

Universität Potsdam

Institut für Biochemie und Biologie

Charakterisierung und wechselfeldgestützte Herstellung von Enzym-Nanoarrays

Mareike Prüfer

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

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

Ort und Tag der Disputation: Potsdam, 25.10.2023

Die Publikation ist durch das Urheberrecht und/oder verwandte Schutzrechte geschützt. Nutzende sind berechtigt, die Publikation in jeder Form zu nutzen, die das Urheberrechtsgesetz (UrhG) und/oder einschlägige verwandte Schutzrechte gestatten. Für weitere Nutzungsarten ist die Zustimmung der Rechteinhaber*innen einzuholen.

<https://rightsstatements.org/page/InC/1.0/>

Hauptbetreuer: Prof. Dr. Frank F. Bier

Betreuer: PD Dr. Ralph Hölzel

Gutachter: Prof. Dr. Frank F. Bier, PD Dr. Ralph Hölzel, Prof. Dr. Mario Birkholz

Online veröffentlicht auf dem

Publikationsserver der Universität Potsdam:

<https://doi.org/10.25932/publishup-61232>

<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-612329>

Diese Arbeit wurde unter der Aufsicht von Prof. Dr. Frank F. Bier in der Zeit von Oktober 2018 bis April 2023 am Fraunhofer IZI-BB (Institut für Zelltherapie und Immunologie, Institutsteil Bioanalytik und Bioprozesse), betreut von PD Dr. Ralph Hölzel in dessen Arbeitsgruppe Biomolekulare Nanostrukturen und Messtechnik, durchgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. Frank F. Bier

(A) Universität Potsdam

Institut für Biochemie und Biologie

Arbeitsgruppe: Molekulare Bioanalytik und Bioelektronik

PD Dr. Ralph Hölzel

(B) Fraunhofer IZI-BB, Potsdam

Abteilung Biosystemintegration und Prozessautomation

Arbeitsgruppe: Biomolekulare Nanostrukturen und Messtechnik

(C) Freie Universität Berlin

Institut für Biologie

Prof. Dr. Mario Birkholz

(D) IHP-Leibniz-Institut für innovative Mikroelektronik, Frankfurt-Oder

Joint Lab Bioelectronics

(E) Technische Universität Berlin

Institut für Biotechnologie

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht

Publikationen

M. Prüfer, S. Stanke, F.F. Bier und R. Hölzel: *Catalytic activity of glucose oxidase after dielectrophoretic immobilization on nanoelectrodes*. *Electrophoresis* (2023), veröffentlicht online am 09.03.2023.

M. Prüfer, C. Wenger, F. F. Bier, E.-M. Laux u. R. Hölzel: *Activity of AC electrokinetically immobilized horseradish peroxidase*. *Electrophoresis* 43 (2022) 18-19, S. 1920–1933

Konferenzbeiträge

Poster: M. Prüfer, C.Wenger, F. F. Bier, R. Hölzel: *AC electric field mediated preparation of regular enzyme arrays and their functional characterization*. 4th International Conference on Dielectrophoresis, Flagstaff, Arizona (USA) und Online, 26.-28.07.2021

(Best Poster Award)

Poster: M. Noffke, C.Wenger, F. F. Bier, R. Hölzel: *AC electric field mediated preparation of regular enzyme arrays and their functional characterization*. 3rd European Biosensor Symposium, Online, 09.-12.03.2021

Poster: M. Noffke, C.Wenger, X. Knigge, F. F. Bier, R. Hölzel: *Production and characterization of enzyme nanoarrays assisted by alternating electric fields*. *Single-Molecule Sensors and nanoSystems*, München (D), 03.-05.04.2019

Poster: M. Noffke, X. Knigge, C.Wenger, F. F. Bier, R. Hölzel: *Production and Characterization of Enzyme Nanoarrays Assisted by Alternating Electric Fields*. 2nd European Biosensor Symposium, Florenz (I), 18.-21.02.2019

Kurzfassung

Dielektrophorese ist die Manipulation polarisierbarer Partikel durch inhomogene elektrische Wechselfelder. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Enzyme durch Dielektrophorese immobilisiert und anschließend hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivität untersucht: Meerrettichperoxidase, Cholinoxidase aus *Alcaligenes sp.* und Glucoseoxidase aus *Aspergillus niger*. Die Immobilisierung erfolgte durch Dielektrophorese auf nano-Elektrodenarrays aus Wolfram-Zylindern mit 500 nm Durchmesser oder aus Titannitrid-Ringen mit 20 nm Breite. Die Immobilisierung der Enzyme konnte fluoreszenzmikroskopisch entweder anhand der intrinsischen Fluoreszenz oder aufgrund einer Fluoreszenzmarkierung vor oder nach der Immobilisierung für alle getesteten Enzyme nachgewiesen werden. Die Messung der Enzymaktivität erfolgte quantitativ durch den direkten oder indirekten Nachweis des gebildeten Produktes oder, im Falle der Cholinoxidase, durch Beobachtung der intrinsischen Fluoreszenz des Cofaktors FAD, die vom Oxidationszustand dieses Enzyms abhängt. Für die Meerrettichperoxidase konnte so eine hohe erhaltene Enzymaktivität nach der Immobilisierung nachgewiesen werden. Die Aktivität der permanent immobilisierten Fraktion der Meerrettichperoxidase entsprach bis zu 47 % der höchstmöglichen Aktivität einer Monolage dieses Enzyms auf den Elektroden des Chips. Diese Aktivität kann als aktive, aber zufällig gegenüber der Oberfläche ausgerichtete Enzymschicht interpretiert werden. Für die permanent immobilisierte Glucoseoxidase wurde nur eine Aktivität entsprechend <1,3 % der Aktivität einer solchen Enzymschicht detektiert, während für die immobilisierte Cholinoxidase gar keine Aktivität nachgewiesen werden konnte. Die Aktivität der durch DEP immobilisierten Enzyme konnte somit quantitativ bestimmt werden. Der Anteil an erhaltener Aktivität hängt dabei stark vom verwendeten Enzym ab.

Abstract

Dielectrophoresis is the manipulation of polarizable particles by alternating inhomogeneous electric fields. In this work, three enzymes were immobilized by dielectrophoresis and were analyzed regarding their catalytic activity afterwards: Horseradish peroxidase, choline oxidase from *Alcaligenes sp.* and glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Immobilization by dielectrophoresis took place on nanoelectrode arrays consisting of tungsten cylinders with a diameter of 500 nm or of titanium nitride rings with a width of 20 nm. Immobilization was verified by fluorescence microscopy using either the intrinsic fluorescence of the enzymes or fluorescent labeling of the enzymes before or after immobilization. Enzyme activity measurements were performed quantitatively by direct or indirect detection of the enzyme's product or, in the case of choline oxidase, by observing the intrinsic fluorescence of the enzyme's cofactor FAD which is a function of its oxidation state. For horseradish peroxidase, a rather high retained activity of the enzyme after immobilization was observed. The activity of the permanently immobilized fraction of horseradish peroxidase equaled up to 47 % of the activity which can be maximally expected for a fully active monolayer of the enzyme molecules on all electrodes of the chip. This activity can be interpreted as the result of a fully active, but randomly oriented monolayer of immobilized horseradish peroxidase. The activity of permanently immobilized glucose oxidase equaled only <1,3 % of a fully active monolayer, whereas no activity was evident for immobilized choline oxidase. Accordingly, the activity of enzymes immobilized by DEP was measured quantitatively. The percentage of retained activity thereby strongly depends on the enzyme under investigation.

Inhalt

1. Einleitung	10
1.1. Idee und Motivation	10
1.2. Einordnung in die Literatur	12
1.2.1. Dielektrophorese	12
1.2.2. Untersuchte Enzyme und ihre Besonderheiten	16
1.3. Ziel dieser Arbeit	23
2. Material und Methoden	24
2.1. Material	24
2.1.1. Chemikalien	24
2.1.2. Messgeräte.....	25
2.1.3. Proteine und Enzyme	25
2.1.4. Elektroden	27
2.2. Methoden	31
2.2.1. Dielektrophorese	31
2.2.2. Mikroskopie	33
2.2.3. Enzymassays	35
2.2.4. Proteinnachweis nach Lowry	39
2.2.5. Dynamische Lichtstreuung (DLS)	40
3. Ergebnisse und Diskussion	41
3.1. Qualitätskontrolle der Enzyme und Elektrodenchips.....	41
3.1.1. Funktionstest der TiN-Elektroden durch DEP mit Beads	41
3.1.2. Kontrolle der Enzyme auf Aggregation am DLS.....	42
3.2. DEP mit fluoreszenzmarkierter HRP	44
3.2.1. Fluoreszenzmarkierte HRP auf W-Zylinderelektroden.....	44
3.2.2. Fluoreszenzmarkierte HRP auf TiN-Ringelektroden.....	45
3.2.3. Diskussion.....	45
3.3. Aktivität immobilisierter HRP nach DEP auf TiN-Ringelektroden.....	47

3.3.1.	Entwicklung des On-Chip-Assays für die HRP-Aktivität	47
3.3.2.	Aktivität der HRP nach DEP: drei Modelle für die Stabilität..... des Immobilisats	50
3.3.3.	Fluoreszenzmikroskopie nach dem Umsatz:	
	Hinweise auf die Verteilung der HRP	54
3.3.4.	Unspezifische Adsorption ohne Feldeinwirkung	55
3.3.5.	Immobilisierung inaktiver Proteine als Blindproben	57
3.3.6.	Diskussion.....	58
3.4.	DEP mit ChOx	61
3.4.1.	Detektion anhand der intrinsischen Fluoreszenz	61
3.4.2.	Rasterelektronenmikroskopie an immobilisierter ChOx.....	63
3.4.3.	Diskussion.....	64
3.5.	DEP mit GOx.....	67
3.5.1.	Fluoreszenzmikroskopie an immobilisierter GOx	67
3.5.2.	Entwicklung eines gekoppelten On-Chip Enzymassays	69
3.5.3.	Aktivitätsmessungen an immobilisierter GOx.....	71
3.5.4.	Diskussion.....	74
3.6.	Vergleich der Enzymaktivitäten nach Immobilisierung durch DEP.....	75
3.6.1.	Aktivitätsmessung an immobilisierter HRP mit verlängerten Messzyklen	75
3.6.2.	Diskussion der erzielten Enzymaktivitäten für drei verschiedene Enzyme	
	nach Immobilisierung durch DEP.....	76
4.	Fazit und Ausblick.....	81
5.	Literatur	85
Anhang.....		99
	ImageJ Macros für die automatisierte Bildauswertung	99
	Danksagung	103
	Selbstständigkeitserklärung	104

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
BSA	Bovines Serum Albumin
ChOx	Cholinoxidase
dH ₂ O	Reinstwasser
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
GOx	Glucoseoxidase
HRP	Meerrettich-Peroxidase
KPi	Kalium-Phosphatpuffer
LOD	Detektionsgrenze
LOQ	Quantifizierungsgrenze
NA	numerische Apertur
PEG	Polyethylenglycol
REM	Rasterelektronenmikroskop

Formelzeichen

Symbol	Bedeutung
F	Kraft
E	Elektrische Feldstärke
ϵ	Permittivität
r	Radius
d	Durchmesser
K	Clausius-Mossotti-Faktor
ω	Kreisfrequenz
V _{RMS}	Effektivspannung
σ	Standardabweichung
c	Konzentration
κ	Leitfähigkeit

1. Einleitung

1.1.Idee und Motivation

Durch einen Biosensor kann ein Analyt mit Hilfe eines biologischen Erkennungselements detektiert werden. Dabei wird das biologische Signal über einen Transducer in ein elektrisches übertragen. In Biosensoren wird eine Vielzahl möglicher Erkennungselemente verwendet, z.B. Antikörper, Enzyme oder Nukleinsäuren, sowie verschiedene Methoden der Signalübertragung, die auf Prinzipien der Elektrochemie, Optik, Kalorimetrie oder Akustik basieren können [1]. Auch die Anwendungsbereiche der Biosensorik sind vielfältig. Biosensoren sind unter anderem relevant für die Landwirtschaft und Lebensmittelsicherheit, die Prozesstechnik sowie die Umweltüberwachung. Die wichtigsten und vielversprechendsten Anwendungen liegen jedoch in der Medizin. Biosensoren ermöglichen sowohl die Früherkennung von Krankheiten als auch das engmaschige Monitoring und können so helfen, die Lebensspanne von Patienten zu verlängern und Lebensqualität zu erhalten [2]. Besonders vielversprechend, aber auch anspruchsvoll, ist die Entwicklung implantierbarer Biosensoren, die durch Fortschritte in der Miniaturisierung, Biokompatibilität, Haltbarkeit und Energieversorgung der Sensoren ermöglicht wird [2, 3].

Meist werden die Fängermoleküle für die Verwendung in einem Biosensor immobilisiert. Für die Immobilisierung verschiedener Biomoleküle, z.B. von DNA, Antikörpern oder anderer Proteine, kann ein AC-elektrischer Effekt, die Dielektrophorese (DEP), genutzt werden [4–7]. Durch DEP können die Biomoleküle nicht nur immobilisiert, sondern auch vereinzelt und ausgerichtet werden [8, 9]. Dies macht die Methode interessant für Einzelenzymmolekül-Experimente. Außerdem könnten auf diese Weise immobilisierte und ausgerichtete Biomoleküle in Biosensoren verwendet werden. Die Ausrichtung kann sich dabei positiv auf die biologische Aktivität des Moleküls und somit auf die Empfindlichkeit des Sensors auswirken [10, 11]. Einzeln ansteuerbare Subarrays oder Elektroden ermöglichen außerdem die Immobilisierung verschiedener Moleküle auf demselben Chip und somit das Multiplexing in einem Sensor.

Außer der Immobilisierung des Erkennungselements könnten die Elektroden weitere Funktionen des Sensors übernehmen. Durch DEP oder durch andere AC-elektrische Effekte wie die AC-Elektroosmose oder elektrothermische Strömungen können die Analyten zu den Elektroden, und somit zu den Fängermolekülen, transportiert und die Sensitivität und

Ansprechzeit des Sensors so verbessert werden [12–15]. Selbst kleine Moleküle, wie z.B. Rhodamin 6G ($M = 479 \text{ g/mol}$), können durch DEP manipuliert und sogar immobilisiert werden [16].

Darüber hinaus können die durch DEP funktionalisierten Elektroden als Transducer verwendet werden. An ihnen könnte die Impedanz gemessen werden, die sich durch Bindung eines Analyten an das Fängermolekül ändert [17]. Niedermolekulare Analyten, wie H_2O_2 oder Glucose, könnten wiederum durch direkten Elektronentransfer der entsprechenden Oxidasen auf die Elektroden nachgewiesen werden [18, 19].

