a thick-film metallized platinum electrode. In: *Analytical Letters* 22 (1989), S. 1159–1169
- [72] HALAMEK, J. ; MAKOWER, A. ; KNÖSCHE, K. ; SKLADAL, P. ; SCHELLER, F.W.: Piezoelectric affinity sensors for cocaine and cholinesterase inhibitors. In: *Talanta* 65 (2005), S. 337–342
- [73] HALAMEK, J. ; MAKOWER, A. ; SKLADAL, P. ; SCHELLER, F.W.: Highly Sensitive Detection of Cocaine Using a Piezoelectric Immunosensor. In: *Biosensors & Bioelectronics* 17 (2002), Nr. 11-12, S. 1045–1050
- [74] HALAMEK, J. ; PRIBYL, J. ; MAKOWER, A. ; SKLADAL, P. ; SCHELLER, F.W.: Sensitive detection of organophosphates in river water by means of a piezoelectric biosensor. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382 (2005), S. 1904–1911
- [75] HALAMEK, J. ; TELLER, C. ; MAKOWER, A. ; FOURNIER, D. ; SCHELLER, F.W.: EQCN Based Cholinesterase Biosensors. In: *Electrochimica Acta* 51 (2006), Nr. 24, S. 5174–5181
- [76] HALAMEK, J. ; TELLER, C. ; ZERAVIK, J. ; FOURNIER, D. ; MAKOWER, A. ; SCHELLER, F.W.: Characterization of Binding of Cholinesterases to Surface Immobilized Ligands. In: *Analytical Letters* 39 (2006), Nr. 8, S. 1491–1502
- [77] HALÁMEK, Jan: *Laboraufzeichnungen*. nicht publiziert, 2006
- [78] HAREL, M. ; SUSSMAN, J.L. ; KREJCI, E. ; BON, S. ; CHANAL, P. ; MASSOULIE, J. ; SILMAN, I.: Conversion of Acetylcholinesterase to Butyrylcholinesterase: Modeling and Mutagenesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (1992), Nr. 22, S. 10827–10831

- [79] HART, John P. ; HARTLEY, Ian C.: Voltammetric and Amperometric Studies of Thiocholine at a Screen-printed Carbon Electrode Chemically Modified With Cobalt Phthalocyanine: Studies Towards a Pesticide Sensor. In: *Analyst* 110 (1994), S. 259–263
- [80] HARWOOD, G.W. J. ; POUTON, Colin W.: Amperometric enzyme biosensors for the analysis of drugs and metabolites. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 18 (1996), S. 163–191
- [81] HEITEFUSS, Rudolf: *Pflanzenschutz - Grundlagen der praktischen Phytomedizin. 2.,* neubearb. und erw. Auflage. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 1987
- [82] HERMANNSON, Greg T.: *Bioconjugate techniques.* Academic Press, Inc., 1995
- [83] HERZSPRUNG, P.: *Methodische Grundlagen des Nachweises und der Bestimmung von insektiziden Phosphorsäureestern und Carbamaten im Wasser mittels Cholinesterasehemmung,* Lehrstuhl für Hydrogeologie, Hydrochemie und Umweltanalytik der Technischen Universität München, Diss., 1991
- [84] HILDEBRANDT, Helmut ; DORNBLÜTH, Otto ; PSCHYREMBEL, Willibald: *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. (258. Auflage).* Gruyter, 2002. – ISBN 3110148242
- [85] HOOGLIET, J.C. ; BENNEKOM, W.P. van: Gold Thin-Film Electrodes: An EQCM Study of the Influence of Chromium and Titanium Adhesion Layers on the Response. In: *Electrochimica Acta* 47 (2001), Nr. 4, S. 599–611
- [86] HORACEK, J. ; SKLADAL, P.: Improved Direct Piezoelectric Biosensors Operating in Liquid Solution for the Competitive Label-Free Immunoassay of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid. In: *Analytica Chimica Acta* 347 (1997), Nr. 1-2, S. 43–50
- [87] HUSSEIN, A.S. ; CHACON, M.R. ; SMITH, A.M. ; TOSADO-ACEVEDO, R. ; SELKIRK, M.E.: Cloning, Expression, and Properties of a Nonneuronal Secreted Acetylcholinesterase from the Parasitic Nematode *Nippostrongylus Brasiliensis*. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (1999), Nr. 14, S. 9312–9319
- [88] IMABAYASHI, Shin-ichiro ; HOBARA, Daisuke ; KAKIUCHI, Takashi ; KNOLL, Wolfgang: Selective Replacement of Adsorbed Alkanethiols in Phase-Separated Binary Self-Assembled Monolayers by Electrochemical Partial Desorption. In: *Langmuir* 13 (1997), S. 4502–4504
- [89] INESTROSA, N.C. ; ALVAREZ, A. ; PEREZ, C.A. ; MORENO, R.D. ; VICENTE, M. ; LINKER, C. ; CASANUEVA, O.I. ; SOTO, C. ; GARRIDO, J.: Acetylcholinesterase Accelerates Assembly of Amyloid- β -Peptides into Alzheimer's Fibrils: Possible Role of the Peripheral Site of the Enzyme. In: *Neuron* 16 (1996), S. 881–891
- [90] IVANOV, A. ; EVTUGYN, G. ; BUDNIKOV, H. ; RICCI, F. ; MOSCONE, D. ; PALLESCHI, G.: Cholinesterase sensors based on screen-printed electrodes for detection of organophosphorus and carbamic pesticides. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377 (2003), S. 624–631

- [91] JANSHOFF, A. ; GALLA, H.J. ; STEINEM, C.: Piezoelectric Mass-Sensing Devices as Biosensors – an Alternative to Optical Biosensors? In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 39 (2000), Nr. 22, S. 4004–4032
- [92] JEANTY, G. ; WOJCIECHOWSKA, A. ; MARTY, J.L. ; TROJANOWICZ, M.: Flow-Injection Amperometric Determination of Pesticides on the Basis of Their Inhibition of Immobilized Acetylcholinesterases of Different Origin. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373 (2002), Nr. 8, S. 691–695
- [93] JOHNSON, G. ; MOORE, S.W.: Cholinesterase-Like Catalytic Antibodies: Reaction with Substrates and Inhibitors. In: *Molecular Immunology* 37 (2000), Nr. 12-13, S. 707–719
- [94] JOHNSON, M.L.: Why, When, and How Biochemists Should Use Least Squares. In: *Analytical Biochemistry* 206 (1992), Nr. 2, S. 215–225
- [95] JOSS, L. ; MORTON, T. ; DOYLE, M. ; MYSZKA, G.: Interpreting kinetic rate constants from optical biosensor data recorded on a decaying surface. In: *Analytical Biochemistry* 261 (1998), S. 203–210
- [96] KANAZAWA, K. K. ; GORDON, Joseph G.: The Oscillation Frequency Of A Quartz Resonator In Contact With A Liquid. In: *Analytica Chimica Acta* 175 (1985), S. 99–105
- [97] KANAZAWA, K.K. ; GORDON, J.G.: Frequency of a Quartz Microbalance in Contact with Liquid. In: *Analytical Chemistry* 57 (1985), Nr. 8, S. 1770–1771
- [98] KANDEL, Eric R. ; SCHWARTZ, James H. ; JESSELL, Thomas M.: *Neurowissenschaften. Eine Einführung*. Spektrum Akademischer Verlag, 1995. – ISBN 3860253913
- [99] KIM, Taehoon ; LEE, Chang-Ha ; JOO, Sang-Woo ; LEE, Kangtaek: Kinetics of gold nanoparticle aggregation: Experiments and modeling. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 318 (2008), S. 238–243
- [100] KLEINJUNG, F.: *Sensorik und Kinetik von biochemischen Nukleinsäure-Wechselwirkungen an Oberflächen*, Universität Potsdam, Diss., 1998
- [101] KNÖSCHE, K. ; HALAMEK, J. ; MAKOWER, A. ; FOURNIER, D. ; SCHELLER, F.W.: Molecular recognition of cocaine by acetylcholinesterases for affinity purification and bio-sensing. In: *Biosensors & Bioelectronics* 20 (2004), S. 153–160
- [102] KOHLI, Neeraj ; VAIDYA, Sachin ; OFOLI, Robert Y. ; WORDEN, Robert M. ; LEE, Ilsoon: Arrays of lipid bilayers and liposomes on patterned polyelectrolyte templates. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 301 (2006), S. 461–469
- [103] KÖSSLINGER, C. ; DROST, S. ; ABERL, F. ; WOLF, H. ; KOCH, S. ; WOIAS, P.: A Quartz Crystal Biosensor for Measurement in Liquids. In: *Biosensors & Bioelectronics* 7 (1992), Nr. 6, S. 397–404
- [104] KÖSSLINGER, C. ; UTTENTHALER, E. ; ABEL, T. ; HAUCK, S. ; DROST, S.: Comparison of the Determination of Affinity Constants with Surface Plasmon Resonance and Quartz Crystal Microbalance. In: WHITE, N. M. (Hrsg.): *Euroensors XII*. Southampton, UK : Elsevier, 1998 (Sensors and Actuators), S. 845–848