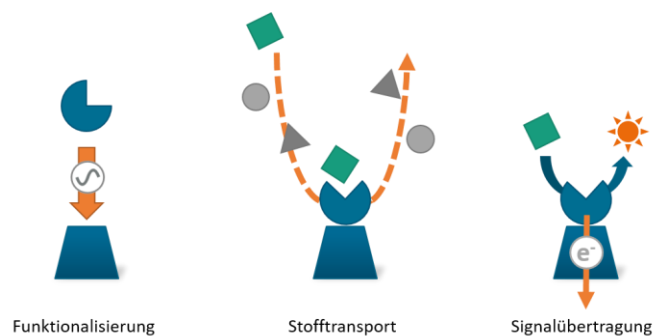


Abbildung 1: Mehrfachfunktion der Nanoelektroden im DEP-unterstützten Biosensor. Dieselben Elektroden könnten zur Immobilisierung des biologischen Erkennungselements durch DEP, zur Unterstützung des Stofftransports durch DEP oder andere AC-elektrokinetische Effekte und zur Signalübertragung, z.B. für eine elektrochemische oder kapazitive Messung, verwendet werden.

Die Nanoelektroden, die zur Immobilisierung von Proteinen verwendet werden, können in einem Biosensor somit eine dreifache Rolle übernehmen: Die erzeugten elektrischen Feldgradienten können sowohl zur Funktionalisierung der Elektroden selbst mit ausgerichteten Proteinmolekülen als auch zum verbesserten Massentransport der Analyten zu den Elektroden und biologischen Erkennungselementen verwendet werden, um auch die Detektion zu beschleunigen (Abbildung 1) [9, 14]. Außerdem können sie für elektrochemische oder kapazitive Ansätze der Signalübertragung zusätzlich als Transducer dienen. Nanoelektroden können mit der für die Massenfertigung ausgelegten CMOS-Technologie hergestellt und in einem einzigen Prozessschritt ohne zusätzliche Chemikalien durch DEP funktionalisiert werden, was eine konkurrenzfähige Herstellungsstrategie darstellen kann. In dieser Arbeit soll überprüft werden, ob bei dieser Methode auch die biologische Funktion immobilisierter Proteine erhalten bleibt.

1.2. Einordnung in die Literatur

1.2.1. Dielektrophorese

DEP als Werkzeug für die Manipulation und Vereinzelung von Zellen und Nanopartikeln

In einem elektrischen Feld können Partikel, z.B. Zellen, polarisiert und in Richtung des Feldes ausgerichtet werden. Ist das Feld homogen und die *netto*-Ladung des Partikels null, wirkt dieselbe Coulomb-Kraft auf die induzierten positiven und negativen Ladungen des Partikels mit entgegengesetzter Richtung, sodass insgesamt keine Kraft wirkt. In einem inhomogenen elektrischen Feld ist der Betrag der Kräfte, die auf die induzierten positiven und negativen Ladungen des ausgerichteten Partikels wirken, nicht gleich. Die resultierende Kraft F_{DEP} kann zur Verschiebung der Partikel im inhomogenen elektrischen Feld führen (Abbildung 2). Diesen Effekt nennt man Dielektrophorese [20].

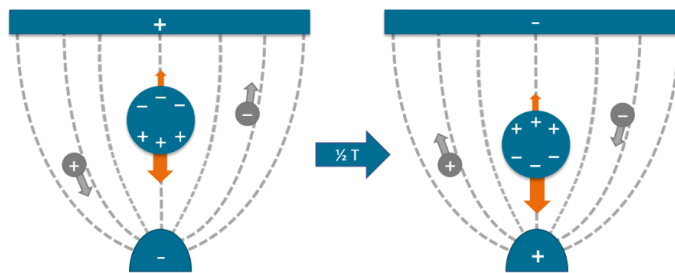


Abbildung 2: Prinzip der Manipulation polarisierbarer Partikel durch positive Dielektrophorese (DEP). Im inhomogenen elektrischen Wechselfeld können polarisierbare Partikel orientiert und durch die resultierende Kraft F_{DEP} zu Orten höherer Feldstärke bewegt werden. Geladene, nicht polarisierbare Partikel (grau) oszillieren dagegen nur, da sich bei jeder Halbwelle die Richtung ihrer Bewegung umkehrt.

Wie in Gleichung (1) gezeigt wird, hängt die resultierende Kraft F_{DEP} vom Volumen des Partikels und vom Quadrat des Gradienten des elektrischen Feldes ab. Für das Design von Dielektrophorese-Experimenten ist deswegen die Dimension der Elektroden besonders entscheidend: Durch schärfere Elektrodengeometrien können stärkere Gradienten des elektrischen Feldes und somit stärkere DEP-Kräfte bei gleicher Spannung erzeugt werden. Die Richtung der Kraftwirkung wird vom Realteil des Clausius-Mossotti-Faktors bestimmt. Ist die Polarisierbarkeit des Partikels bei der gewählten Frequenz höher als die des Mediums, tritt positive Dielektrophorese auf und das Partikel wird zu Orten hoher Feldgradienten, bzw. scharfer Elektrodengeometrien, gezogen [20].

$$F_{\text{DEP}} = 2\pi\epsilon_0\epsilon_m r^3 \text{Re}\{K(\omega)\} \nabla |E|^2 \quad (1)$$

$$K(\omega) = \frac{(\epsilon_p^* - \epsilon_m^*)}{(\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*)} \quad (2)$$

mit $\epsilon_{0,m,p}$ = Permittivität des Vakuums, des Mediums bzw. des Partikels

ϵ^* = komplexe Permittivität (frequenzabhängig)

r = Radius des Partikels

$K(\omega)$ = Clausius-Mossotti-Faktor

ω = Kreisfrequenz des angelegten Wechselfelds

und $\nabla |E_{\text{rms}}|^2$ = Gradient des Quadrats des elektrischen Feldes.

Durch das alternierende elektrische Feld resultieren weitere Effekte, wie Elektrothermik und AC-Elektroosmose, die Strömungen über den Elektroden erzeugen. Außerdem unterliegen die Partikel der braunschen Bewegung. Um Objekte mittels Dielektrophorese im elektrischen Feld bewegen zu können, muss die Verschiebung durch F_{DEP} größer sein als die durch andere Effekte erzeugte. Um Elektrolyse zu verhindern und die joulesche Wärme zu verringern, ist es in elektrodenbasierten Aufbauten notwendig, in einem Medium mit möglichst geringer Leitfähigkeit zu arbeiten [21, 22].

Die erste Anwendung der Dielektrophorese war die Trennung von lebenden und toten Hefezellen [23]. Das Isolieren, Sortieren, Fangen und Charakterisieren von Zellen sind weiterhin die Hauptanwendungen des Effekts [24]. Aber auch kleinere Biopartikel, wie Zellorganellen und Viruspartikel, können mit Hilfe entsprechender Feldgradienten durch DEP immobilisiert werden [25, 26]. Mit Elektroden, die kleiner sind als die Partikel selbst, kann auch deren Vereinzelung auf Nanoelektrodenarrays erreicht werden [27].

Experimentelle Belege für DEP mit Proteinen: von der Immobilisierung zu ersten Hinweisen auf Aktivität

Wie Gleichung (1) zeigt, hänge die Kraft, die durch DEP auf ein Partikel wirkt, auch vom Volumen des Partikels ab. Für ein Proteinmolekül mit einem Radius von wenigen Nanometern wird deswegen eine viel geringere Kraft F_{DEP} erwartet als z.B. für eine einige Mikrometer große Zelle unter den gleichen Bedingungen. Mit entsprechend hohen Feldgradienten, die durch scharfe Elektrodengeometrien erreicht werden, kann trotzdem eine Manipulation von Proteinmolekülen durch DEP erfolgen. Als erste zeigten dies Washizu et. al. im Jahr 1994 am Beispiel der Proteine Avidin, Concanavalin A, Chymotripsinogen A und Ribonuclease A in destilliertem Wasser [22]. Bis heute sind Protein-DEP-Experimente an weniger als 30 verschiedenen Proteinen belegt. Am häufigsten werden BSA oder Avidin bzw. Streptavidin

verwendet [28]. Bei Frequenzen unter 1 MHz wurde fast ausschließlich positive DEP der Proteine beobachtet [29]. Mögliche Anwendungen des Effekts sind z.B. das Immobilisieren von Proteinen, auch mit molekularer Strukturierung und Ausrichtung, die Trennung und Aufkonzentrierung von Proteinen, das Erzeugen fokussierter Protein-Ströme sowie die Vorkonzentrierung von Target-Proteinen in einem Biosensor durch DEP [30].

Eine weitere spannende Anwendung von Protein-DEP ist die Vereinzelung von Proteinmolekülen. Hölzel et. al. haben gezeigt, dass an einem Elektrodenpaar mit Hilfe elektrischer Wechselfelder ein einzelnes Molekül des Proteins R-Phycoerythrin gefangen werden kann [8]. Yamamoto et. al. präsentierten 2007 zudem ein 3D-Nanoarray für Einzelmolekül-Studien aus neun Elektrodenspitzen, auf denen einzelne oder wenige Proteinmoleküle durch DEP immobilisiert werden können. An diesen Elektroden konnte fluoreszenzmarkiertes BSA immobilisiert werden [7]. Ähnliche Arrays aus tausenden nano-Elektroden können inzwischen auch im industriellen Maßstab produziert und für die Vereinzelung von Enzymmolekülen eingesetzt werden [31].

Obwohl sie für viele der vorgeschlagenen Anwendungen von entscheidender Bedeutung ist, wurde eine Frage der Protein-DEP noch kaum untersucht: Bleiben die native Konformation und die Aktivität der Proteine während der Manipulation des Moleküls im elektrischen Wechselfeld erhalten? Es ist bekannt, dass Zellen und auch DNA-Moleküle durch DEP gestreckt werden können [32, 33]. Elektrische Wechselfelder können zudem gezielt eingesetzt werden, um die Aktivität von Enzymen in Lebensmitteln auszuschalten, aber auch um sie zu erhöhen [34, 35]. Bei der Inaktivierung im elektrischen Feld können elektrohydrodynamische Effekte eine Rolle spielen, die unabhängig von einer Temperaturerhöhung die Proteinstruktur destabilisieren und zur Aggregation der Proteine führen können [36]. Abhängig von der Flexibilität der Proteinstruktur kann auch die Adsorption eines Proteins an einer Oberfläche mit Hilfe elektrischer Felder dessen Konformation beeinflussen [37]. Problematisch für die Stabilität der Proteine könnte auch die notwendigerweise geringe Leitfähigkeit und somit niedrige Ionenkonzentration sein [22, 38].

Dennoch wurde gezeigt, dass nach einer AC-Elektrophorese, bei der Proteine mit Hilfe unsymmetrischer Wellenformen auf relativ stumpfen Elektroden immobilisiert werden, die Enzyme Glucoseoxidase (GOx), β -Galactosidase und Catalase aktiv sind und die Immobilisate in Biosensoren verwendet werden können [39, 40]. Auch eine Desoxyribonuclease, die durch eine ähnliche Methode auf Titanoberflächen immobilisiert wurde, blieb aktiv und könnte eingesetzt werden, um den Bewuchs von Implantaten mit Biofilmen zu verhindern [41]. Einzig für Meerrettichperoxidase (HRP) und einen Antikörper gegen R-Phycoerythrin wurde die

biologische Aktivität der Proteinmoleküle auch nach Immobilisierung durch DEP gezeigt [5, 42]. Allerdings war keine der genannten Untersuchungen quantitativ und es ist unbekannt, zu welchem Anteil die immobilisierten Enzyme aktiv sind.

Die Theorie der Protein-Diektrophorese

Schon bei der ersten Beobachtung von Protein-DEP durch Washizu et. al. fiel auf, dass die Proteine bereits bei geringeren Feldstärken durch DEP akkumuliert wurden als aufgrund der klassischen Theorie erwartet wurde [22]. Diese Beobachtung wurde durch die Mehrzahl der beschriebenen DEP-Experimente mit globulären Proteinen bestätigt [43]. Der Clausius-Mossotti-Faktor, wie er in Gleichung (2) dargestellt ist, bezieht sich auf kugelförmige Partikel ohne Nettoladung oder permanenten Dipol, der durch eine unregelmäßige Ladungsverteilung entsteht. Er trifft für Biomoleküle somit nicht zu, weil sie mehrere Ladungen, unregelmäßig verteilte Oberflächenladungen und damit einen permanenten Dipol tragen. Zusätzlich muss für Proteine die Polarisierung der Hydrathülle berücksichtigt werden, da sie einen großen Einfluss auf die dielektrischen Eigenschaften der Moleküle hat [44].

Eine präzise Vorhersage von F_{DEP} für verschiedene Proteine würde jedoch helfen, den Effekt effektiver einzusetzen und z.B. auch für die Trennung oder Analyse von Proteinen nutzen zu können [45]. Laut der empirischen Hölzel-Pethig-Theorie kann der Clausius-Mossotti-Faktor K_{micro} für Proteinmoleküle durch die Korrektur von K um einen empirischen Faktor vorhergesagt werden, der mit Hilfe experimentell ermittelter Dipolmomente des Proteins und seiner Dichte berechnet wird. Die unterschiedlichen Faltungen und Ladungen der Proteine sowie die Verteilung von polaren und unpolaren Gruppen auf der Proteinoberfläche werden dadurch berücksichtigt. Die resultierenden Werte für den Parameter K_{micro} sind für verschiedene Proteine dementsprechend sehr unterschiedlich und umfassen zwei Größenordnungen. Das Molekulargewicht der Proteine ist dabei nicht ausschlaggebend für den korrigierten Clausius-Mossotti-Faktor [43].

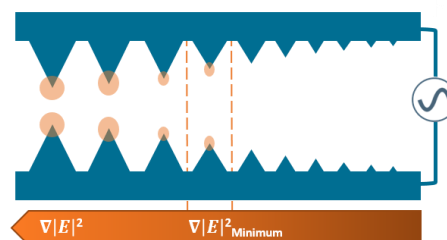


Abbildung 3: Schematischer Aufbau zur experimentellen Bestimmung von K_{micro} für Proteine, nach [45].

In einer im Januar 2023 veröffentlichten Arbeit wurde anhand der Proteine BSA, Lactoferrin und Lysozym untersucht, ob der mit der Hölzel-Pethig-Theorie berechnete Faktor K_{micro}

zutritt [45]. Dafür wurde eine Plattform entwickelt, in der durch dreidimensional angeordnete Elektrodenpaare untersucht werden kann, welcher elektrische Feldstärkegradient mindestens für das Immobilisieren der Proteine erforderlich ist (Abbildung 3). F_{DEP} ist ab diesem Feldstärkegradienten groß genug, um die Diffusion der Moleküle zu überwinden. Daraus ergibt sich, unter Vernachlässigung möglicher elektrohydrodynamischer Effekte, eine untere Grenze für K_{micro} . Für Lysozym ist der vorhergesagte Wert lediglich um den Faktor 3,5 größer als der experimentell ermittelte. Der experimentell ermittelte Wert von K_{micro} für BSA ist aber über 200-mal niedriger als der durch die Theorie vorhergesagte. Für Lactoferrin ist noch keine theoretische Vorhersage von K_{micro} möglich, da keine entsprechenden dielektrischen Spektren publiziert sind [45]. Um den Effekt Protein-DEP besser zu verstehen und vorherzusagen, sind also mehr experimentelle Arbeiten zum Thema und eine präzisere Theorie nötig.

1.2.2. Untersuchte Enzyme und ihre Besonderheiten

Meerrettichperoxidase: Eine komplexe Mischung für höchste Aktivität und Stabilität

Die Meerrettichperoxidase (HRP) ist eine Häm-Peroxidase, die aus der Pflanze *Armoracia rusticana* gewonnen wird [46]. Die Polypeptidkette des Enzyms weist ein Molekulargewicht von 33,9 kDa auf [47]. Aufgrund der heterogenen Glykosylierung ist das Molekulargewicht des nativen Enzyms aber höher und beträgt etwa 44 kDa [48]. Die aus Meerrettich gewonnene HRP besteht aus einer Vielzahl von überwiegend unbeschriebenen Isoenzymen mit verschiedenen pI-Werten. Die Zusammensetzung hängt von unkontrollierbaren Umweltbedingungen ab und variiert entsprechend zwischen Präparaten verschiedener Hersteller und Chargen. Trotzdem wird kommerziell erhältliche HRP aus Meerrettich isoliert, da die rekombinante Produktion in sicheren Produktionsstämmen bisher keine konkurrenzfähigen Ausbeuten aktiver HRP liefert [49]. Den größten Anteil der hier verwendeten, kommerziellen HRP-Mischung macht das Isoenzym C aus, das eine pI von etwa 8,8 aufweist [48, 50, 51].

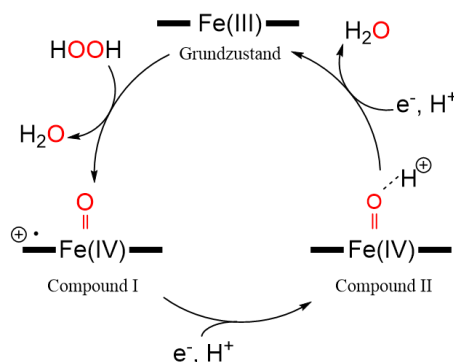


Abbildung 4: Peroxidase-Zyklus der HRP [52].

Der Cofaktor der HRP ist das Häm, ein Komplex aus einem Eisenion und einem Porphyrinring. Während des Reaktionszyklus der HRP durchläuft das Häm verschiedene Oxidationsstufen. Der Grundzustand enthält Eisen(III). Im ersten Schritt der Reaktion wird dieses durch H_2O_2 komplexiert und zu Compound I oxidiert, einem Intermediat aus Eisen(IV)-Oxoferryl und einem Porphyrin-Kation-Radikal. In zwei Ein-Elektron-Oxidationen von Substratmolekülen wird der Grundzustand regeneriert. Dabei wird die Eisen(IV)-Oxoferryl-Zwischenstufe Compound II gebildet [52]. H_2O_2 im Überschuss führt zur Bildung weiterer Intermediate, die zur Inaktivierung der HRP führen können [53].



HRP oxidiert auf diese Weise eine Vielzahl von Substraten, darunter Phenole, Indole, Amine und Sulfonate. Vereinfacht können diese als Reduktionsmittel AH_2 dargestellt werden, das zu einem radikalischen Produkt AH^\bullet oxidiert wird (Gleichung (3)) [46]. Die genaue physiologische Funktion des Enzyms ist nicht bekannt, könnte aber unter anderem in der Ligninbildung und Wundheilung der Pflanze liegen [46]. Die Vielzahl der katalysierten Reaktionen sowie die vergleichsweise hohe Stabilität des Enzyms machen es attraktiv als Biokatalysator. Viele der radikalischen Produkte reagieren außerdem zu farbigen, fluoreszierenden, präzipitierenden oder elektroaktiven Substanzen, weshalb die HRP häufig als Reporterenzym oder für die Signalamplifikation in histologische Färbungen, in Nachweisreaktionen und in Immunoassays verwendet wird [54–57].

Aufgrund dieser Eigenschaften ist die HRP auch ein beliebtes Enzym für *Proof of Concept*-Studien, z.B. für die Immobilisierung katalytisch aktiver Enzyme durch DEP [42], aber auch für zahlreiche Einzelenzymmolekül-Experimente. Dabei werden Enzymmoleküle durch Immobilisierung oder Einschluss in einem kleinen Volumen vereinzelt und die katalytische Aktivität der individuellen Enzymmoleküle beobachtet. So können Details des Reaktionsmechanismus untersucht werden [58]. Unterschiede zwischen den einzelnen Enzymmolekülen (statische Heterogenität) sowie auch eines einzelnen Enzyms im zeitlichen Verlauf (dynamische Heterogenität) können ebenfalls aufgedeckt werden [59]. Die HRP wurde dafür unter anderem als Einzelmolekül auf Glasoberflächen immobilisiert [60, 61], in ein Virus-Kapsid eingeschlossen [62] oder in Femtoliter-großen Kavitäten am Ende eines Glasfaserbündels vereinzelt [63, 64].

Für die Detektion der auf Oberflächen immobilisierten HRP durch Fluoreszenz-korrelationsspektroskopie (FCS) wurde dafür ein fluoreszierender Enzym-Produkt-Komplex aus der HRP und Rhodamin, dem Produkt der Oxidation von Dihydrorhodamin, postuliert [60, 61]. Allerdings ergibt die Ein-Elektronen-Oxidation von Dihydrorhodaminen eine radikalische Zwischenstufe, die erst durch eine Disproportionierung oder eine weitere Oxidation durch Sauerstoff zum fluoreszierenden Rhodamin reagiert [65, 66]. Auch andere, ähnliche Fluorescein-Derivate werden durch die HRP zu freien Radikalen oxidiert [67]. Typischerweise unterscheiden sich die Absorptionsspektren dieser Intermediate vom fluoreszierenden Endprodukt. Ist die Lösung mit O_2 gesättigt, kann die Halbwertszeit dieser Intermediate auf etwa $4,7 \mu s$ abgeschätzt werden [68]. Die Diffusionszeit niedermolekularer Verbindungen durch das konfokale Volumen der FCS beträgt typischerweise etwa $20 \mu s$, die Detektion der fluoreszierenden Produkte wäre also prinzipiell möglich. Die für die Auswertung der Daten vorausgesetzten, fluoreszierenden Enzym-Produkt-Komplexe und die daraus abgeleiteten Interpretationen sind aber mit Vorsicht zu betrachten [63]. Für diese Form der Einzelmolekül-Beobachtung erscheint deswegen die Wahl eines Enzyms, dessen Aktivität nicht aufgrund eines frei diffundierenden Produktes bestimmt werden muss, solider [63]. Beispiele dafür sind Flavoenzyme, deren Reaktionszyklus auf Einzelenzym-Niveau aufgrund der intrinsischen Fluoreszenz des Cofaktors verfolgt werden kann, wie es für die Cholesteroxidase gezeigt wurde [69].

Cholinoxidase: Ein Flavoenzym mit elegantem Mechanismus und hoher intrinsischer Fluoreszenz

Als flavinabhängige Enzyme bezeichnet man Enzyme, die ein von Riboflavin bzw. Vitamin B_2 abgeleitetes Flavin-Derivat als Cofaktor oder Cosubstrat in der von ihnen katalysierten Reaktion nutzen. Ist das Flavin ein Cofaktor, redet man von Flavoenzymen. Sie kommen in allen Organismen und Zelltypen vor. Im Menschen wurden 90 flavinabhängige Enzyme identifiziert, die damit 0,3% des menschlichen Proteoms ausmachen. Die meisten Flavoenzyme (90 %) sind Oxidoreduktasen, und viele nutzen als Cofaktor Flavinadenindinukleotid (FAD), das meist fest, aber nicht kovalent gebunden ist. Die chemisch aktive Region aller Flavine ist der Isoalloxazin-Ring, der im Grundzustand der Enzyme in seiner oxidierten Form vorliegt. Er kann durch den Übergang eines Elektrons zum Semiquinon reduziert werden. Durch einen Zwei-Elektronen-Übergang entsteht die reduzierte Form $FADH_2$ bzw. deren bei physiologischem pH überwiegend vorkommende, deprotonierte Form $FADH^-$ (Abbildung 5) [70].

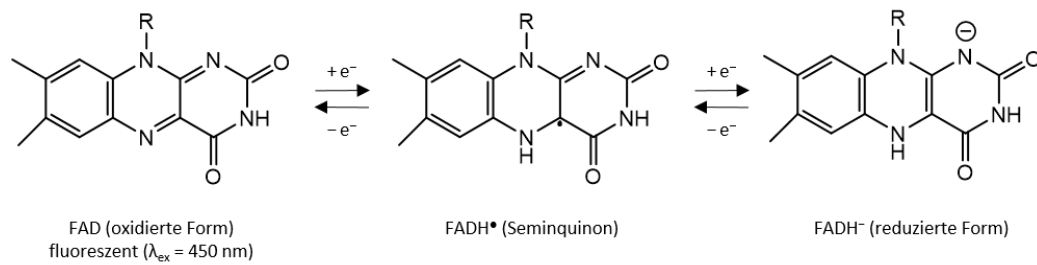


Abbildung 5: Isoalloxazin-Ring in den verschiedenen Oxidationszuständen des Flavins [70].

Die hier gezeigten Formen können aufgrund ihrer spektroskopischen Eigenschaften unterschieden werden. Das gelbe FAD weist ein Absorptionsspektrum mit Maxima bei ca. 260 nm, 380 nm und 450 nm auf [70]. Bei Anregung bei 450 nm fluoresziert FAD. Das Molekül ist allerdings anfällig für photophysikalische und photochemische Effekte und weist eine eher geringe Quanteneffizienz auf, die durch die chemische Umgebung innerhalb eines Enzyms gequench werden kann [71]. Das reduzierte FADH₂ absorbiert sichtbares Licht wesentlich schwächer als FAD und weist in diesem Bereich nur Schultern des Haupt-Peaks auf, der im UV-Bereich des Absorptionsspektrums liegt. Die Absorption des Semiquinons hängt vom Ladungszustand ab und ähnelt dem FAD oder ist zu einem breiten, längerwelligen Peak um die Wellenlängen 500 – 600 nm verschoben [70].

Flavoprotein-Oxidasen sind Flavoenzyme, die molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor verwenden. Da kein Cofaktor, wie z.B. Nicotinamid, für die Reaktion benötigt wird, sind diese Enzyme einfach zu handhaben und kosteneffizient in biotechnologischen Anwendungen einsetzbar [72]. Die Cholesteroxidase, eines der ersten Enzyme, das für eine Einzelenzymstudie verwendet wurde, ist eine Flavoprotein-Oxidase [69, 72]. An diesem Enzym wurde demonstriert, dass der Reaktionszyklus eines Flavoproteins anhand der FAD-Fluoreszenz, die entsprechend des Oxidationszustandes fluktuiert, auf Einzelmolekül-Niveau verfolgt werden kann [69].

Der Mechanismus der Oxidation von Alkoholen durch Flavoproteine wurde sehr detailliert und auf molekularem Niveau anhand der Cholinoxidase (ChOx) erforscht. Das Enzym ist auch von biotechnologischem Interesse, da durch das Reaktionsprodukt Glycin-Betain, einem kompatiblen Solut, der osmotische Druck in Zellen geregelt werden kann. Transgene Pflanzen, die mit einem Gen für ChOx ausgestattet wurden, weisen erhöhte Resistenzen gegenüber Stressfaktoren wie z.B. hohen Salzgehalten, Dürre, Kälte oder oxidativem Stress auf [73]. ChOx katalysiert die Oxidation von Cholin über Betinaldehyd zu Glycin-Betain in zwei Schritten, bei denen es sich jeweils um eine zwei-Elektronen-Oxidation mit anschließender Regenerierung des FAD mittels O₂ handelt (Abbildung 6). Vor der eigentlichen Oxidation des Cholins findet

die Abstraktion des Protons der Hydroxylgruppe durch die katalytische Base Histidin-466 statt. Diese stabilisiert außerdem während der Oxidationsreaktion eine negative Partialladung des FAD. Die Oxidation erfolgt über einen quantenmechanischen Hydridtransfer. Das Tunneln des Hydridions wird durch eine sehr genaue Positionierung der Reaktionspartner Cholin und FAD ermöglicht, für die eine Vielzahl polarer Residuen im aktiven Zentrum sowie die kovalente Bindung des FADs an das Protein nötig sind. Das zweite Substrat der ChOx, Betainaldehyd, kann nach einer Hydrierung über einen ähnlichen Mechanismus oxidiert werden [73].

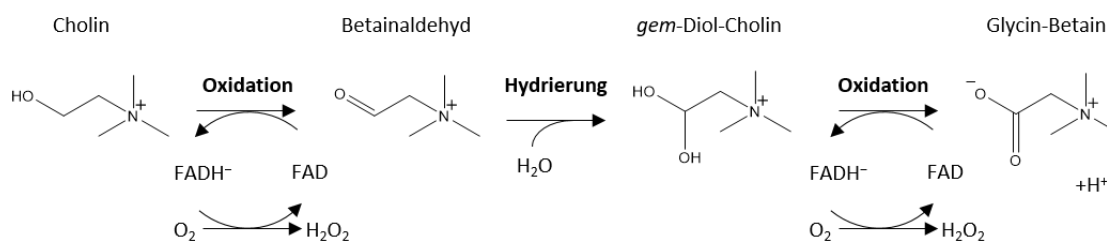


Abbildung 6: Die durch ChOx katalysierte, zwei-schrittige Oxidation von Cholin zu Glycin-Betain [73].

Eine Besonderheit der ChOx ist die starke Fluoreszenz des kovalent gebundenen FADs, die wenig gequenchet wird und dem freien FAD ähnlich ist [74]. Zudem ist die Oxidationsreaktion schneller als die Regeneration des FAD, sodass das nicht fluoreszierende FADH⁻ dominierend vorliegt und die Fluoreszenz geringer ist als im Grundzustand des Enzyms, solange die Substrate Cholin und Betainaldehyd nicht verbraucht sind [75]. Anhand der intrinsischen Fluoreszenz der ChOx aus *Arthrobacter globiformis* oder *Alcaligenes sp.* kann darum der Cholin- und Betainaldehyd-Gehalt in Milch bestimmt werden. Die Fluoreszenzintensität und die Änderung der intrinsischen Fluoreszenz sind bei pH 9 am höchsten. Bei diesem pH-Wert liegt das Maximum der Fluoreszenzanregung bei 400 nm [76]. Möglicherweise handelt es sich bei der beobachteten fluoreszierenden FAD-Spezies somit nicht um FAD, sondern um ein photoinduziertes Protein-FAD-Addukt, welches reversibel im Basischen gebildet wird und ähnliche spektrale Eigenschaften aufweist [73].

ChOx ist auch für weitere Biosensoren relevant. Das Enzym kann für die Überwachung des Cholinpiegels in der Früherkennung von Krebs oder Vorbeugung neurodegenerativer Erkrankungen genutzt werden oder in Kombination mit der Acetylcholinesterase zur Bestimmung des Neurotransmitters Acetylcholin dienen. Manche Sensoren bestehen auch aus einem Co-Immobilisat aus ChOx und HRP, welche zur Signalamplifikation dient [77]. ChOx kann durch ihre Hemmung auch in einem Biosensor für die Detektion von Schwermetallen oder von Pestiziden, die die Acetylcholinesterase hemmen, verwendet werden [77, 78].