- [105] KONNO, Nobuhiro ; SUZUKI, Nobuo ; HORIGUCHI, Hyogo ; FUKUSHIMA, Masaaki: Characterization of high-affinity binding sites for diisopropylfluorophosphate (DFP) from chicken spinal cord membranes. In: *Biochemical Pharmacology* 48 (1994), S. 2073–2079
- [106] KRALJ, M.B. ; TREBŠE, P. ; FRANKO, M.: Oxidation as a Pre-step in Determination of Organophosphorus Compounds by the AChE-TLS Bioassay. In: *Acta Chimica Slovenica* 53 (2006), S. 43–51
- [107] KULYS, Juozas ; D’COSTA, Eric J.: Printed amperometric sensor based on TCNQ and cholinesterase. In: *Biosensors & Bioelectronics* 6 (1991), S. 109–115
- [108] LAMLA, Thorsten ; ERDMANN, Volker A.: The Nano-tag, a streptavidin-binding peptide for the purification and detection of recombinant proteins. In: *Protein Expression and Purification* 33 (2004), S. 39–47
- [109] LEE, Hye-Sung ; KIM, Young A. ; CHO, Young A. ; LEE, Yong T.: Oxidation of organophosphorous pesticides for the sensitive detection by a cholinesterase-based biosensor. In: *Chemosphere* 46 (2002), S. 571–576
- [110] LEV, O. ; TSIONSKY, M. ; RABINOVICH, L. ; GLEZER, V. ; SAMPATH, S. ; PANKRATOV, I. ; GUN, J.: Organically Modified Sol-Gel Sensors. In: *Analytical Chemistry* 67 (1995), S. 22–30
- [111] LEVY, Drora ; ASHANI, Yacov: Synthesis and in vitro properties of a powerful quaternary methylphosphonate inhibitor of acetylcholinesterase A new marker in blood-brain barrier research. In: *Biochemical Pharmacology* 35 (1986), S. 1079–1085
- [112] LI, Yan ; QI, Honglan ; PENG, Yage ; YANG, Jia ; ZHANG, Chengxiao: Electrogenated chemiluminescence aptamer-based biosensor for the determination of cocaine. In: *Electrochemistry Communications* 9 (2007), S. 2571–2575
- [113] LIU, Guodong ; LIN, Yuehe: Biosensor Based on Self-Assembling Acetylcholinesterase on Carbon Nanotubes for Flow Injection/Amperometric Detection of Organophosphate Pesticides and Nerve Agents. In: *Analytical Chemistry* 78 (2006), S. 835–843
- [114] LIU, Y. ; YU, X. ; ZHAO, R. ; SHANGGUAN, D.H. ; BO, Z. ; LIU, G.: Real Time Kinetic Analysis of the Interaction between Immunoglobulin G and Histidine Using Quartz Crystal Microbalance Biosensor in Solution. In: *Biosensors & Bioelectronics* 18 (2003), Nr. 11, S. 1419–1427
- [115] LOCKRIDGE, O. ; BARTELS, C.F. ; VAUGHAN, T.A. ; WONG, C.K. ; NORTON, S.E. ; JOHNSON, L.L.: Complete Amino Acid Sequence of Human Serum Cholinesterase. In: *Journal of Biological Chemistry* 262 (1987), Nr. 2, S. 549–557
- [116] LUO, C. ; ASHANI, Y. ; DOCTOR, B.P.: Acceleration of Oxime-Induced Reactivation of Organophosphate-Inhibited Fetal Bovine Serum Acetylcholinesterase by Monoquaternary and Bisquaternary Ligands. In: *Molecular Pharmacology* 53 (1998), Nr. 4, S. 718–726

- [117] MAIN, A.R.: Mode of action of anticholinesterases. In: *Pharmaceutical Therapy* 6 (1979), S. 579–628
- [118] MAKOWER, A. ; HALAMEK, J. ; SKLADAL, P. ; KERNCHEN, F. ; SCHELLER, F.W.: New Principle of Direct Real-Time Monitoring of the Interaction of Cholinesterase and Its Inhibitors by Piezoelectric Biosensor. In: *Biosensors & Bioelectronics* 18 (2003), Nr. 11, S. 1329–1337
- [119] MAKOWER, Alexander ; BARMIN, Anatoli ; MORZUNOVA, Tatjana ; EREMENKO, Arkadi ; KUROCHKIN, Ilya ; BIER, Frank ; SCHELLER, Frieder: Affinity Enzymometric Assay for Detection of Organophosphorus Compounds. In: *Analytica Chimica Acta* 357 (1997), Nr. 1-2, S. 13–20
- [120] MALLENDER, W.D. ; SZEGLETES, T. ; ROSENBERRY, T.L.: Organophosphorylation of Acetylcholinesterase in the Presence of Peripheral Site Ligands. Distinct Effects of Propidium and Fasciculin. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (1999), Nr. 13, S. 8491–8499
- [121] MARNET, P.G. ; VOLLAND, H. ; PRADELLES, P. ; GRASSI, J. ; BEAUFILS, M.: Subpicogram Determination of Oxytocin by an Enzyme Immunoassay Using Acetylcholinesterase as Label. In: *Journal of immunoassay* 15 (1994), Nr. 1, S. 35–53
- [122] MARTIN, S.J. ; GRANSTAFF, V.E. ; FRYE, G.C.: Characterization of a quartz crystal microbalance with simultaneous mass and liquid loading. In: *Analytical Chemistry* 63 (1991), S. 2272–2281
- [123] MARTY, Jean-Louis ; GARCIA, Delphine ; ROUILLON, Regis: Biosensors: potential in pesticide detection. In: *Trends in Analytical Chemistry* 14 (1995), S. 329–333
- [124] MASCINI, M. ; CARLO, M. D. ; COMPAGNONE, D. ; COZZANI, I. ; TISCAR, P.G. ; MPAMHANGA, C.P. ; CHEN, B.: Piezoelectric Sensors Based on Biomimetic Peptides for the Detection of Heat Shock Proteins (HSPs) in Mussels. In: *Analytical Letters* 39 (2006), S. 1627–1642
- [125] MASSOULIE, J. ; PEZZEMENTI, L. ; BON, S. ; KREJCI, E. ; VALLETTE, F.M.: Molecular and Cellular Biology of Cholinesterases. In: *Progress in neurobiology* 41 (1993), Nr. 1, S. 31–91
- [126] MATSUNAGA, S. ; MOORE, R.E. ; NIEMCZURA, W.P. ; CARMICHAEL, W.W.: Anatoxin-a(s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. In: *Journal of the American Chemical Society* 111 (1989), S. 8021–8023
- [127] MATTES, C.E. ; LYNCH, T.J. ; SINGH, A. ; BRADLEY, R.M. ; KELLARIS, P.A. ; BRADY, R.O. ; DRETCHEN, K.L.: Therapeutic Use of Butyrylcholinesterase for Cocaine Intoxication. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 145 (1997), Nr. 2, S. 372–380
- [128] MAZZANTI, C.M. ; SPANEVELLO, R.M. ; OBREGON, A. ; PEREIRA, L.B. ; STREHER, C.A. ; AHMEDB, M. ; MAZZANTI, A. ; GRACA, D.L. ; MORSCH, V.M. ; SCHETINGER, M.R.C.: Ethidium bromide inhibits rat brain acetylcholinesterase activity in vitro. In: *Chemico-Biological Interactions* 162 (2006), S. 121–127