Glucoseoxidase: Hohe Aktivität und Spezifität für Biosensoren

Die am meisten untersuchte Flavoprotein-Oxidase ist die Glucoseoxidase (GOx) [72]. Gleichzeitig ist die GOx eines der wichtigsten Modellenzyme für die Biosensorik. Der Grund dafür ist der große Bedarf an Glukosesensoren in verschiedenen Bereichen, wie dem Monitoring des Blutzuckerspiegels von Diabetikern, aber auch der Überwachung von Glukosegehalten in der Lebensmitteltechnologie und in Fermentationsprozessen. Die GOx eignet sich für die Entwicklung entsprechender Sensoren wegen der Stabilität des Enzyms und der hohen Spezifität für das Substrat Glucose [79].

GOx katalysiert die Reaktion von β -D-Glucose und O_2 zu H_2O_2 und β -D-Gluconolacton, welches spontan zu Gluconsäure hydrolysiert werden kann (Abbildung 7) [79]. Die physiologische Funktion des in Pilzen und Insekten vorkommenden Enzyms ist die Produktion von H_2O_2 . Das Enzym wirkt somit antibakteriell. Es wird z.B. von Bienen in den Honig abgegeben, um diesen zu konservieren. Auch in der Industrie wird das Enzym als Desinfektionsmittel und zur Verbesserung der Lagerfähigkeit von Lebensmitteln eingesetzt [72]. Die Aktivität des Enzyms kann anhand des anfallenden H_2O_2 gemessen werden und wird meist elektrochemisch oder optisch, z.B. durch eine gekoppelte Reaktion mit Hilfe der HRP, bestimmt. Die kovalente Kopplung von Mediator-Molekülen wie Ferrocen an GOx erlaubt auch den für die Biosensorik sehr nützlichen, direkten Elektronentransfer von GOx auf eine Elektrode [80].

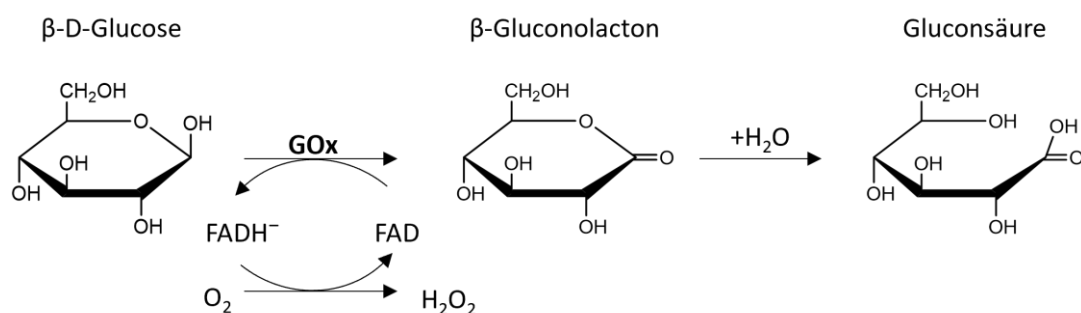


Abbildung 7: Von der GOx katalysierte Reaktion von β -D-Glucose zu Gluconolacton, welches zu Gluconsäure hydrolysiert wird [81].

Die Glucoseoxidase aus *Aspergillus niger* ist als Homodimer aktiv und weist als solche ein Molekulargewicht von etwa 160 kDa auf [82]. Das Enzym ist globulär mit einem Achsenverhältnis von 2,5:1 [83]. Wie bei der HRP wird auch die GOx durch eine Glykosylierung stabilisiert. Je nach Hersteller und Charge beträgt der Kohlenhydratgehalt des Enzyms etwa 12 - 19 % [82, 83]. Das Holoenzym weist zwei Moleküle des Cofaktors FAD auf. Diese sind fest, aber nicht kovalent an das Enzym gebunden. Bei der thermischen Inaktivierung

der GOx dissoziiert zuerst das FAD, woraufhin das Enzym seine Aktivität und auch seine Sekundär- und Tertiärstruktur verliert. Die Entfaltung führt zur Aggregatbildung und die Inaktivierung kann nicht durch FAD-Zugabe rückgängig gemacht werden [84]. Nach dem Denaturieren des Enzyms mit Ammoniumsulfat können durch zwölfstündige Inkubation mit FAD 15 – 35 % der ursprünglichen Enzymaktivität wieder hergestellt werden, eine vollständige Regenerierung des Holoenzym mit FAD ist aber nicht möglich [85].

Auch mit der GOx wurde versucht, die intrinsische Fluoreszenz, die abhängig ist vom Oxidationszustand des FADs, für die Biosensorik zu nutzen. Allerdings wird die FAD-Fluoreszenz innerhalb der GOx stark gequench, sodass sehr hohe Konzentrationen des Enzyms für die Detektion der intrinsischen Fluoreszenz benötigt werden [74]. Es konnte trotzdem gezeigt werden, dass auch für GOx die intrinsische Fluoreszenz von der Glucosekonzentration abhängt und prinzipiell für einen Glucose-Sensor genutzt werden könnte. Der Unterschied der Fluoreszenzintensität ist dabei aber gering. Entgegen der Erwartung steigt dabei die Fluoreszenz der GOx bei Glucose-Zugabe, was wahrscheinlich durch einen Inner-Filter-Effekt und durch die Photooxidation der reduzierten GOx verursacht wird [74, 86]. Hinderlich ist bei der Verwendung der GOx-Fluoreszenz für die Glucose-Detektion auch die Kinetik des Umsatzes durch die GOx. Anders als bei ChOx ist die Regeneration der oxidierten und fluoreszierenden Form des FADs schneller als die Oxidation des Substrates. Bei Zugabe der Glucose liegt FAD also weiterhin vorwiegend in der oxidierten Form vor. Nur wenn die Glucosekonzentration deutlich höher als die O₂-Konzentration ist und die O₂-Konzentration während der Reaktion sehr klein wird, dominiert das nicht fluoreszierende FADH₂ und die Fluoreszenz des Enzyms nimmt merklich ab, bis die Glucose verbraucht ist und das O₂ der Umgebung das FAD wieder regeneriert [74].

1.3.Ziel dieser Arbeit

Die Immobilisierung von Biomolekülen durch AC-elektrische Effekte ist ein vielversprechender Ansatz für die Funktionalisierung von Elektroden für Biosensoren oder Forschungsanwendungen. Die Literaturrecherche zeigt jedoch, dass nur wenige Beispiele für die Immobilisierung von Proteinen durch Dielektrophorese bekannt sind. Insbesondere die biologische Aktivität der Proteine nach der Immobilisierung ist kaum erforscht: Lediglich für einen Antikörper und für das Enzym HRP gibt es Hinweise, dass sie nach DEP auf den Elektroden aktiv sind. Dabei handelt es sich aber um qualitative Studien, von denen keine quantitative Aussage über die Aktivität der Proteine abgeleitet werden kann. Die HRP ist zudem ein außergewöhnlich stabiles Enzym, sodass die Aussagen für HRP nicht problemlos auf weitere Enzyme übertragen werden können. Für Einzelenzymstudien an auf Oberflächen ohne Kompartimentierung immobilisierten Enzymen ist die Eignung dieses Enzyms außerdem fraglich.

In dieser Arbeit wurde deswegen die katalytische Aktivität von Enzymnanoarrays untersucht, die durch dielektrophoretische Immobilisierung aktiver Enzyme auf Nanoelektroden hergestellt wurden. Dabei wurde sowohl die sehr stabile HRP verwendet als auch zwei weitere Enzyme, GOx und ChOx, die für die Biosensorik und Einzelmolekül-Forschung relevant sind. Dafür wurden Assays entwickelt, mit deren Hilfe die Aktivität der Enzyme direkt auf dem Elektrodenchip durch Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden kann.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Amplex Red (10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin)	≥95 %; Cayman Chemical
Cholinchlorid	≥99 %; Merck
D+ Glucose	≥97,5 %; Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	99,9 %, Sigma-Aldrich
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	≥99 %; Acros organics
Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz (EDTA)	99,5 %; Calbiochem
Ethanol	Absolut, VWR
Folin Ciocalteu's Phenol-Reagenz	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	≥99 %; Roth
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Zur Analyse, Merck
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Zur Analyse, Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	≥99 %; Roth
Resorufin	<i>High purity</i> ; Biotium
Reinstwasser (dH ₂ O)	aus hauseigener Anlage; $\kappa \approx 0,3 \mu\text{S cm}^{-1}$
Rhodamin 123	97 %; Sigma Aldrich
Polyethylenglycol (PEG), M = 20.000 g/mol	Roth
Triton X 100	Alfa Aesar
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	30 %, Roth

Die pH-Werte der verwendeten Puffer wurden durch Mischen von 100 mM Lösungen der Puffersalze eingestellt. Die Puffer wurden anschließend mit 0,22 μm Spritzenfiltern sterilfiltriert. Amplex Red wurde in mit Argon gepurgtem DMSO gelöst. Aliquots der Stammlösung wurden mit Argon überschichtet und bei -20°C gelagert.

2.1.2. Messgeräte

Tabelle 2: Verwendete Messgeräte und Zubehör

Microplate-Reader	FluoStar Omega, BMG Labtech
96-Well-Platten (für Fluoreszenz)	Ref. 353293, Falcon (Polystyrol, unbeschichtet, Flachboden, mit schwarzem Rand)
Absorptionsspektrometer	ND-1000; PEQLAB Biotechnologie GmbH
Fluoreszenzspektrometer	LS 55, Perkin Elmer
Küvetten (Einweg)	Ref. 67.755, Sarstedt (Acryl, Pfadlänge 10 mm)
Präzisions-Microküvette	Typ 105.253-QS, Hellma (Quarzglas, Pfadlänge 10 mm)
Dynamische Lichtstreuung (DLS)	Zetaziser Nano ZS, Malvern Panalytical
DLS-Küvetten (Einweg)	ZEN0040, Malvern Panalytical (UV-Polymer, Pfadlänge 10 mm)
Leitfähigkeitsmesszelle	CDC749, Radiometer analytical
pH-Meter	pH 340i, WTW

2.1.3. Proteine und Enzyme

Für die DEP-Versuche und die Entwicklung und Durchführung von Enzymassays wurden verschiedene Enzympräparate angefertigt. Dafür wurden kommerziell erhältliche Enzyme in dH₂O gelöst und bei Bedarf durch Ultrafiltration gereinigt. Dazu wurden die Enzymlösungen in Zentrifugenkonzentratoren gegeben (VivaSpin 500, molekularer *cutoff*: 30 kDa, Sartorius), wiederholt entsprechend der Anleitung des Herstellers aufkonzentriert und wieder in dH₂O verdünnt, bis eine Leitfähigkeit der Enzymlösung von möglichst unter 80 µS/cm erreicht wurde. Alle Stammlösungen wurden aliquotiert und bei -20°C auf Eis gelagert.

Meerrettichperoxidase (HRP)

HRP (EC 1.11.1.7.) Typ VI-A wurde von Sigma-Aldrich bezogen. Für die Fluoreszenzmarkierung wurde das Enzym in 100 mM Na-Carbonat-Puffer pH 8,7 mit einer finalen Enzymkonzentration von 2 g/L gelöst. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte mit dem wasserlöslichen Cy5-NHS-Ester von GE Healthcare für die Markierung von 1 mg Protein (Produkt Q15108). Die Proteinlösung wurde direkt zum trockenen Fluoreszenzfarbstoff gegeben. Dabei wurden 0,5 mg Protein pro Cy5-NHS-Aliquot eingesetzt. Nach Zugabe des Enzyms zum Cy5-NHS-Ester wurde die Lösung über 90 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss geschüttelt und anschließend durch Ultrafiltration gereinigt.

Für DEP mit unmodifizierter HRP wurde das Enzym in dH₂O gelöst. Die Konzentration von 4 g/L wurde am Nanodrop-Spektralphotometer mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{403\text{ nm}} = 102\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ermittelt [53]. Die Leitfähigkeit betrug 45 $\mu\text{S/cm}$. Dieses Präparat wurde auch für die gekoppelten Enzymassays für GOx bzw. ChOx eingesetzt. Die Verdünnung erfolgte dann in Phosphatpuffer pH 7,5 mit 0,1 % BSA und 0,1 % Triton X 100.

Durch Suizidaktivierung mit Natriumazid kann die HRP vollständig und irreversibel inaktiviert werden. Dabei reagieren durch den enzymatischen Umsatz generierte Azid-Radikale mit dem Häm-Zentrum des Enzyms [87]. Dieser Mechanismus wurde genutzt, um für Vergleichsmessungen ein HRP-Präparat mit einer der aktiven HRP ähnlichen Oberfläche und Proteinstruktur, aber ohne Enzymaktivität herzustellen. Dafür wurden 0,44 g/L des Enzyms mit 6 mM Natriumazid und 6 mM H₂O₂ über 2 h in Phosphatpuffer pH 7,5 inkubiert [87]. Danach wurde das Enzym durch Ultrafiltration aufkonzentriert und gegen dH₂O umgepuffert. Die Aktivität des inaktivierten Enzyms gegenüber dem Substrat Amplex Red entsprach danach 0,06 % der Ausgangsaktivität der HRP.

Bovines Serum Albumin (BSA)

Albumin Fraktion 5 für Western Blotting (Applichem) wurde in dH₂O gelöst. Die Konzentration wurde anhand des molaren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{280\text{ nm}} = 43,8\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ am Nanodrop-Spektralphotometer bestimmt und betrug 4 g/L [88]. Die Leitfähigkeit betrug 80 $\mu\text{S/cm}$.

Cholinoxidase (ChOx)

Cholinoxidase aus *Alcaligenes sp.* (EC 1.1.3.17) von Sigma-Aldrich wurde in 1 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8 mit 1 mM EDTA gelöst. Das Umpuffern erfolgte zuerst drei Mal gegen dH₂O, danach im Wechsel gegen 0,1 mM EDTA (pH = 7,7; $\kappa = 29\text{ }\mu\text{S/cm}$) und gegen dH₂O. Die Leitfähigkeit konnte so nur bis auf 225 $\mu\text{S/cm}$ reduziert werden. Für DEP-Immobilisierungen wurde deswegen eine Enzymprobe direkt vor Gebrauch 1:4 in dH₂O verdünnt. Die Konzentration der ChOx-Lösung wurde mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten des FADs ($\epsilon_{454\text{ nm}} = 11.300\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) bestimmt und betrug ca. 2 g/L.

Glucoseoxidase (GOx)

Glucoseoxidase aus *Aspergillus niger* (EC 1.1.3.4) von Sigma-Aldrich wurde in dH₂O gelöst und anschließend gegen dH₂O umgepuffert, bis eine Leitfähigkeit von 65 $\mu\text{S/cm}$ erreicht wurde. Die Konzentration wurde anhand des vom Hersteller angegebenen Extinktionskoeffizienten ermittelt ($\epsilon_{280\text{ nm}} = 16,7\text{ \%}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) und betrug 5,9 g/L.

2.1.4. Elektroden

TiN-Ringelektroden

Die verwendeten Elektrodenarrays wurden vom Leibnitz-Institut für innovative Mikroelektronik (IHP) in Frankfurt (Oder) in einer Standard-0,25 μm -CMOS-Prozesslinie hergestellt (Abbildung 8A). Die Basis aller Chips ist ein 8 inch Silizium-Wafer. Zuerst wurde auf diesen ein Stapel aus leitenden Metallschichten aufgetragen. Darauf wurde eine SiO_2 -Schicht abgeschieden, durch welche mittels *reactive ion etching* regelmäßig angeordnete Löcher geätzt wurden. Die so strukturierte SiO_2 -Oberfläche wurde mit 20 nm starkem Titanitrid (TiN) beschichtet. TiN ist unter den leitfähigen, CMOS-kompatiblen Schichten am beständigsten gegen Korrosion, hohe Temperaturen und elektrochemische Veränderungen. Es ist deswegen die beste Wahl für die Herstellung von nano-Elektroden für biotechnologische Anwendungen [89]. Die entstandenen TiN-Wannen wurden durch eine chemische Gasphasenabscheidung mit SiO_2 gefüllt. Durch chemisch-mechanisches Polieren wurden überschüssiges SiO_2 sowie die horizontale TiN-Schicht auf der SiO_2 -Oberfläche abgetragen und dabei eine planare Oberfläche erzeugt. Aufgrund verschiedener Abtragungsraten der unterschiedlichen Materialien können die Elektrodenstrukturen um einige Nanometer versenkt oder erhaben sein (Abbildung 8E).

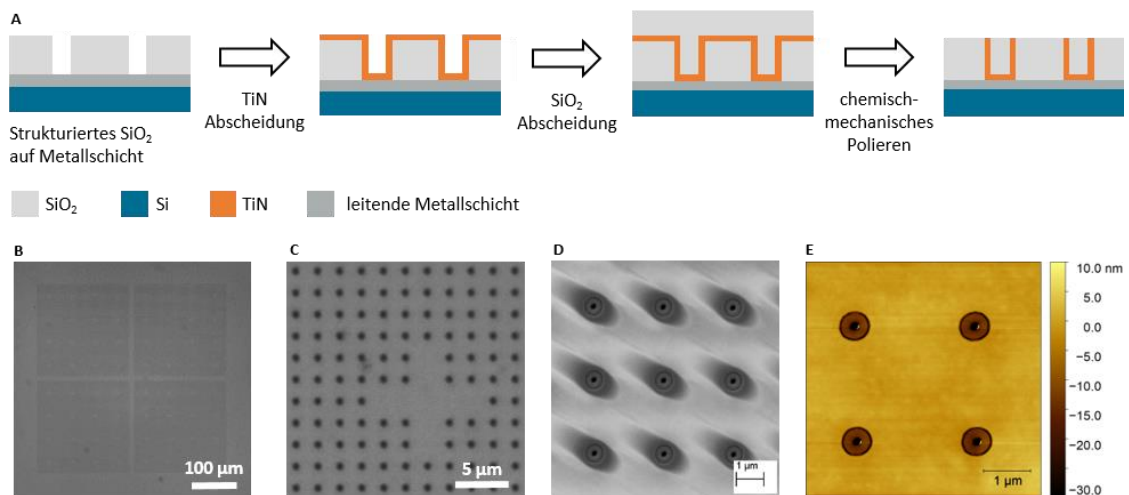


Abbildung 8: Herstellung und Layout der TiN-Ringelektroden-Arrays [90]. A: Schema der Herstellung der Ringelektroden. B: Vier Subarrays aus je 6.256 TiN-Ringelektroden im Reflexions-Auflicht. C: TiN-Ringelektroden im Reflexions-Auflicht. Bereiche ohne Elektroden bilden Kreuze zur Orientierung. D: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von TiN-Ringelektroden. E: Rasterkraftmikroskopische Aufnahme der TiN-Ringelektroden, erstellt von Dr. Eva-Maria Laux. Die in D und E dunkel erscheinenden, schmalen Ringe sind die TiN-Elektroden.

Die 20 nm breiten TiN-Ringelektroden sind in vier Subarrays aus jeweils 80x80 Elektroden angeordnet (Abbildung 8B). Einige Elektrodenpositionen wurden ausgelassen, um die Orientierung auf dem Chip zu erleichtern (Abbildung 8C), sodass sich auf jedem Chip 25.024 Elektroden befinden. Die TiN-Ringe haben einen Abstand von 2 μm und einen Außendurchmesser von 500 nm (Abbildung 8D).

Wolfram-Zylinderelektroden

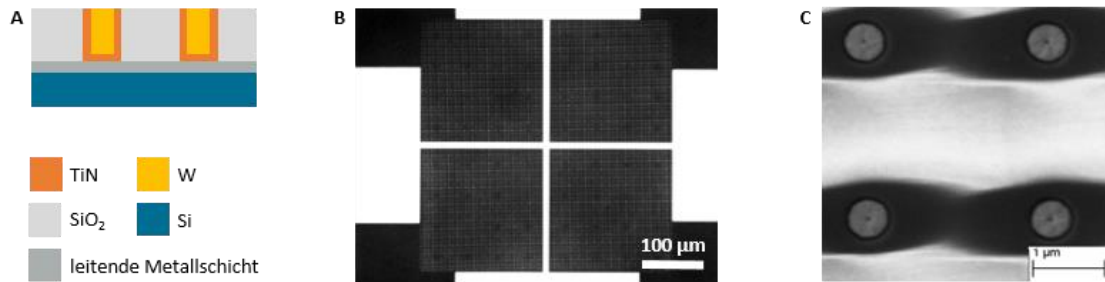


Abbildung 9: Wolfram-Zylinderelektroden-Arrays. A: Schematischer Aufbau der Elektroden im Querschnitt. B: Layout der vier Subarrays im Reflexions-Auflicht. Die vier separaten Zuleitungen zu den Arrays sind als schwarze Flächen sichtbar. C: Rasterkraftmikroskopische Aufnahme der W-Zylinderelektroden. Die Oberfläche der W-Elektroden erscheint im Sekundärelektronenkontrast hell, die TiN-Ringe dunkel.

Die Wolfram(W)-Zylinderelektroden wurden im selben Layout wie die TiN-Ringelektroden hergestellt. Statt mit SiO_2 werden die TiN-Wannen dabei mit Wolfram gefüllt. Anschließend werden W und TiN ebenfalls durch chemisch-mechanisches Polieren abgetragen, sodass die W-Zylinder nur noch über die Unterseite leitend verbunden sind.

Die W-Zylinderelektroden sind ebenfalls in vier Arrays aus je 6.256 Elektroden angeordnet. Die Arrays dieser Chips können, im Gegensatz zu denen aus TiN-Ringelektroden, separat angesteuert werden, sodass verschiedene Experimente auf demselben Chip durchgeführt werden können.

Mikrofluidik auf W-Zylinderelektroden

Für Versuche mit einer Mikrofluidik auf dem Chip werden die W-Zylinderelektroden-Chips durchbohrt. Um das Elektrodenarray währenddessen vor Kratzern und Beschädigungen durch Bohrstaub zu schützen, wird es vorher mit dem *First Contact* Reinigungspolymer (Photonic Cleaning Technologies) beschichtet. Anschließend wird eine Bohrschablone aus PET auf dem Chip befestigt, die außer dem Schutz des Arrays auch zur Definition von Abstand und Position der Löcher dient. Der Chip mit Bohrschablone wird auf einem Hubtisch befestigt. Das Durchbohren der Chips erfolgt mit einem Graviergerät mit einer Drehzahl von bis zu

20.000 min⁻¹ (Proxxon) und einem Diamantschleifer mit einem kugelförmigen Kopf mit einem Durchmesser von 0,5 mm (Horico H001005). Das Graviergerät wird dafür senkrecht mit einem Stativ aufgestellt. Der Vortrieb wird manuell mit Hilfe des Hubtisches geregelt. Um die Bildung lungengängiger Stäube zu verhindern, wird ausschließlich im Nassen gebohrt. Dazu genügt es, einen Wassertropfen auf den Chip zu setzen und während des Bohrvorgangs gelegentlich auszutauschen. In jeden Chip werden zwei Löcher gebohrt, eines oberhalb und eines unterhalb der Elektrodenarrays. Der Chip wird anschließend mit dH₂O gereinigt, das Reinigungspolymer wird entfernt und die Arrays werden für die weitere Verarbeitung mit einer frischen Schicht des Reinigungspolymers geschützt.

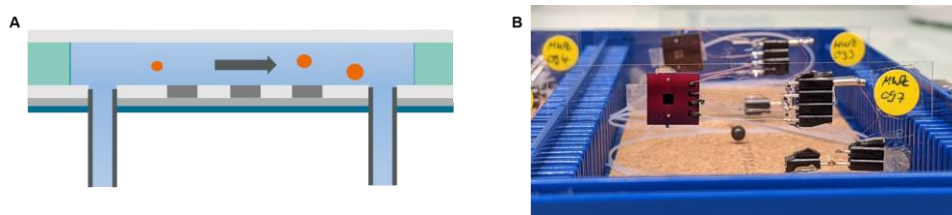


Abbildung 10: Durchbohrte und kontaktierte Wolfram-Zylinderelektroden-Chips (Größe des Chips: 1x1 cm) für die Mikrofluidik. A: Schema des Mikrofluidik-Aufbaus. B: Foto des Chips.

Als Träger für den durchbohrten Chip dient ein ebenfalls durchbohrter Objektträger. Zwei Polytetrafluorethylen-Schläuche mit einem Außendurchmesser von 0,6 mm und einem Innendurchmesser von 0,3 mm (VWR) werden mit einer Rasierklinge auf eine Länge von je ca. 0,45 m zugeschnitten und durch die Löcher von Objektträger und Chip geführt. Der Schlauch kann dabei mit Hilfe einer durch das Loch des Chips eingefädelt Akupunkturnadel stabilisiert und geführt werden. Da der Schlauch etwas stärker ist als das gebohrte Loch, ist er bereits leicht durch die Klemmung fixiert. Die Schnittkante des Schlauches sollte möglichst plan mit der Chipoberfläche abschließen oder leicht versenkt bleiben. Objektträger, Chip und Schläuche werden mit 2-Komponenten-Kleber aneinander befestigt. Nach Aushärten des Klebers können Nadeln und Schutzfilm entfernt und der Chip für die Dielektrophorese kontaktiert werden.

Für den Aufbau des Mikrofluidik-Kanals wird ein Spacer aus einer 100 µm dicken Silikonfolie (ELASTOSIL Film 2030 250/100, Wacker) zugeschnitten und mit einem 1,5 x 8,5 mm² großen Kanal versehen. Der Zuschnitt kann automatisiert mit Hilfe eines Laserplotters erfolgen (Laserplotter Epilog Legend 24TT, Frequenz 5000 Hz, Speed 18 %, Power 16 %). Das Trägermaterial der Folie weist dabei zum Schutz vor entstehenden Rauchpartikeln nach oben. Die Unterseite wird mit Silikonpapier vor Verunreinigungen geschützt. Für eine optimale Haftung des Spacers auf dem Chip ist aber der manuelle Zuschnitt der Spacer mit einem Skalpell

von Vorteil, da glattere Kanten entstehen und sich kein Schmauch auf dem Silikon ablagert. Der zugeschnittene Spacer wird von der Trägerfolie getrennt, auf ein Deckglas platziert und dieses mit leichtem Druck auf den Chip aufgelegt. Das Silikon haftet fest, aber reversibel auf Glas und auf dem Chip, sodass die Fluidik mit einem Fluss von bis zu 1 mL/min stabil ist. Standardmäßig wird ein Fluss von 0,2 mL/min eingestellt. Dazu dient eine Spritzenpumpe (SyringeONE, NewEra pump systems). Zum Anschluss des Schlauches an die verwendete Spritze über die Luer-Lock-Verbindung wird eine Kanüle in das Ende des Schlauches eingeführt und festgeklebt.

2.2. Methoden

2.2.1. Dielektrophorese

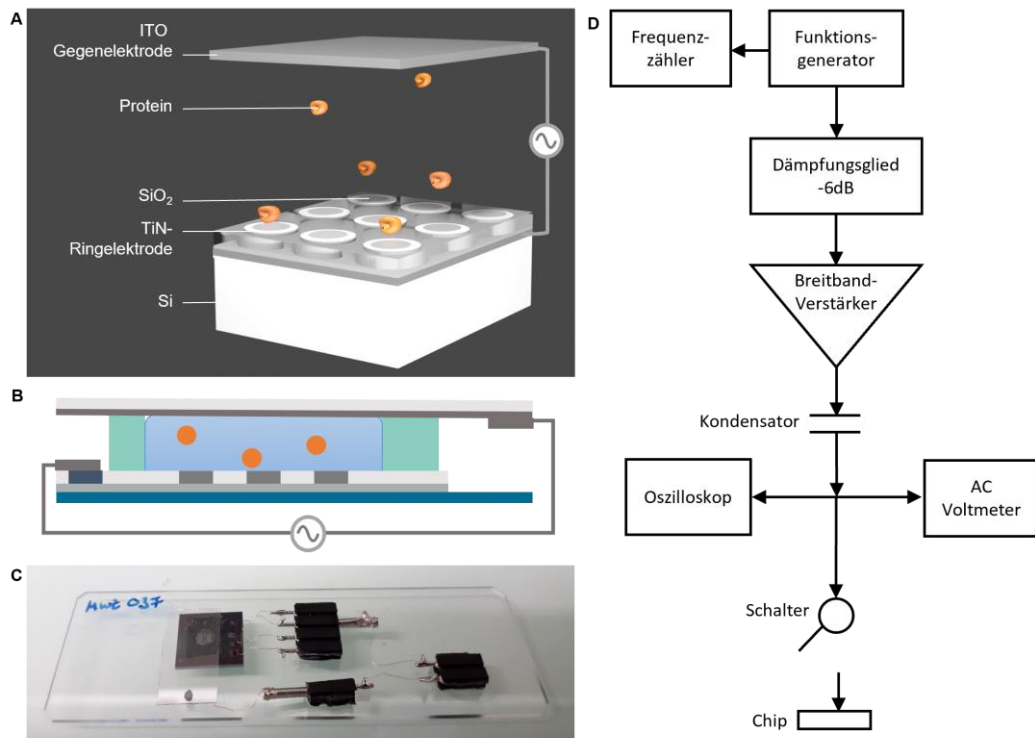


Abbildung 11: DEP auf Elektrodenarrays. **A**; **B**: Schema des experimentellen Aufbaus auf dem Chip. **C**: Foto des W-Zylinderelektroden-Chips (Größe: 1x1 cm) mit ITO-beschichtetem Deckglas als Gegelektrode, Silikonfolie als Spacer und elektrischem Anschluss an Buchsenleisten. **D**: Schema des elektrischen Aufbaus zur Erzeugung und Überwachung der Wechselfelder [90].