- [129] MELROY, O. ; KANAZAWA, K. ; GORDON, J.G. ; BUTTRY, D.: Direct Determination of the Mass of an Underpotentially Deposited Monolayer of Lead on Gold. In: *Langmuir* 2 (1986), S. 697–700
- [130] MITCHELL, K.M.: Acetylcholine and Choline Amperometric Enzyme Sensors Characterized in Vitro and in Vivo. In: *Analytical Chemistry* 76 (2004), Nr. 4, S. 1098–1106
- [131] MITTELBACH, Frank ; GOOSENS, Michel: *Der L^AT_EX-Begleiter*. Zweite überarbeitete und erweiterte Auflage. Pearson Studium, 2005
- [132] MRKSICH, M. ; WHITESIDES, G.M.: Using Self-Assembled Monolayers to Understand the Interactions of Man-Made Surfaces with Proteins and Cells. In: *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 25 (1996), S. 55–78
- [133] MULCHANDANI, Ashok ; CHEN, Wilfred ; MULCHANDANI, Priti ; WANG, Joseph ; ROGERS, Kim R.: Biosensors for direct determination of organophosphate pesticides. In: *Biosensors & Bioelectronics* 16 (2001), S. 225–230
- [134] NELSON, David L. ; COX, Michael M.: *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4. Auflage. Palgrave Macmillan, 2004
- [135] NIGG, H.N. ; KNAAK, J.B.: Blood Cholinesterases as Human Biomarkers of Organophosphorus Pesticide Exposure. In: *Reviews of environmental contamination and toxicology* 163 (2000), S. 29–111
- [136] Norm DIN 38415-1 1995. *Suborganismische Testverfahren (Gruppe T) - Teil 1: Bestimmung von Cholinesterase-hemmenden Organophosphat- und Carbamat-Pestiziden (Cholinesterase-Hemmtest)*
- [137] Norm DIN EN ISO 16264 Januar 2004. *Wasserbeschaffenheit - Bestimmung löslicher Silicate mittels Fließanalytik (FIA und CFA) und photometrischer Detektion*
- [138] NUNES, G.S. ; BARCELO, D. ; GRABARIC, B.S. ; DIAZ-CRUZ, J.M. ; RIBEIRO, M.L.: Evaluation of a Highly Sensitive Amperometric Biosensor with Low Cholinesterase Charge Immobilized on a Chemically Modified Carbon Paste Electrode for Trace Determination of Carbamates in Fruit, Vegetable and Water Samples. In: *Analytica Chimica Acta* 399 (1999), Nr. 1-2, S. 37–49
- [139] NUNES, G.S. ; MONTESINOS, T. ; MARQUES, P.B.O. ; FOURNIER, D. ; MARTY, J.L.: Acetylcholine Enzyme Sensor for Determining Methamidophos Insecticide - Evaluation of Some Genetically Modified Acetylcholinesterases from *Drosophila Melanogaster*. In: *Analytica Chimica Acta* 434 (2001), Nr. 1, S. 1–8
- [140] ORDENTLICH, A. ; BARAK, D. ; KRONMAN, C. ; ARIEL, N. ; SEGALL, Y. ; VELAN, B. ; SHAFFERMAN, A.: The Architecture of Human Acetylcholinesterase Active Center Probed by Interactions with Selected Organophosphate Inhibitors. In: *The Journal of Biological Chemistry* 271 (1996), S. 11953–11962

- [141] ORDENTLICH, Arie ; BARAK, Dov ; SOD-MORIAH, Gali ; KAPLAN, Dana ; MIZRAHI, Dana ; SEGALL, Yoffi ; KRONMAN, Chanoch ; KARTON, Yishai ; LAZAR, Arie ; MARCUS, Dino ; VELAN, Baruch ; SHAFFERMAN, Avigdor: The role of AChE active site gorge in determining stereoselectivity of charged and noncharged VX enantiomers. In: *Chemico-Biological Interactions* 157–158 (2005), S. 191–198
- [142] O'SHANNESY, D.J. ; BRIGHAM-BURKE, M. ; SONESON, K.K. ; HENSLEY, P. ; BROOKS, I.: Determination of Rate and Equilibrium Binding Constants for Macromolecular Interactions Using Surface Plasmon Resonance: Use of Nonlinear Least Squares Analysis Methods. In: *Analytical Biochemistry* 212 (1993), Nr. 2, S. 457–468
- [143] O'SULLIVAN, C.K. ; GUILBAULT, G.G.: Commercial Quartz Crystal Microbalances - Theory and Applications. In: *Biosensors & Bioelectronics* 14 (1999), Nr. 8-9, S. 663–670
- [144] PIEHLER, J. ; BRECHT, A. ; GIERSCH, T. ; HOCK, B. ; GAUGLITZ, G.: Assessment of Affinity Constants by Rapid Solid Phase Detection of Equilibrium Binding in a Flow System. In: *Journal of Immunological Methods* 201 (1997), Nr. 2, S. 189–206
- [145] PIEPER-FÜRST, Ursula ; KLEUSER, Ulrike ; STÖCKLEIN, Walter F. ; WARSINKE, Axel ; SCHELLER, Frieder W.: Detection of subpicomolar concentrations of human matrix metalloproteinase-2 by an optical biosensor. In: *Analytical Biochemistry* 332 (2004), S. 160–167
- [146] PRITCHARD, J. ; LAW, K. ; VAKUROV, A. ; MILLNER, P. ; HIGSON, S. P.: Sonochemically Fabricated Enzyme Microelectrode Arrays for the Environmental Monitoring of Pesticides. In: *Biosensors & Bioelectronics* 20 (2004), Nr. 4, S. 765–772
- [147] PUJOL, Marie-Laure ; CIRIMELE, Vincent ; TRITSCH, Pierre J. ; VILLAIN, Marion ; KINTZ, Pascal: Evaluation of the IDS One-Step(TM) ELISA kits for the detection of illicit drugs in hair. In: *Forensic Science International* 170 (2007), S. 189–192
- [148] QUINN, Daniel M.: Acetylcholinesterase - Enzyme Structure, Reaction Dynamics, and Virtual Transition-States. In: *Chemical Reviews* 87 (1987), Nr. 5, S. 955–979
- [149] RAMSDEN, J.J.: Puzzles and Paradoxes in Protein Adsorption. In: *Chemical Society Reviews* (1995), S. 73–78
- [150] REINER, Else ; RADIC, Zoran: Mechanism of action of cholinesterase inhibitors. In: GIACOBINI, Enzo (Hrsg.): *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors: Basic, preclinical and clinical aspects*. Taylor & Francis Ltd., 2000, S. 103–119
- [151] RICKERT, J. ; BRECHT, A. ; GOPEL, W.: Quartz Crystal Microbalances for Quantitative Biosensing and Characterizing Protein Multilayers. In: *Biosensors & Bioelectronics* 12 (1997), Nr. 7, S. 567–575
- [152] ROGERS, Kim R. ; FOLEY, Marlene ; ALTER, Stephen ; KOGA, Philip ; ELDEFRAWI, Mo-hyee: Light addressible potentiometric biosensor for the detection of anticholinesterases. In: *Analytical Letters* 24 (1991), S. 191–198