An den beschriebenen Elektrodenarrays wird ein inhomogenes elektrisches Wechselfeld erzeugt, durch welches eine Kraft auf die zu immobilisierenden Partikel und Proteine wirkt (Abbildung 11A). Als Gegelektrode dient dabei ein mit Indiumzinnoxid (ITO) beschichtetes Deckglas (70 – 100 Ω , SPI Supplies). Die Chips werden dafür auf Objektträger geklebt. Die Kontaktflächen für die Arrays sowie die ITO-Schicht des Deckglases werden mit je einem Tropfen kohlenstoffbasiertem Leitkleber (Leit-C, Plano) und Kupferdraht elektrisch mit einer Buchsenleiste verbunden. Als reversibel haftender Spacer zwischen Elektrodenarrays und Gegelektrode dient eine 100 μm starke, mit einem Loch ($d = 4 \text{ mm}$) versehene Silikonfolie (ELASTOSIL Film 2030 250/100, Wacker). Der Spacer hält gleichzeitig die Probe zwischen Elektrodenarray und Gegelektrode und schützt diese vor Verdunstung (Abbildung 11B und C). Die resultierende dreidimensionale Anordnung von Arrays aus scharfen Elektroden und der planaren Gegelektrode ist sehr vorteilhaft für DEP-Experimente mit Proteinen [91].

Der elektroosmotische Fluss, der in anderen Anordnungen starke Strömungen erzeugt, wird durch elektrische Felder erzeugt, die parallel zu geladenen Oberflächen wirken [20]. Diese Anordnung trägt zur Minimierung der tangentialen Komponente des E-Feldes bei.

Das elektrische Wechselfeld wird mit Hilfe eines Funktionsgenerators (Model 193, Wavetek) und eines Breitbandverstärkers (TOE 7606, Toellner) erzeugt und über einen Frequenzzähler (Model 7202, Voltcraft), ein Oszilloskop (RTC1002, Rohde & Schwarz) sowie ein AC-Voltmeter (URE, Rohde und Schwarz) überwacht (Abbildung 11C).

Funktionstest der Elektroden mit Beads

Um die Funktion der TiN-Ringelektroden vor dem Gebrauch mit Enzymen zu testen, kann ein kurzes Experiment mit fluoreszierenden Beads als Probe durchgeführt werden. Dafür werden rot fluoreszierende, carboxylierte Polystyrenpartikel mit einem Durchmesser von 0,5 μm verwendet (Thermo Scientific F8812, c (w/v) = 2 %, λ = 580/605 nm). Die Beadsuspension wird im Ultraschallbad resuspendiert, 1:200 in dH_2O verdünnt und die Verdünnung direkt vor der Verwendung erneut im Ultraschallbad behandelt. 2,3 μL der verdünnten Suspension werden auf das mit dem Spacer versehene ITO-Deckglas gegeben und zwischen Elektrodenarray, Spacer und ITO eingeschlossen. Der elektrische Aufbau wird angeschlossen und eine Frequenz von 10 kHz eingestellt. Am Fluoreszenzmikroskop wird beobachtet, ab welcher angelegten Spannung eine Immobilisierung der Beads auf den Elektroden erfolgt. Dafür wird die Spannung von anfänglich 1,5 V_{RMS} schrittweise auf maximal 7 V_{RMS} erhöht.

DEP mit Proteinen

Die aufgetauten, in dH_2O gelagerten Enzymproben werden kurz zentrifugiert, um möglicherweise enthaltene Partikel zu entfernen. Die Proben werden in dH_2O verdünnt, um vergleichbare Leitfähigkeiten einzustellen (HRP: unverdünnt eingesetzt; GOX: Verdünnung 1:2; ChOx: Verdünnung 1:4). 2,3 μL der Probe werden zwischen Chip, Spacer und Gegenelektrode eingeschlossen und über 10 min ein elektrisches Wechselfeld angelegt (10 kHz und 7 V_{RMS} , sofern nicht anders angegeben). Deckglas und Spacer werden danach entfernt und der Chip wird kurz mit dH_2O gespült. Anschließend wird der Chip mikroskopiert und im Fall der HRP dreimal über jeweils 5 min in Phosphatpuffer inkubiert, bevor die Aktivitätsmessungen durchgeführt werden. Für die GOx wurde ein weiterer Inkubationsschritt unter Phosphatpuffer mit BSA und PEG eingeführt. Für den Aktivitätstest an immobilisierter ChOx kann ohne weitere Spülschritte die Mikrofluidik auf dem Chip aufgebaut werden.

Reinigung der Chips nach DEP

Staubpartikel oder vereinzelte Beads, die nach dem Funktionstest auf der Chipoberfläche zurückbleiben können, sind sehr leicht mit Hilfe des *First Contact* Reinigungspolymers (Photonic Cleaning Technologies) zu entfernen. Jeder Chip wird außerdem vor und nach der Benutzung mit dH₂O gespült und im N₂-Strom getrocknet. Bei Bedarf, z.B. nach Experimentreihen mit schlecht wasserlöslichen Farbstoffen, können die Chips mit 70 % Ethanol gereinigt oder mit einem N₂-Plasma behandelt werden (Plasma-Cleaner kINPen Ind, Neoplas Control).

Die TiN-Ringelektroden sind chemisch sehr inert. Deswegen können organische Ablagerungen durch eine „Piranha-Reinigung“ entfernt werden. Dafür wird die stark oxidierende Peroxymonoschwefelsäure direkt auf dem Chip hergestellt, indem 4 µL H₂SO₄ (96 %) und 1,2 µL H₂O₂ (30%) direkt auf dem Chip gemischt werden. Nach 5 min wird die Mischung mit viel Wasser weggespült. Es erfolgt eine kurze Inkubation unter 1,25 M NaOH und 15-minütiges Spülen mit ca. 1 mM Phosphatpuffer pH 7,5, um mögliche Rückstände des Oxidationsmittels zu entfernen. Der Chip wird zuletzt erneut gründlich mit dH₂O gespült und im N₂-Strom getrocknet. Diese Methode wurde nicht für Chips verwendet, auf denen GOx immobilisiert werden sollte, da die Reinigung zu stark erhöhten Blindwerten im gekoppelten GOx-Enzymassay führte. Möglicherweise wurden diese durch Rückstände von H₂O₂ oder die durch die Reinigung aktivierte Oberfläche erzeugt.

2.2.2. Mikroskopie

Fluoreszenzmikroskopie

Die Detektion immobilisierter Enzyme anhand ihrer Fluoreszenz oder der Fluoreszenz ihrer Reaktionsprodukte auf dem Chip erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie. Es wurden zwei Fluoreszenzmikroskope verwendet: das Olympus BX51 und Olympus BX53. Die Versuche mit fluoreszenzmarkierter HRP und Teile der Entwicklung und Validierung des HRP-Aktivitätstests auf Chips erfolgte am BX51. Alle anderen Versuche wurden am BX53 durchgeführt. In den folgenden Tabellen ist das verwendete Zubehör für beide Mikroskope aufgeführt. Die verwendeten Objektive (Tabelle 7) können an beiden Mikroskopen verwendet werden. Das Immersionsmedium für alle gezeigten Aufnahmen war Luft. Das materialwissenschaftliche Objektiv MplanFL ist ein Objektiv für die Mikroskopie an Luft und wird für trockene Präparate ohne Deckglas verwendet.

Die Auswertung und Bearbeitung der Bilder erfolgte mit Hilfe der frei zugänglichen Software ImageJ [92]. Für die quantitative Auswertung der Fluoreszenz auf den regelmäßig angeordneten

Elektrodenarrays entsprechend Gleichung (9) (Seite 62) wurde ein ImageJ-Macro programmiert. Nach Platzierung einer kombinierten *Region Of Interest* kann damit die mittlere Fluoreszenzintensität auf Elektroden und Hintergrund ermittelt und die hintergrundkorrigierte Fluoreszenzintensität berechnet werden. Der Code ist im Anhang aufgeführt.

Tabelle 3: Komponenten der verwendeten Fluoreszenzmikroskope.

Mikroskop, Zubehörteil	Bezeichnung und Hersteller
Olympus BX51:	
Software	Cell ^M version 3.1, Olympus
CCD-Kamera	F-View II, SIS Soft Imaging System/Olympus
LED Lichtquelle	CoolLED pe4000, Acal BFi
Shutter	UniblitZ VCM-D1, Vincent Associates
Olympus BX53:	
Software	CellSens Dimensions, Version 3.2, Olympus
sCMOS Kamera	Orca flash 4.0, Hamamatsu
LED Lichtquelle	CoolLED pe4000, Acal BFi
Shutter	Virtuell (Steuerung der Lichtquelle über die Software)

Tabelle 4: Verwendete Filterwürfel für die Fluoreszenzmikroskopie.

Bezeichnung	Anregung [nm]	Strahlteiler [nm]	Emission [nm]	Mikroskop
WIG	530 - 550	570	> 575	Olympus BX51
Cy5	560 - 680	660	625 - 775	Olympus BX51
Cy3	527 - 552	565	577 - 632	Olympus BX53
FBW	460 - 495	505	> 510	Olympus BX53
ChOx	391 - 437	485	> 495	Olympus BX53
GOx	425 - 475	485	> 495	Olympus BX53

Tabelle 5: Für die gezeigten Aufnahmen verwendete Objektive. Hersteller: Olympus.

Bezeichnung	Vergrößerung	Numerische Apertur
UPlanXApo	4x	0,16
UPlanXApo	10x	0,4
UPlanSApo	40x	0,95
LUCPlan FLN	60x	0,7
MplanFL	100x	0,9

Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) ermöglicht die Abbildung der Elektrodenarrays in submikroskopischer Auflösung. Dafür wurde das REM Evo MA10 (Zeiss) verwendet. Der gezeigte Sekundärelektronenkontrast bildet dabei Unterschiede in der Topografie, dem Material und der Leitfähigkeit bzw. Aufladung der Proben ab. Durch die Auswahl niedriger Beschleunigungsspannungen von ca. 3 kV und Probenströmen im Bereich von 7 - 10 pA ist es möglich, eine übermäßige Aufladung der Proben zu vermeiden. So können auch organische Strukturen ab einer Größe von ca. 20 nm auf dem Chip abgebildet werden, ohne die Proben zuvor mit Gold zu bedampfen [31].

2.2.3. Enzymassays

Die katalytische Aktivität der Enzyme wird ermittelt, indem der Anstieg der Konzentration ihres fluoreszierenden Reaktionsproduktes beobachtet wird. Dies erfolgt entweder an einem Fluoreszenzspektrometer, einem Plattenreader oder mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops.

Als Substrate für den Nachweis der HRP dienen H_2O_2 und das stabile, nicht fluoreszierende Amplex Red. Nach Aktivierung durch ein Molekül H_2O_2 oxidiert die HRP nacheinander zwei Moleküle Amplex Red in Ein-Elektron-Oxidationen zu Amplex-Red-Radikalen. Diese sind nicht fluoreszent. Außerhalb des aktiven Zentrums der HRP reagieren zwei Amplex Red Radikale in einer Disproportionierung zu Amplex Red und, nach Hydrolyse eines Zwischenproduktes, zu fluoreszierendem Resorufin (Abbildung 12). Auf diese Weise ergibt sich eine 1:1 Stöchiometrie zwischen den Substraten H_2O_2 und Amplex Red, obwohl auch im Falle von Amplex Red entsprechend Gleichung (3) (Seite 17) zunächst zwei Moleküle des Protonendonors für die Regeneration der HRP in den Grundzustand benötigt werden [93].

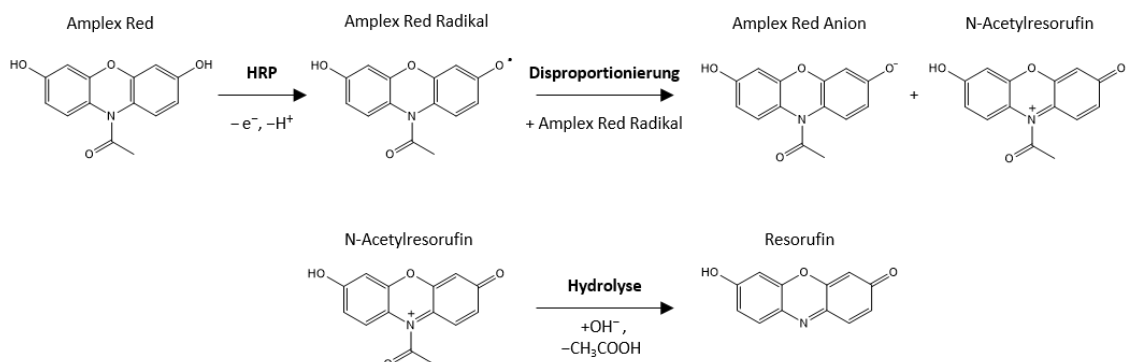


Abbildung 12: Mechanismus des Umsatzes von Amplex Red zu fluoreszierendem Resorufin durch ein-Elektron-Oxidationen entsprechend dem Vorschlag von Dębski et. al. [93].

Diese Reaktion gilt auch als „Goldstandard“ für den Nachweis der Bildung von H_2O_2 [93, 94]. ChOx und GOx erzeugen bei der Oxidation von Cholin bzw. Glucose H_2O_2 , welches hier mit Hilfe der HRP und dem Substrat Amplex Red nachgewiesen wird.

Amplex Red kann auch in Abwesenheit von H_2O_2 und HRP zu Resorufin oxidiert werden, wenn die Lösungen Licht ausgesetzt sind. Dabei wirkt Resorufin, das in Spuren in den Amplex Red Stammlösungen enthalten ist, als Photosensibilisator. Durch Licht angeregtes Resorufin im Triplett-Zustand oxidiert dabei Amplex Red ebenfalls zu einem Amplex Red Radikal. Beim Zerfall der gebildeten Radikale zu Resorufin fällt außerdem Superoxid an [95]. Amplex Red Lösungen und Reaktionsansätze mit Amplex Red sollten deswegen vor dem Raumlicht und insbesondere vor starker Lichtexposition während der Experimente geschützt werden.

Zusammensetzung der Reaktionslösungen

Tabelle 6: Zusammensetzung der optimierten Reaktionslösungen für Enzymassays (Endkonzentrationen)

Analyt	HRP [90]	GOx [96]	ChOx
c Phosphatpuffer [mM]	84	50	88
pH	7,5	7,5	8
c Amplex Red [μM]	26	25	25
Substrat	H_2O_2	Glucose	Cholin
c Substrat	88 μM	50 mM	5 mM
c HRP [g/L]	-	$1.5 \cdot 10^{-5}$ g/L	$1.5 \cdot 10^{-5}$ g/L
PEG 20.000 [% w/v]	0,1	0,1	0,1
BSA [% w/v]	-	0,025	-

In der obenstehenden Tabelle sind die Zusammensetzungen der optimierten Reaktionslösungen zusammengefasst. Für die Assays wurden ausschließlich tagesfrische Verdünnungen der Enzyme, des Ampex Reds und des H_2O_2 verwendet. Die übrigen Lösungen wurden unverdünnt zugegeben. PEG wurde eingesetzt, um die Adsorption der Substrate und Reaktionsprodukte an die SiO_2 -Oberfläche zu reduzieren. Für den GOx-Assay wurde außerdem BSA zugegeben, um die in der Kalibrierung eingetragene BSA-Konzentration aus den GOx-Maßlösungen auch im Assay ohne zugegebene GOx beizubehalten. Ein BSA-Zusatz kann außerdem die Stabilität von immobilisierten Enzymen erhöhen [97]. Zur Kalibrierung der Enzymassays wurden Enzymproben bekannter Konzentration direkt vor Beginn der Messung zugegeben.