- [153] ROSENBERRY, Terrone L.: Catalysis by Acetylcholinesterase: Evidence that the Rate-Limiting Step for Acylation with Certain Substrates Precedes General Acid-Base Catalysis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (1975), S. 3834–3838
- [154] ROSENBERRY, T.L. ; MALLENDER, W.D. ; THOMAS, P.J. ; SZEGLETES, T.: A Steric Blockade Model for Inhibition of Acetylcholinesterase by Peripheral Site Ligands and Substrate. In: *Chemico-biological interactions* 119-120 (1999), S. 85–97
- [155] RUSLING, James F. (Hrsg.): *Surfactant Science*. Bd. 11: *Biomolecular Films: Design, Function, and Application*. Marcel Dekker, Inc., 2003
- [156] SAGANE, Y. ; NAKAGAWA, T. ; YAMAMOTO, K. ; MICHIKAWA, S. ; OGURI, S. ; MOMONOKI, Y.S.: Molecular Characterization of Maize Acetylcholinesterase. A Novel Enzyme Family in the Plant Kingdom. In: *Plant Physiology* 138 (2005), S. 1359–1371
- [157] SAPELNIKOVA, S. ; DOCK, E. ; SOLNA, R. ; SKLADAL, P. ; RUZGAS, T. ; EMNEUS, J.: Screen-Printed Multienzyme Arrays for Use in Amperometric Batch and Flow Systems. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376 (2003), Nr. 7, S. 1098–1103
- [158] SAUERBREY, G.Z.: Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. In: *Zeitschrift der Physik* 155 (1959), S. 206–212
- [159] SCHELLER, Frieder ; SCHUBERT, Florian: *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*. Bd. 11: *Biosensors*. Elsevier Science, 1992
- [160] SCHELLER, F.W. ; TELLER, C. ; HALAMEK, J. ; ZERAVIK, J. ; KINDLER, R. ; LAMOUREUX, L. ; FOURNIER, D. ; MAKOWER, A.: Hochempfindlicher Nachweis von Organophosphaten und Carbamaten. In: *46. Tutzing-Symposium: Sensorsysteme – Praxisanforderungen und Forschungstrends*, DECHEMA e.V., 2007, S. 28–29
- [161] SCHULZE, H. ; SCHMID, R.D. ; BACHMANN, T.T.: Activation of Phosphorothionate Pesticides Based on a Cytochrome P450 BM-3 (CYP102 A1) Mutant for Expanded Neurotoxin Detection in Food Using Acetylcholinesterase Biosensors. In: *Analytical Chemistry* 76 (2004), Nr. 6, S. 1720–1725
- [162] SCHULZE, H. ; VORLOVA, S. ; VILLATTE, F. ; BACHMANN, T.T. ; SCHMID, R.D.: Design of Acetylcholinesterases for Biosensor Applications. In: *Biosensors & Bioelectronics* 18 (2003), Nr. 2-3, S. 201–209
- [163] SELWOOD, T. ; FEASTER, S.R. ; STATES, M.J. ; PRYOR, A.N. ; QUINN, D.M.: Parallel mechanisms in acetylcholinesterasecatalyzed hydrolysis of choline esters. In: *Journal of the American Chemical Society* 115 (1993), S. 10477–10482
- [164] SHACKELFORD, W.M. ; GUILBAULT, G.G.: A piezoelectric detector for organophosphorus pesticides in the air. In: *Analytica Chimica Acta* 73 (1974), Nr. 2, S. 383–389
- [165] SHI, M.A. ; LOUGARRE, A. ; ALIES, C. ; FREMAUX, I. ; TANG, Z.H. ; STOJAN, J. ; FOURNIER, D.: Acetylcholinesterase Alterations Reveal the Fitness Cost of Mutations Conferring Insecticide Resistance. In: *BMC evolutionary biology* 4 (2004), Nr. 1, S. 5+

- [166] SKLADAL, P.: Piezoelectric Quartz Crystal Sensors Applied for Bioanalytical Assays and Characterization of Affinity Interactions. In: *Journal of the Brazilian Chemical Society* 14 (2003), Nr. 4, S. 491–502
- [167] SKLADAL, P. ; FIALA, M. ; KREJCI, J.: Detection of Pesticides in the Environment Using Biosensors Based on Cholinesterases. In: *International Journal of Environmental & Analytical Chemistry* 65 (1996), S. 139–148
- [168] SKLADAL, Petr: Detection of organophosphate and carbamate pesticides using disposable biosensors based on chemically modified electrodes and immobilized cholinesterase. In: *Analytica Chimica Acta* 269 (1992), S. 281–287
- [169] SMITH, A.D. (Hrsg.) ; DATTA, S.P. (Hrsg.) ; SMITH, G.H. (Hrsg.) ; CAMPBELL, P.N. (Hrsg.) ; BENTLEY, R. (Hrsg.) ; MCKENZIE, H.A. (Hrsg.): *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. Revised Edition. Oxford University Press, 2001
- [170] SOLNA, R. ; SAPELNIKOVA, S. ; SKLADAL, P. ; WINTHER-NIELSEN, M. ; CARLSSON, C. ; EMNEUS, J. ; RUZGAS, T.: Multienzyme Electrochemical Array Sensor for Determination of Phenols and Pesticides. In: *Talanta* 65 (2005), Nr. 2, S. 349–357
- [171] SOMERSET, Vernon S. ; KLINK, Michael J. ; SEKOTA, Mantoa M. ; BAKER, Priscilla G. ; IWUOHA, Emmanuel I.: Polyaniline-Mercaptobenzothiazole Biosensor for Organophosphate and Carbamate Pesticides. In: *Analytical Letters* 39 (2006), S. 1683 – 1698
- [172] SOTIROPOULOU, S. ; FOURNIER, D. ; CHANIOTAKIS, N.A.: Genetically Engineered Acetylcholinesterase-Based Biosensor for Attomolar Detection of Dichlorvos. In: *Biosensors & Bioelectronics* 20 (2005), Nr. 11, S. 2347–2352
- [173] SOTIROPOULOU, Sofia ; CHANIOTAKIS, Nikos A.: Lowering the detection limit of the acetylcholinesterase biosensor using a nanoporous carbon matrix. In: *Analytica Chimica Acta* 530 (2005), S. 199–204
- [174] STEPANOW, W.W. ; GRELL, H. (Hrsg.) ; MARUHN, K. (Hrsg.) ; RINOW, W. (Hrsg.): *Lehrbuch der Differentialgleichungen*. 4. Auflage. Deutscher Verlag der Wissenschaften, 1976
- [175] STROMMENGER, Birgit ; SCHMIDT, Christiane ; WERNER, Guido ; ROESSLE-LORCH, Beate ; BACHMANN, Till T. ; WITTE, Wolfgang: DNA microarray for the detection of therapeutically relevant antibiotic resistance determinants in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. In: *Molecular and Cellular Probes* 21 (2007), S. 161–170
- [176] SUN, H. ; PANG, Y.P. ; LOCKRIDGE, O. ; BRIMIJOIN, S.: Re-Engineering Butyrylcholinesterase as a Cocaine Hydrolase. In: *Molecular Pharmacology* 62 (2002), Nr. 2, S. 220–224
- [177] SUN, Hong ; EL YAZAL, Jamal ; LOCKRIDGE, Oksana ; SCHOPFER, Lawrence M. ; BRIMIJOIN, Stephen ; PANG, Yuan-Ping: Predicted Michaelis-Menten Complexes of Cocaine-Butyrylcholinesterase. Engineering Effective Butyrylcholinesterase Mutants for Cocaine Detoxication. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001), Nr. 12, S. 9330–9336

- [178] SZEGLETES, T. ; MALLENDER, W.D. ; THOMAS, P.J. ; ROSENBERRY, T.L.: Substrate Binding to the Peripheral Site of Acetylcholinesterase Initiates Enzymatic Catalysis. Substrate Inhibition Arises as a Secondary Effect. In: *Biochemistry* 38 (1999), Nr. 1, S. 122–133
- [179] TALESA, V. ; GRAUSO, M. ; ARPAGAUS, M. ; GIOVANNINI, E. ; ROMANI, R. ; ROSI, G.: Molecular Cloning and Expression of a Full-Length cDNA Encoding Acetylcholinesterase in Optic Lobes of the Squid *Loligo Opalescens*: A New Member of the Cholinesterase Family Resistant to Diisopropyl Fluorophosphate. In: *Journal of Neurochemistry* 72 (1999), Nr. 3, S. 1250–1258
- [180] TAMIYA, E. ; SUGIURA, Y. ; NAVERA, E.N. ; MIZOSHITA, S. ; NAKAJIMA, K. ; AKIYAMA, A. ; KARUBE, I.: Ultramicro acetylcholine sensor based on an enzyme-modified carbon fibre electrode. In: *Analytica Chimica Acta* 251 (1991), S. 129–134
- [181] TAMMELIN, L.E.: Choline esters. Substrates and inhibitors of cholinesterase. In: *Svensk Kemisk Tidskrift* 70 (1958), S. 157–181
- [182] TANAKA, M. ; SACKMANN, E.: Polymer-supported membranes as models of the cell surface. In: *Nature* 437 (2005), S. 656–663
- [183] TAYLOR, P. ; LAPPI, S.: Interaction of Fluorescence Probes with Acetylcholinesterase. The Site and Specificity of Propidium Binding. In: *Biochemistry* 14 (1975), Nr. 9, S. 1989–1997
- [184] TAYLOR, P. ; WONG, L. ; RADIC, Z. ; TSIGELNY, I. ; BRUGGEMANN, R. ; HOSEA, N.A. ; BERMAN, H.A.: Analysis of Cholinesterase Inactivation and Reactivation by Systematic Structural Modification and Enantiomeric Selectivity. In: *Chemico-biological interactions* 119-120 (1999), S. 3–15
- [185] TELLER, C.: *Charakterisierung von Cholinesterasen mittels reversiblen Inhibitor*, Universität Potsdam, Diplomarbeit, 2004
- [186] TELLER, C. ; HALAMEK, J. ; MAKOWER, A. ; FOURNIER, D. ; SCHULZE, H. ; SCHELLER, F.W.: A Piezoelectric Sensor with Propidium as a Recognition Element for Cholinesterases. In: *Sensors and Actuators B-Chemical* 113 (2006), Nr. 1, S. 214–221
- [187] TELLER, C. ; HALÁMEK, J. ; MAKOWER, A. ; SCHELLER, F.W.: A set of piezoelectric biosensors using cholinesterases. In: RASOOLY, A. (Hrsg.) ; HOMOLA, J. (Hrsg.) ; HEROLD, K. (Hrsg.): *Biosensors*. Humana Press, 2008 (Methods in Biotechnology). – im Druck
- [188] TELLER, C. ; HALÁMEK, J. ; ŽERAVÍK, J. ; STÖCKLEIN, W.F.M. ; SCHELLER, F.W.: A bi-functional sensor using haptenezed acetylcholinesterase. In: *Biosensors & Bioelectronics* 24 (2008), S. 111–117
- [189] Vornorm 01.03.2004. *Substance Data Sheet: Chlorpyrifos*. – Water Framework Directive 2000/60/EC (Annex - Environmental Quality Standards)

- [190] THEVENOT, Daniel R. ; TOTH, Klara ; DURST, Richard A. ; WILSON, George S.: Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. In: *Pure and Applied Chemistry* 71 (1999), S. 2333–2348
- [191] THIRUGNANAM, M. ; FORGASH, A.J.: Environmental Impact of Mosquito Pesticides: Toxicity and Anticholinesterase Activity of Chlorpyrifos to Fish in a Salt Marsh Habitat. In: *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 5 (1977), S. 415–425
- [192] TIJSSSEN, P. ; BURDON, R.H. (Hrsg.) ; KNIPPENBERG, P.H. van (Hrsg.): *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Bd. 15: *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*. Elsevier, 1985. – ISBN 0–444–80633–4
- [193] TURNER, J.M. ; LARSEN, N.A. ; BASRAN, A. ; BARBAS, 3rd C.F. ; BRUCE, N.C. ; WILSON, I.A. ; LERNER, R.A.: Biochemical Characterization and Structural Analysis of a Highly Proficient Cocaine Esterase. In: *Biochemistry* 41 (2002), Nr. 41, S. 12297–12307
- [194] TUSAROVA, I. ; HALAMEK, E. ; KOBLIHA, Z.: Study on Reactivation of Enzyme-Inhibitor Complexes by Oximes Using Acetylcholine Esterase Inhibited by Organophosphate Chemical Warfare Agents. In: *Enzyme And Microbial Technology* 25 (1999), Nr. 3-5, S. 400–403
- [195] VARDANYAN, R.S. ; HRUBY, V.J.: *Synthesis of Essential Drugs*. Elsevier Science, 2006. – ISBN 978–0444521668
- [196] VAYRON, P. ; RENARD, P.Y. ; TARAN, F. ; CREMINON, C. ; FROBERT, Y. ; GRASSI, J. ; MIOSKOWSKI, C.: Toward Antibody-Catalyzed Hydrolysis of Organophosphorus Poisons. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (2000), Nr. 13, S. 7058–7063
- [197] VILLATTE, F. ; MARCEL, V. ; ESTRADA-MONDACA, S. ; FOURNIER, D.: Engineering Sensitive Acetylcholinesterase for Detection of Organophosphate and Carbamate Insecticides. In: *Biosensors & Bioelectronics* 13 (1998), Nr. 2, S. 157–164
- [198] WAIBEL, Michael ; SCHULZE, Holger ; HUBER, Norbert ; BACHMANN, Till T.: Screen-printed bienzymatic sensor based on sol–gel immobilized *Nippostrongylus brasiliensis* acetylcholinesterase and a cytochrome P450 BM-3 (CYP102-A1) mutant. In: *Biosensors & Bioelectronics* 21 (2006), S. 1132–1140
- [199] WANG, Joseph: Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 19 (1999), S. 47–53
- [200] WARD, Michael D. ; BUTTRY, Daniel A.: In Situ Interfacial Mass Detection with Piezoelectric Transducers. In: *Science* 249 (1990), S. 1000–1007
- [201] WEILL, C.O. ; VORLOVA, S. ; BERNA, N. ; AYON, A. ; MASSOULIE, J.: Transcriptional regulation of gene expression by the coding sequence: An attempt to enhance expression of human AChE. In: *Biotechnology and Bioengineering* 80 (2002), S. 490–497
- [202] WESSLER, I. ; KILBINGER, H. ; BITTINGER, F. ; KIRKPATRICK, C.J.: The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans. In: *Japanese Journal of Pharmacology* 85 (2001), S. 2–10