Enzyme in verdünnter Lösung neigen zur Adsorption an Gefäßwände. Um den dadurch entstehenden Fehler klein zu halten, kann BSA zugegeben werden, welches dann an Stelle der Enzyme adsorbiert. ChOx- und GOx-Lösungen für die Kalibrierung der Assays wurden

deswegen in Phosphatpuffer mit 0,1 % BSA verdünnt (letzte Verdünnungsstufe GOx: 0,05 % BSA). HRP wurde in Phosphatpuffer mit 0,1 % BSA und 0,1 % Triton X 100 verdünnt. Um eine konstante und reproduzierbare Aktivität zu gewährleisten, wurden die Verdünnungen mindestens 10 min vor Gebrauch hergestellt.

Durchführung am Fluoreszenzspektrometer und Plattenreader

Die scheinbare Aktivität der HRP ist abhängig von der Enzymkonzentration [63]. Diese Abhängigkeit im betreffenden Messbereich wurde durch Messungen am Fluoreszenzspektrometer untersucht. Dafür wurden Reaktionsansätze in Einwegküvetten vorgelegt, HRP bekannter Konzentration zugegeben, durch invertieren gemischt und die Messung am Fluoreszenzspektrometer schnellstmöglich gestartet. Das Endvolumen der Reaktionslösung betrug 1,5 mL. Der Fluoreszenzanstieg bei $\lambda_{\text{ex}} = 540 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 610 \text{ nm}$ innerhalb der ersten Minute der Beobachtung wurde zur Auswertung herangezogen. Damit der Meniskus der Lösung sich nicht innerhalb des Strahlengangs befindet, wurde ein Abstandshalter mit 6 mm Dicke unter der Küvette im Spektrometer eingesetzt.

Wegen der benötigten längeren Messzeit für ChOx und GOx erfolgte die Optimierung der entsprechenden Assays am Plattenreader, in dem bis zu 96 Reaktionsansätze parallel beobachtet werden können. In einer 96-Well-Platte wurden dafür die Reaktionsansätze vorgelegt, ChOx bzw. GOx zugegeben und durch Pipettieren gemischt. Der Anstieg der Resorufin-Konzentration wurde bis zu eine Stunde lang bei $\lambda_{\text{ex}} = 544 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$ beobachtet. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte in Intervallen von 2,5 min.

Durchführung am Fluoreszenzmikroskop

Für die Messung der Enzymaktivität auf dem Chip wurde die Kamera des Fluoreszenzmikroskops als Detektor genutzt. Um die Intensitätswerte in eine Resorufin-Konzentration umrechnen zu können, erfolgten zuvor Kalibrierungen mit bekannten Resorufin-Konzentrationen in Lösung auf dem Chip. Diese wurden unter Berücksichtigung verschiedener Belichtungszeiten bzw. Anregungsintensitäten, Schichtdicken und Deckgläser wiederholt. Die Reaktionslösungen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen vorbereitet, ggf. für Kalibrierungen mit einer bekannten Enzymkonzentration versetzt und auf den Chip pipettiert. Die Reaktionslösung wurde mit einem Deckglas, das mit einem Silikonspacer versehen war, abgedeckt. Der Chip wurde zügig auf dem Kreuztisch des Mikroskops platziert, der durch Vorfokussieren des Chips unter Puffer bereits auf die richtige Position in x-, y- und z-Richtung eingestellt war. Die Beobachtung erfolgte für alle Enzyme mit Hilfe des 60 x Objektivs, dem Filterset Cy3 (Mikroskop Olympus BX51: WIG) und der LED mit $\lambda_{\text{ex}} = 550 \text{ nm}$. Die Leuchtfeldblende blieb dabei so weit wie möglich geschlossen. Die Belichtung mit diesen

Einstellungen erfolgte ausschließlich über die automatische Bilderfassung der verwendeten Software und mit einem automatischen Shutter, um unnötige Photooxidation zu vermeiden.

Für die Messung der HRP-Aktivität wurden 1,5 μL der Substratlösung auf den Chip gegeben und mit einem regulären Deckglas abgedeckt. Als Spacer wurde 100 μm dicke Silikonfolie (ELASTOSIL Film 2030 250/100, Wacker) mit einem Loch mit 5 mm Durchmesser verwendet. Die Beobachtung des Anstieges der Resorufin-Fluoreszenz über 2 min begann schnellstmöglich, also ca. 30 s nach Kontakt der Reaktionslösung mit dem Chip. Das Aufnahmeintervall betrug 10 s, die Belichtungsintensität 100 % und die Belichtungszeit 200 ms (Olympus BX51) oder 50 ms (Olympus BX53). Zur Auswertung wurde der Anstieg innerhalb der ersten 60 s der Beobachtung herangezogen. Für die Berechnung des Anstieges der Resorufin-Konzentration aus den Fluoreszenzintensitäten der Bilder sowie der Konzentration gelöster HRP, der dieser Anstieg entspricht, wurde ein ImageJ Macro verwendet (siehe Anhang 1.2). Die weitere Auswertung der Daten erfolgte durch exponentielle Fits basierend auf einem Levenberg-Marquardt-Algorithmus in Origin Pro 2019 [90].

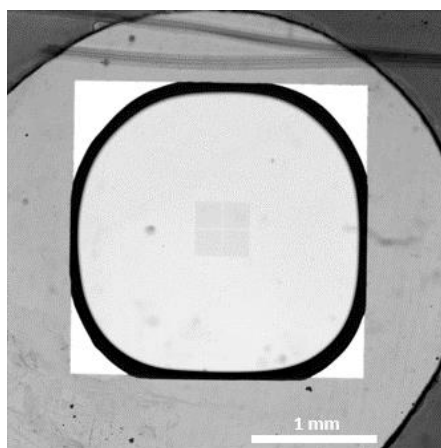


Abbildung 13: Hellfeld-Bild der Substratlösung auf dem TiN-Ringelektroden-Chip. Die Grenzflächen Silikon-Luft (außen, unvollständig abgebildet) und Wasser-Luft sind deutlich als schwarze Ringe erkennbar. Die Grenze zwischen dem glatten Bereich (helles Quadrat) und dem strukturierten Bereich der SiO_2 -Oberfläche hält den Tropfen an der Position der Arrays. Aufnahmeeinstellungen: Olympus BX53, Objektiv 4x, Hellfeld-Filterset, LED 740 nm, 3 %.

Für die Bestimmung der GOx-Aktivität auf dem Chip wurde ein ähnlicher Aufbau verwendet. Statt eines regulären Deckglases wurde jedoch eines aus Polyvinylchlorid-Acetat-Copolymer (Produkt 2225-1, Ted-Pella. Inc.) sowie ein 200 μm dicker Silikonspacer (ELASTOSIL Film 2030 250/200, Wacker) mit einem 4 mm großen Loch verwendet. Es wurden lediglich nominell 0,75 μL der Substratlösung auf dem Chip eingeschlossen. Da der Fehler der Pipette für Volumina unter 1,25 μL hoch ist, wurde die Fläche des Tropfens auf dem Chip mikroskopisch

bestimmt (Hellfeld, LED 740 nm bei 3 % Leistung, Objektiv 4x) (Abbildung 13). Die Dicke der Silikonfolie weicht, bezogen auf die gesamte Breite der Folie, um maximal 10 μm ab und wurde deswegen nicht für die einzelnen Zuschnitte geprüft. Anschließend wurde kurz mit dem 60 x Objektiv im Hellfeld nachfokussiert. Die Beobachtung startete 2,5 min nach Kontakt der Reaktionslösung mit dem Chip am Mikroskop Olympus BX53 in einem Intervall von 2,5min mit einer Belichtungszeit von 50 ms und einer LED-Intensität von 20 %. Ausgewertet wurden die Anstiege der Fluoreszenz zwischen 20 min und 30 min nach Zugabe der Reaktionslösung zum Chip [96].

Die Aktivität der immobilisierten ChOx wurde anhand der intrinsischen FAD-Fluoreszenz beobachtet, welche vom Oxidationszustand abhängt. Dafür wurde nach DEP auf dem bereits durchbohrten und mit Schläuchen versehenen Chip und kurzem Spülen die ab S. 28 beschriebene Mikrofluidik aufgebaut. In die Spritzenpumpe wurde zunächst eine Spritze mit Carbonatpuffer pH 9 eingesetzt und ein Fluss von 0,2 mL/min eingestellt. Der Chip wurde wieder auf dem Kreuztisch des Mikroskops platziert. Nach einigen Minuten konnte die Fluoreszenz der immobilisierten ChOx beobachtet und fokussiert werden. Daraufhin wurde die automatisierte Aufnahme von Zeitserien über das Fluoreszenzmikroskop gestartet (Filtersatz: ChOx; Belichtung: LED 405 nm, 100%, 0,2 – 1 s; Intervall: 20 s). Nachdem das Maximum der Fluoreszenzintensität der immobilisierten ChOx überschritten war, wurde der Fluss kurz gestoppt, die Spritze durch eine mit Cholin in Carbonatpuffer pH 9 ausgetauscht und der Fluss wieder gestartet. Die Beobachtung wurde dabei fortgesetzt. Nach 5 – 10 min wurde wieder die Spritze mit Puffer ohne Cholin eingesetzt.

2.2.4. Proteinnachweis nach Lowry

Die Konzentration fluoreszenzmarkierter Proteine und der inaktiven HRP wurden durch einen Proteinnachweis nach Lowry bestimmt. Dafür wurde ein nach Pomory et. al. modifiziertes Protokoll angepasst und angewendet [98]. Die Messung erfolgte in Dreifachbestimmung. Eine Kalibrierung mit BSA-Lösungen bekannter Konzentrationen als Standard wurde tagesaktuell mit den verwendeten Lösungen angefertigt. Dafür wurde eine tagesfrische Lowry-I-Lösung aus 2 mL 1 % CuSO_4 , 0,2 mL 2 % NaK-Tartrat und 20 mL 2 % Na_2CO_3 und hergestellt. 10 μL der Proben bzw. Kalibrierstandards wurden zu 40 μL 1,25 N NaOH gegeben und gemischt. 500 μL der Lowry-I-Lösung wurden zugegeben, erneut gemischt und über 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 50 μL des Folin-Ciocalteu-Reagenz zugegeben. Nach 2 - 4 h wurden die Proben in eine 96-Well-Platte pipettiert und die Absorption bei 725 nm am Microplate-Reader bestimmt.

2.2.5. Dynamische Lichtstreuung (DLS)

DLS-Messungen an Proteinen wurden in Küvetten mit einem Mindestvolumen von 40 μL durchgeführt. Um die Bildung von Blasen im Strahlengang zu vermeiden, wurden die Messungen mit 60 μL Probe durchgeführt. Die Enzymlösungen wurden in sterilfiltriertem dH_2O auf eine Konzentration von ca. 1 g/L verdünnt und mit Hilfe der Zetaziser Software (Version 7.12) eine Größenbestimmung für Proteine durchgeführt. Dabei wurden der Brechungsindex der Probe (Protein) auf $n = 1,450$, der des Mediums (Wasser) auf $n = 1,330$ und die Viskosität des Mediums auf 0,8872 cP gesetzt. Nach dem Equilibrieren über 120 s bei 25°C startete die Messung im Backscatter-Modus mit Detektion im Winkel von 173°. Die Auswertung erfolgte ebenfalls automatisch über die Software mit einem Modell für die Proteinanalyse.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Qualitätskontrolle der Enzyme und Elektrodenchips

3.1.1. Funktionstest der TiN-Elektroden durch DEP mit Beads

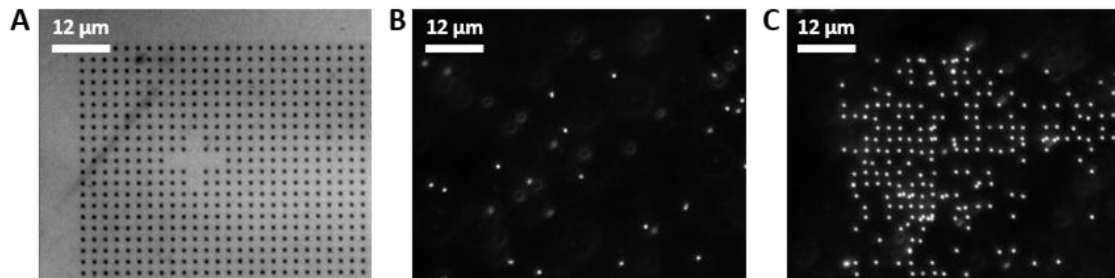


Abbildung 14: Test eines TiN-Ringelektroden-Chips durch DEP mit fluoreszierenden, 500 nm großen Polystyrenpartikeln. **A:** Hellfeld-Bild des Chips (Ausschnitt). **B:** Bead-Suspension auf dem Chip vor Feldapplikation. **C:** temporär immobilisierte Beads auf TiN-Ringelektroden während DEP bei 10 kHz und $2 V_{RMS}$ nach 2 min. Aufnahmeeinstellungen (B und C): Olympus BX 53; Filter Cy3, LED 550 nm (100 %), Belichtung 50 ms, Objektiv 60 x NA 0,7, identische Helligkeits- und Kontrasteinstellung.

Für diese Arbeit wurden zwei Typen von Elektroden verwendet: die W-Zylinderelektroden mit 500 nm Durchmesser in vier separat ansteuerbaren Subarrays, sowie die nur 20 nm breiten TiN-Ringelektroden im selben Layout, aber mit elektrisch miteinander verbundenen Subarrays. Auf den W-Zylinderelektroden können verschiedene Experimente und Kontrollexperimente auf demselben Chip durchgeführt werden. Bei den TiN-Ringelektroden ist eine interne Kontrolle schwieriger. In einigen Fällen konnten durch intensive Reinigung mehrere Experimente auf demselben Chip durchgeführt werden, für andere Experimente war das aufgrund von Nebeneffekten der Reinigung nicht möglich. Zudem waren die Immobilisierungsversuche mit anschließender Aktivitätsmessung zum Teil sehr zeitaufwendig. Deswegen wurde eine schonende Methode zur Qualitätskontrolle dieser Chips vor den Experimenten benötigt, nach der nur eine milde Reinigung vor dem eigentlichen Experiment auf dem Chip durchgeführt wird. Zu diesem Zweck wurde getestet, ob auf dem Chip carboxylierte Polystyrenpartikel mit einem Durchmesser von 500 nm immobilisiert werden können. Die Immobilisierung dieser Partikel auf W-Zylinderelektroden durch DEP bei geringer Spannung ist temporär und dank der Fluoreszenzmarkierung der Partikel innerhalb kürzester Zeit am Fluoreszenzmikroskop messbar [27].