- [203] WIKIPEDIA (Hrsg.): *Piezoelektrizität — Wikipedia, die freie Enzyklopädie.*
<http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Piezoelektrizit%C3%A4t&oldid=42023755>, Abruf: 19. März 2008
- [204] WILCHEK, M. ; BAYER, E.A.: Avidin – Biotin technology ten years on: has it lived up to its expectations? In: *Trends in Biotechnology and Biochemistry* 14 (1989), S. 408–412
- [205] WILSON, W. D. ; WANG, Yueh-Hwa ; KRISHNAMGORTHY, C.R. ; SMITH, J.C.: Intercalators as probes of DNA conformation: propidium binding to alternating and non-alternating polymers containing guanine. In: *Chemico-biological Interactions* 58 (1986), S. 41–56
- [206] WITTMACK, K. ; LAXHUBER, L. ; MÖHWALD, H.: Sample-thickness dependence and chemical effects in SIMS depth profiling of multilayer langmuir-blodgett films. In: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 18 (1986), S. 639–643
- [207] WOHLTJEN, H. ; DESSY, R.E.: Surface acoustic wave probe for chemical analysis. Introduction and instrument description. In: *Analytical Chemistry* 51 (1979), S. 1458–1475
- [208] XIE, Weihua ; ALTAMIRANO, Cibby V. ; BARTELS, Cynthia F. ; SPEIRS, Robert J. ; CASHMAN, John R. ; LOCKRIDGE, Oksana: An Improved Cocaine Hydrolase: The A328Y Mutant of Human Butyrylcholinesterase Is 4-Fold More Efficient. In: *Molecular Pharmacology* 55 (1999), Nr. 1, S. 83–91
- [209] ZERAVIK, J. ; TELLER, C. ; SCHELLER, F.W.: Analysis of Cholinesterase Binding to a Carnitine-Modified EQCM Sensor. In: *Biosensors & Bioelectronics* 22 (2006), S. 2244–2249
- [210] ZHANG, S. ; ZHAO, H. ; JOHN, R.: Development of a quantitative relationship between inhibition percentage and both incubation time and inhibitor concentration for inhibition biosensors – theoretical and practical considerations. In: *Biosensors & Bioelectronics* 16 (2001), S. 1119–1126

A. Anhang

Listing A.1: Perl-Skript für die Umwandlung der Labtools-Messdaten in ASCII-Listen

```
# Little Perl-script to convert LTG-files to TXT (ASCII)
# by Carsten Teller, University of Potsdam, Germany (copyright 2005-2007)
#
# Software is provided as-is! No warranty for function and/or disfunction!
#
# Can be used to convert the binary data from LTG-Files (created by the
# LabTools software by Prof. Petr Skladal, Masaryk University, Brno) to
# human readable ASCII-files.
# This makes IMHO data import for Origin and co. much easier. Data is provided
# in files like "testname.txt" where testname is the identifier of the dataset
# in the LTG-file.
# A Perl run-time environment needs to be installed (like the ActiveState
# distribution for Windows). Copy the script to the SAME folder as the LTG-
# files or vice versa. Start by double-click or via commandline:
# >perl convert_ltg_to_txt.pl
#
# The script will create a sub-folder with the same name as the LTG-file. Here
# will be stored: LTD-files as extracted from the group file (viewable in
# LabTools separatly) and the TXT-files containing the data in ASCII format.
# The first row of the created TXT-file contains the testname, the number of
# points (i.e. seconds) and the axis names as provided by the LabTools
# software.
# The script will also perform a VERY SIMPLE baseline correction, that is it
# will substract the first value (rounded) from all subsequent values. Slope
# correction for drifting etc. still needs to be done manually.
#
# This script maybe copied and used with a reference to the author of this
# software (Carsten Teller) and the author of LabTools (Petr Skladal). It
# must not be modified or distributed without my knowledge (though permission
# to do so will be granted in most cases).

@ltgliste = <*.ltg>;
$dec = 0; # punkt ist dezimaltrennzeichen

MENU:
system("cls");
$d = 0;
print "=====\n";
print "Little Perl-script to convert LTG-files to TXT (ASCII)\n";
print "   by Carsten Teller, University of Potsdam, Germany  \n";
print "=====\n\n";
print "Please choose the number of the file to be processed!\n\n";
while (defined ($dateiname = $ltgliste[$d])){
```

```

        print "[\$d] \$dateiname\n"; $d++;
    }
    if ($dec==0){
        print "\nDecimal separator is set to: dot (\.)\n";
        print "Enter \"d\" to change to comma (,)\n\n"
    }
    else {
        print "\nDecimal separator is set to: comma (,)\n";
        print "Enter \"d\" to change to dot (\.)\n\n"
    }

    print "Enter \"q\" to quit!\n\nFile number:";
    chomp($nummer = <STDIN>);

    if ($nummer =~/d/i){$dec = abs($dec - 1);
                        goto MENU;}
    if ($nummer =~/q/i){die("Bye,Bye!");}

    $datei = $ltgliste[$nummer];

    if ($datei =~ /(.)\.\.ltg/i) {
        $datei = $1 ;
    }
    unless (-e -d $datei){mkdir($datei);}

    open (INFILE, "$datei.ltg") or die "Cannot find file $!.ltg\n";
    binmode INFILE;

    $flags = pack("C*", 0xe1, 0xe, 0x10, 0x11);
    $ampere = 0; # nur piezoelektrische daten

    AUFTEILEN: while ($lesen = <INFILE>){
        $ltgdatei .= $lesen;}
    close (INFILE);
    @ltdfiles = split(/$flags/, $ltgdatei);
    # $zahl = @ltdfiles;
    #print "anzahl teile: $zahl\n";

    $header = shift(@ltdfiles);
    $extrakt = substr($header,2,2);
    $dsaetze = unpack("s", $extrakt);

    print "No. of datasets: $dsaetze\n";
    if ($dsaetze == @ltdfiles ){
        print "Splitting equals no. of datasets!\n";}
    else { print "Splitting DOES NOT equal no. of datasets!\n
    Probably due to amperometric data! Trying different flags!\n";
        $flags = pack("C*", 0xe1, 0xe, 0x12, 0x11);
        $ampere = 1; #auch amperometrische daten
        goto AUFTEILEN}

    $k = 1;
    foreach $file (@ltdfiles){
        open (LTDDATEI, ">$datei/test$k.ltd");
        push(@dateien, "test$k.ltd");
        binmode LTDDATEI;
    }

```

```

        print LTDDATEI $flags.$file;
        close (LTDDATEI);
        $k++;
    }
print "The following $dsaeetze file were written:\n";
foreach $ltdfile (@dateien){
    print "$ltdfile\n";
}

foreach $ascii (@dateien){

open (INFILE, "$datei/$ascii") or die "Cannot find $! !\n";
binmode INFILE; # ltd-datei binär einlesen

seek(INFILE, 5, 0); #gehe zu offset 4
read(INFILE, $data, 9); #laenge 9
$dataset = unpack("a8", $data); #lies namen des datensatzes
print "Processing dataset $dataset...\n";
open (OUTFILE, ">$datei/$dataset.txt"); #oeffne datei zum speichern

seek(INFILE, 13, 0); #gehe zu offset 13
read(INFILE, $punkte, 2); #laenge 2
$pzahl = unpack("s", $punkte); #lese zahl der messpunkte
print "N. of points: $pzahl\n";

seek(INFILE, 46, 0); #gehe zu offset 46
read(INFILE, $yaxis, 16); #laenge 16
$yname = unpack("A15", $yaxis); #lies y-beschriftung
print "Y1-axis: $yname\n";
if ($ampere == 1){ #lies y2-beschriftung
    seek(INFILE, 62, 0); #gehe zu offset 62
    read(INFILE, $y2axis, 16); #laenge 16
    $y2name = unpack("A15", $y2axis);
    print "Y2-axis: $y2name\n";
}

if ($ampere == 0){ #the piezo-case ($pzahl s)
    print OUTFILE "$dataset\t$yname\n";
    @liste = piezo(INFILE,$pzahl);
    $j=0;
    while ($j < $pzahl) {
        $zeit = sprintf("%.1f",$j+1);
        $deka = sprintf("%.3f",$liste[$j]);
        if ($dec != 0){
$zeit =~ tr/\./,/; #punkt durch komma ersetzen
        $deka =~ tr/\./,/;}
        print OUTFILE "$zeit\t$deka\n";
        $j++;
    }
} else { #the ampere-case
    print OUTFILE "# $dataset ($pzahl s)\t$yname\t$y2name\n";
    @liste = piezo(INFILE,$pzahl);
    @liste2 = strom(INFILE,$pzahl);
    $j=0;
    while ($j < $pzahl) {
        $zeit = sprintf("%.1f",$j+1);

```

```

        $deka = sprintf("%.3f",$liste[$j]);
        $deka2 = sprintf("%.6f",$liste2[$j]);
        if ($dec != 0){
$zeit =~ tr/\./,/; #punkt durch komma ersetzen
        $deka =~ tr/\./,/;
$deka2 =~ tr/\./,/;
        print OUTFILE "$zeit\t$deka\t$deka2\n";
        $j++;
    }
}
close (INFILE);
close (OUTFILE);

}
#subroutine zum auslesen der piezowerte
sub piezo { # syntax piezo(INFILE,$zahl)
    my ($datei,$punkte) = @_; # namen der parameter
    my $i = 0; #laufvariable
    my $wert;
    my $offset = 0; #einfache basislinienkorrektur
    my @piezo = ();
    seek($datei, 77, 0);
    while (read($datei, $wert, 4) && $i < $punkte) {
        $sentpackt = unpack ("f4",$wert);
        if ($i < 1){ $offset = sprintf("%.1f", $sentpackt); }
        $sentpackt = $sentpackt - $offset;
        @piezo = (@piezo,$sentpackt);
        $i++;
    }
    return @piezo;
}

}
#subroutine zum auslesen der strom-messung
sub strom { # syntax strom(INFILE,$zahl)
    my ($datei,$punkte) = @_; # namen der parameter
    my $i = 0; #laufvariable
    my $wert;
    my $offset = 0; #einfache basislinienkorrektur
    my @strom = ();
    seek($datei, 77+$punkte*4, 0);
    while (read($datei, $wert, 4) && $i < $punkte) {
        $sentpackt = unpack ("f4",$wert);
        if ($i < 1){ $offset = sprintf("%.5f", $sentpackt); }
        $sentpackt = $sentpackt - $offset;
        @strom = (@strom,$sentpackt);
        $i++;
    }
    return @strom;
}
}

```

B. Publikationen

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Artikel

1. HALÁMEK, J. ; TELLER, C. ; MAKOWER, A. ; FOURNIER, D. ; SCHELLER, F. W.: EQCN Based Cholinesterase Biosensors. In: *Electrochimica Acta* 51 (2006), Nr. 24, S. 5174–5181
2. TELLER, C. ; HALÁMEK, J. ; MAKOWER, A. ; FOURNIER, D. ; SCHULZE, H. ; SCHELLER, F. W.: A Piezoelectric Sensor with Propidium as a Recognition Element for Cholinesterases. In: *Sensors and Actuators B-Chemical* 113 (2006), Nr. 1, S. 214–221
3. HALÁMEK, J. ; TELLER, C. ; ŽERAVÍK, J. ; FOURNIER, D. ; MAKOWER, A. ; SCHELLER, F. W.: Characterization of Binding of Cholinesterases to Surface Immobilized Ligands. In: *Analytical Letters* 39 (2006), Nr. 8, S. 1491–1502
4. ŽERAVÍK, J. ; TELLER, C. ; SCHELLER, F. W.: Analysis of Cholinesterase Binding to a Carnitine-Modified EQCM Sensor. In: *Biosensors & Bioelectronics* 22 (2006), S. 2244–2249
5. TELLER, C. ; HALÁMEK, J. ; MAKOWER, A. ; SCHELLER, F. W.: A set of piezoelectric biosensors using cholinesterases. In: RASOOLY, A. (Hrsg.) ; HOMOLA, J. (Hrsg.) ; HEROLD, K. (Hrsg.): *Biosensors*. Humana Press, 2008 (Methods in Biotechnology)
6. TELLER, C. ; HALÁMEK, J. ; ŽERAVÍK, J. ; STÖCKLEIN, W. F. M. ; SCHELLER, F. W.: A bi-functional sensor using hapteneized acetylcholinesterase. In: *Biosensors & Bioelectronics* 24 (2008), S. 111–117

Konferenzbeiträge

1. C. TELLER, J. HALÁMEK, A. MAKOWER, F.W. SCHELLER: Molecular recognition of propidium by acetylcholinesterase – application in the field of biosensing (Poster) *The Eighth World Congress on Biosensors*, Granada, 2004.
2. C. TELLER, J. HALÁMEK, A. MAKOWER, F.W. SCHELLER: Propidium als Erkennungselement für Cholinesterase-Biosensoren (Poster) *4. Deutsches BioSensor Symposium*, Regensburg, 2005.

3. C. TELLER, J. HALÁMEK, A. MAKOWER, F.W. SCHELLER: Detection of multiple analytes using a combined piezoelectric and amperometric measuring set-up (Vortrag) *Potsdam-Lund Biosensors Workshop*, Luckenwalde, 2005.
4. C. TELLER, J. HALÁMEK, A. MAKOWER, F.W. SCHELLER: Surface modification of piezoelectric sensors for the molecular recognition of (acetyl)cholinesterases (Poster) *GBM Herbsttagung*, Berlin, 2005.
5. C. TELLER, J. HALÁMEK, A. MAKOWER, F.W. SCHELLER: Propidium as recognition element for cholinesterase biosensors (Poster) *Workshop of the Marie-Curie Project „EST on Biomimetic Systems“*, Potsdam, 2005
6. C. TELLER, J. HALÁMEK, J. ŽERAVÍK, A. MAKOWER, F.W. SCHELLER: Combining piezoelectric and amperometric measurements for the detection of anti-cholinesterase acting compounds (Vortrag) *The Ninth World Congress on Biosensors*, Toronto, 2006.
7. C. TELLER, J. HALÁMEK, J. ŽERAVÍK, W. STÖCKLEIN, F.W. SCHELLER: Verwendung chemisch modifizierter Acetylcholinesterase zur Bestimmung von Organophosphaten und Kokain (Vortrag) *5. Deutsches BioSensor Symposium*, Bochum, 2007.
8. F.W. SCHELLER, C. TELLER, J. HALÁMEK, J. ŽERAVÍK, R. KINDLER, L. LAMOUREUX, D. FOURNIER, A. MAKOWER[†]: Hochempfindlicher Nachweis von Organophosphaten und Carbamaten (Vortrag) *46. Tutzing-Symposium: Sensorsysteme – Praxisanforderungen und Forschungstrends*, Tutzing, 2007.
9. F.W. SCHELLER, C. TELLER, K. LETTAU: Bifunctional Biomimetic Sensors (Vortrag) *XIX. International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, Toulouse, 2007.
10. C. TELLER: Bifunctional recognition layer based on haptentized cholinesterase. (Vortrag) *Workshop on Bioanalysis*, Luckenwalde, 2007.
11. C. TELLER, W.F.M. STÖCKLEIN, F.W. SCHELLER: A Bifunctional Recognition Layer Based On Haptentized Acetylcholinesterase. (Vortrag) *The Tenth World Congress on Biosensors*, Shanghai, 2008.

Colophon

Die vorliegende Arbeit wurde in $\text{\LaTeX} 2_{\epsilon}$ unter Benutzung von KOMA-Script, AMS- \LaTeX und \BIBTeX gesetzt. Ein große Hilfe bei der Erstellung dieses Dokuments war „Der \LaTeX -Begleiter“ von Mittelbach und Goosens [131].

Als Brotschrift kam Morri Bentons *New Century Schoolbook* zum Einsatz. Für serifenlose Typen wurde eine skalierte Helvetica verwendet. Das Perl-Listing wurden in Courier gesetzt. Für den Mathematiksatz wurden passende Typen aus dem Fourier-GUTenberg-Projekt benutzt.

C. Abkürzungen

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
2,4-D-AChE	mit 2,4-D modifizierte Acetylcholinesterase
Å	Angström, 1 Å = 0,1 nm
AChE	Acetylcholinesterase
AK	Antikörper
APS	Aminoperoxosulfat
ATC	Acetylthiocholin
BChE	Butyrylcholinesterase
BSA	Rinderserumalbumin, <i>bovine serum albumin</i>
<i>t</i>-Bu	<i>tert</i> -Butylgruppe
BZE	Benzoylecgonin
BZE-AChE	mit BZE-DADDO modifizierte Acetylcholinesterase
BZE-DADDO	<i>N</i> -(8-Amino-3,4-dioxaoctan)benzoylecgoninamid
CPO	Chlorpyrifos-oxon
CPS	Chlorpyrifos, <i>O,O</i> -Diethyl- <i>O</i> -3,5,6-trichlor-2-pyridylphosphorthionat
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DGL	Differentialgleichung
ChE	Cholinesterase
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
EA	Enzymaktivität
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid

EeAChE	AChE aus <i>Electrophorus electricus</i>
ELISA	Enzym-basierter Immunoassay, <i>enzyme-linked immuno-sorbent assay</i>
EQCM	Kombination elektrochemischer und piezoelektrischer Messungen, <i>electrochemical QCM</i>
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie
GABA	γ -Aminobuttersäure
GC-MS	Kombination von Gaschromatographie und Massenspektrometrie
Hz	Hertz, $1 \text{ Hz} = 1 \text{ s}^{-1}$
IC₅₀	Konzentration bei 50% Inhibition
IUPAC	International Union for Pure and Applied Chemistry
LOD	Nachweisgrenze, <i>limit of detection</i>
M	Molar, $1 \text{ M} = 1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
Me	Methylgruppe
MEPQ	7-(Methylethoxyphosphinyloxy)1-methyl-chinoliniumion
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MIP	molekular geprägtes Polymer, <i>molecularly imprinted polymer</i>
MU	11-Mercaptoundecanol
MUA	11-Mercaptoundecansäure
MWCO	Ausschlußgrenze, <i>molecular weight cut-off</i>
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
OD	Optische Dichte
iso-OMPA	Diphosphorsäuretetra(isopropylamid)
OP	Organophosphat
PAS	periphere anionische Bindungsstelle, <i>peripheral anionic site</i>
POD	Peroxidase
Propidium	3,8-Diamino-5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-phenylphenanthridiniumion
QCM	Quarkristallmikrowaage, <i>quartz crystal microbalance</i>
RT	Raumtemperatur
SAM	selbstorganisierte Monoschicht, <i>self-assembled monolayer</i>

SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	Silica-Nanopartikel
SPR	Oberflächenplasmonresonanz, <i>surface plasmon resonance</i>
TcAChE	AChE aus dem Rochen <i>Torpedo californica</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TMA	Tetramethylammoniumion
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNTU	2-(5-Norbornen-2,3-dicarboximido)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
VK	Variationskoeffizient, Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert
VX	Tammelinscher Ester, <i>O</i> -Ethyl-(<i>S</i>)-2-isopropylaminoethylmethylphosphonothiolat

Danksagung

Herrn Prof. Frieder W. Scheller gilt mein Dank für die Bereitstellung des Themas und der hervorragenden Arbeitsbedingungen im Bereich der Analytischen Biochemie sowie der jederzeit gewährten Unterstützung beim Fortgang der Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Arbeitskreis bedanken. Dr. Alexander Makower[†] hat mich schon während meiner Diplomarbeit betreut und auch die Anfänge meiner Doktorarbeit durch wertvolle Diskussionen unterstützt. Leider durfte er den Abschluss dieser Arbeit nicht mehr erleben. Dr. Walter F.M. Stöcklein und Dr. Jiří Žeravík haben mich über die zweite Hälfte meiner Doktorarbeit begleitet und haben mich bei der Diskussion der Bindungsdaten unterstützt. Ein besonderer Dank gilt Dr. Jan Halánek, der über die Jahre von meiner Diplomarbeit bis heute nicht nur ein Kollege war, sondern auch ein guter Freund geworden ist.

Auch den übrigen Mitarbeitern der Analytischen Biochemie gilt mein Dank: insbesondere Frau Lehmann, die viele Routineversuche gemessen hat und im Labor immer all die Arbeiten erledigte, die erst auffallen, wenn sie nicht gemacht werden. Außerdem möchte ich mich bei Kristian Lettau und Moritz Beissenhirtz bedanken, mit denen man nicht nur ausschließlich wissenschaftliche Themen diskutieren konnte und die weiterhin meine Begeisterung für den Wassersport geweckt und damit einen guten Ausgleich zum Laboralltag geschaffen haben. Bei meinen Freunden – nah und fern – möchte ich mich für die Unterstützung bedanken, auch wenn ich manchmal keine Zeit für sie hatte.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre moralische, wissenschaftliche und finanzielle Unterstützung und ihr beständiges Interesse an meinem wissenschaftlichen Werdegang. Ebenso danke ich meinem Bruder Henrik für das ständige Interesse an meiner Arbeit und das kritische Korrekturlesen.

Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich bei der „International Max Planck Research School on Biomimetic Systems“ für das Doktorandenstipendium und der Europäischen Union, die im Rahmen des Marie-Curie-Programms Nr. HPMD-CT-2001-00062 die Mittel für Geräte, Chemikalien und die Teilnahme an wissenschaftlichen Konferenzen zur Verfügung stellte.