Auch auf den meisten Chips mit TiN-Ringelektroden konnten die Beads immobilisiert werden. Dafür wurde eine Beadsuspension auf das Elektrodenarray gegeben und mit einem ITO-Deckglas als Gegenelektrode sowie einem Spacer bedeckt. Wie für die Versuche mit Enzymen wurde eine Frequenz von 10 kHz eingestellt. Die Spannung wurde schrittweise von $1,5 V_{\text{RMS}}$ auf bis zu $7 V_{\text{RMS}}$ erhöht und bei jeder eingestellten Spannung zwei Minuten lang am Fluoreszenzmikroskop beobachtet, ob eine Immobilisierung der Partikel an den Elektroden stattfindet (Abbildung 14). Auf allen Chips, die für die gezeigten DEP-Experimente mit Enzymen verwendet wurden, war eine Spannung von maximal $3,5 V_{\text{RMS}}$ nötig, um Partikel zu immobilisieren. Auf 6 % der getesteten Chips konnten auch bei Spannungen von $7 V_{\text{RMS}}$ keine Partikel immobilisiert werden. Diese Chips waren wohlmöglich nicht korrekt kontaktiert, wiesen einen Produktionsfehler auf oder waren beschädigt. Auf 23 % der Chips wurde zwar eine Immobilisierung der Beads durch DEP festgestellt, die beobachteten Effekte wichen aber von denen auf den übrigen Chips ab. Die Immobilisierung war auf einigen dieser Chips zu einem großen Anteil permanent, oder es kam zu unspezifischem Kleben der Partikel außerhalb der Elektroden bzw. zu einer Bildung von Ketten oder Haufen immobilisierter Partikel. Diese Chips könnten eine veränderte Oberflächenbeschaffenheit oder Verunreinigungen aufweisen und wurden deswegen ebenfalls nicht für die Immobilisierung aktiver Enzyme verwendet.

3.1.2. Kontrolle der Enzyme auf Aggregation am DLS

Für die Immobilisierung der Enzyme durch DEP auf Elektroden müssen die verwendeten Enzyme in dH_2O bzw. Puffern sehr geringer Leitfähigkeit vorliegen, um Effekte wie joulesche Erwärmung, thermische Strömungen und Elektrolyse zu minimieren [21, 22]. Da die kommerziellen, lyophilisierten Enzympräparate bereits Puffersalze enthalten, wurden sie durch Ultrafiltration aufgereinigt und der Puffer dabei gegen dH_2O ausgetauscht, bis eine ausreichend niedrige Leitfähigkeit erreicht war. Die Struktur von Proteinen wird allerdings oft von Salzen stabilisiert. Geringe Ionenkonzentrationen und vom Optimum abweichende pH-Werte können zur Entfaltung der Proteinstruktur und zur Aggregatbildung beitragen [38].

Die Aktivität der in dH_2O gelagerten Enzyme war gegenüber der ursprünglichen Stammlösungen kaum verändert. Um zusätzlich zu überprüfen, ob die mit geringer Leitfähigkeit gelagerten Enzyme aggregiert sind, wurden DLS-Messungen an den Enzymen durchgeführt. In DLS-Messungen wird die Größenverteilung der Partikel einer Suspension ermittelt. Da die Intensität des Signals in etwa von der sechsten Potenz des Radius abhängt, ist das Gerät sehr empfindlich für die Detektion größerer Partikel, die in der Intensitätsverteilung dementsprechend stärker repräsentiert sind (Abbildung 15) [99]. Bezogen auf die Partikelanzahl oder das Volumen der Partikel einer Probe enthalten die verwendeten Enzyme aber nur einen

sehr geringen Anteil an aggregiertem Protein. Bezogen auf die Partikelzahl lag der Anteil der Aggregate in allen vermessenen Proben unter der Bestimmungsgrenze des Gerätes. Bezogen auf das gesamte Volumen aller Partikel bestand die verwendete HRP zu 100 %, die GOx zu 96 % und die ChOx zu 99 % aus gelösten Mono- bzw. Dimeren. Dementsprechend waren nur maximal 4 % der Enzymmoleküle aggregiert. Die Enzyme können also in dieser Form für DEP-Experimente verwendet werden.

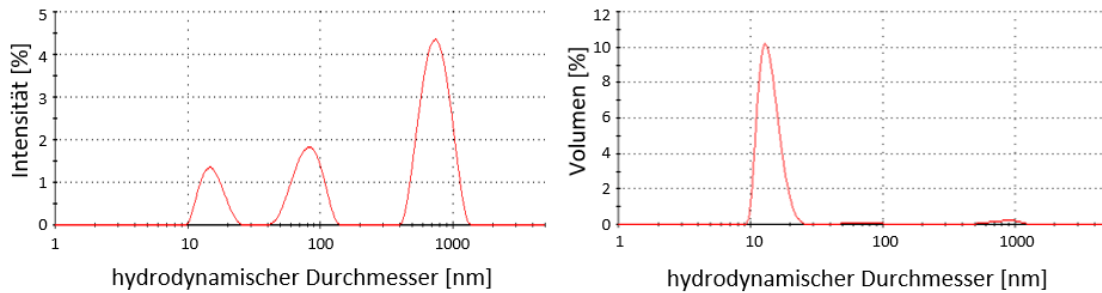


Abbildung 15: Beispiel einer DLS-Messung an 1,2 g/L GOx in dH₂O. Links: Die Intensitätsverteilung zeigt Partikel mit hydrodynamischem Durchmesser von ca. 15 nm, 80 nm und 760 nm. Rechts: Die Volumenverteilung zeigt, dass der Großteil der GOx-Moleküle in der Probe einen hydrodynamischen Durchmesser von 15 nm aufweist.

3.2. DEP mit fluoreszenzmarkierter HRP

3.2.1. Fluoreszenzmarkierte HRP auf W-Zylinderelektroden

Um zu prüfen, ob das Enzym durch DEP auf den verwendeten Elektroden immobilisiert werden kann, wurde zunächst fluoreszenzmarkierte HRP immobilisiert und nachgewiesen. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte durch kommerziell erhältliche NHS-Ester an den oberflächenzugänglichen Lysin-Residuen bzw. dem N-Terminus des Enzyms. Auf der Oberfläche des Isoenzym C der HRP befinden sich drei Lysin-Residuen, sodass die einzelnen HRP-Moleküle mehrfach markiert sein könnten [100]. Die katalytische Aktivität der HRP wurde durch die Fluoreszenzmarkierung nicht beeinträchtigt.

Die Immobilisierung auf W-Zylinderelektroden erfolgte durch Inkubation der in dH₂O gelösten, fluoreszenzmarkierten HRP zwischen dem Elektrodenarray und der Gegenelektrode, zwischen denen ein elektrisches Feld angelegt wurde. In Anlehnung an vorherige Arbeiten mit verschiedenen Proteinen und nach einigen Vorversuchen erwies sich die Immobilisierung über 10 min bei 10 kHz und 7 V_{RMS} als geeignet [6, 42]. Nach Ende der Feldapplikation und Spülen des Chips konnte die permanent immobilisierte HRP anhand ihrer Fluoreszenz auf den Wolfram-Zylinderelektroden nachgewiesen werden (Abbildung 16). Typischerweise fluoreszieren nach DEP die Elektroden des aktiven Arrays sowie die Randelektroden des Nachbararrays. Auf dem aktiven Array ist die Fluoreszenz an den Rändern und Ecken des Arrays am höchsten und nimmt zur Mitte des Arrays hin ab.

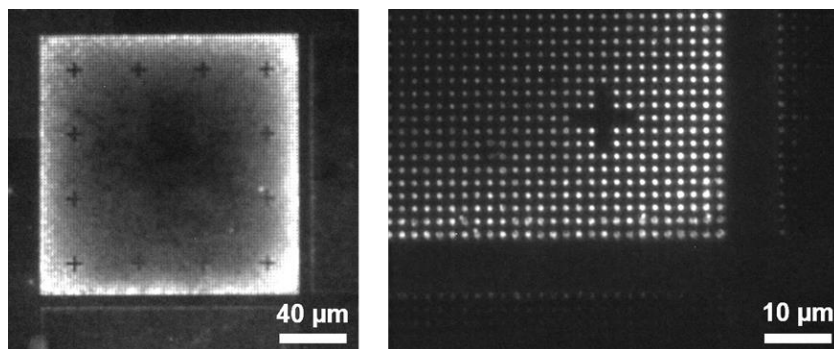


Abbildung 16: Mikroskopische Aufnahmen fluoreszenzmarkierter HRP nach dielektrophoretischer Immobilisierung auf W-Zylinderelektroden. Aufnahmeeinstellungen: Olympus BX 51; Filter Cy5, LED 635 nm (100 %), Belichtung 200 ms, Objektiv 10 x NA 0,4 (links) und 100 x NA 0,9 (rechts).

3.2.2. Fluoreszenzmarkierte HRP auf TiN-Ringelektroden

Alternativ zu den W-Zylinderelektroden wurden auch 20 nm breite TiN-Ringelektroden für die Immobilisierung der Enzyme verwendet. Auch auf diesen konnte durch das Anlegen eines elektrischen Feldes mit 10 kHz und $7 V_{RMS}$ über 10 min fluoreszenzmarkierte HRP immobilisiert werden. Da die Elektroden aller Arrays auf diesen Chips elektrisch verbunden sind und demnach dasselbe Potential aufweisen, wird die HRP auf allen Arrays zugleich immobilisiert.

Wie nach DEP auf den W-Zylinderelektroden war auch auf den TiN-Ringen die Fluoreszenz der markierten HRP nach DEP und Spülen nachweisbar (Abbildung 17). Die Belegung war auf den Randelektroden stärker als im Zentrum der Arrays, der Unterschied war aber weniger deutlich ausgeprägt als auf den W-Zylinderelektroden.

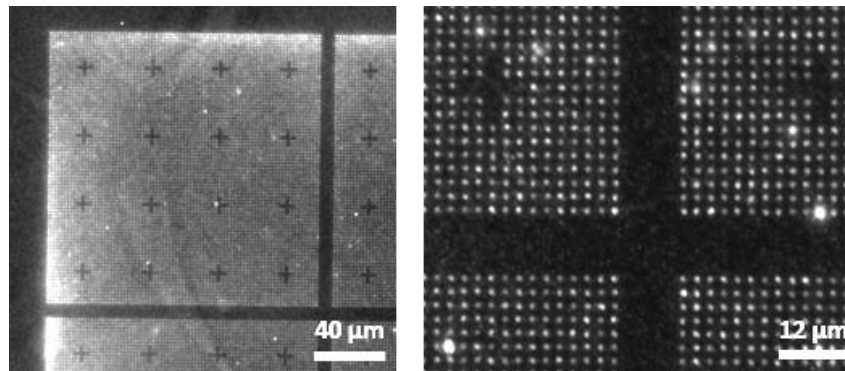


Abbildung 17: Mikroskopische Aufnahmen fluoreszenzmarkierter HRP nach dielektrophoretischer Immobilisierung auf TiN-Ringelektroden. Aufnahmeeinstellungen: Olympus BX 51; Filter Cy5, LED 635 nm (100 %), Belichtung 2 s, Objektiv 10 x NA 0,4 (links) und NA 100 x NA 0.9 (rechts).

3.2.3. Diskussion

Wie aufgrund vorhergehender Arbeiten zu erwarten war, ließ sich die verwendete HRP auf den W-Zylinderelektroden durch DEP unter den gewählten Bedingungen immobilisieren [42]. Die Verteilung auf den Elektroden entsprach ebenfalls den Erwartungen. Aufgrund des höheren Gradienten des elektrischen Feldes auf den Elektroden am Rand des Arrays ist die Belegung dort stärker als auf den übrigen Elektroden [6]. Der AC-elektroosmotische Fluss erzeugt eine Strömung über den einzelnen Elektroden. Außerdem entstehen Strömungen über dem gesamten Array, die durch elektrothermische Effekte erzeugt werden. Diese verlaufen an den Arrayrändern parallel zu den Elektrodenoberflächen und in Richtung Arraymitte, in der Mitte des aktiven Arrays aber nach oben. Dadurch wird die Immobilisierung von Partikeln an den Arrayrändern ebenfalls gegenüber dem Arrayzentrum begünstigt [6, 21, 26, 101, 102].

Auch auf den TiN-Ringelektroden kann die markierte HRP immobilisiert und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Aufgrund der geringeren Elektrodenfläche entstehen weniger Strömungen über den Arrays und somit auch eine gleichmäßigere Belegung durch immobilisiertes Enzym.

Die geringe Lagerungsstabilität der fluoreszenzmarkierten HRP und Probleme mit der Reproduzierbarkeit der Fluoreszenzmarkierung, die wahrscheinlich mit der Hydrolyse-Empfindlichkeit der verwendeten NHS-Ester zusammenhängen, erschwerten die verlässliche Wiederholung der Experimente über längere Zeiträume. Ein wichtiger Vorteil der Immobilisierung durch DEP ist, dass die Methode an sich keine chemische Modifikation der zu immobilisierenden Proteine erfordert. Immobilisierte Enzyme können zudem auch anhand der Fluoreszenz ihres Produktes nachgewiesen werden, das nach dem Umsatz teilweise an der Enzymoberfläche haftet [42]. Die Fluoreszenzmarkierung ist somit weder für die Immobilisierung noch den Nachweis immobilisierter Enzyme erforderlich. In den folgenden Experimenten wurde deswegen auf eine Fluoreszenzmarkierung der untersuchten Enzyme verzichtet.

3.3. Aktivität immobilisierter HRP nach DEP auf TiN-Ringelektroden

Teile dieses Kapitels wurden bereits veröffentlicht in Prüfer, M., Wenger, C., Bier, F. F., Laux, E.-M. u. Hölzel, R.: *Activity of AC electrokinetically immobilized horseradish peroxidase*. *Electrophoresis* 43 (2022) 18-19, S. 1920–1933 [90].

3.3.1. Entwicklung des On-Chip-Assays für die HRP-Aktivität

Aktivitätsmessungen am Fluoreszenzspektrometer

Die Meerrettichperoxidase katalysiert die Oxidation des farblosen Substrates Amplex Red mit H_2O_2 zum fluoreszierenden Resorufin [54]. Diese Reaktion wurde aufgrund der hohen Aktivität des Enzyms gegenüber Amplex Red und der vergleichsweise hohen Stabilität des Substrates für den Nachweis aktiver HRP auf dem Chip ausgewählt [54]. Um später aus dem Fluoreszenzanstieg auf dem Chip auf die Menge an immobilisierter HRP schließen zu können, wurde die Aktivität des Enzyms zunächst am Fluoreszenzspektrometer bestimmt. Es wurden zwei Substratkonzentrationen verwendet, die für den Assay auf dem Chip getestet werden sollten.

Die gemessenen maximalen Wechselzahlen betragen $k_{\text{cat}} = 21,6 \pm 0,7 \text{ s}^{-1}$ (bzw. $A = 30 \pm 1 \text{ U/mg}$) gegenüber $2,6 \mu\text{M}$ Amplex Red und $k_{\text{cat}} = 174 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ (bzw. $A = 237 \pm 4 \text{ U/mg}$) gegenüber $26 \mu\text{M}$ Amplex Red. Die Aktivität des Enzyms hing scheinbar von der eingesetzten Enzymkonzentration ab (Abbildung 18A). Die maximale Aktivität wurde bei HRP-Konzentrationen über $0,03 \text{ nM}$ erreicht. Bei höheren HRP-Konzentrationen war die Wechselzahl konstant und der Anstieg der Resorufin-Konzentration hing linear von der HRP-Konzentration ab. Bei den niedrigsten gemessenen Konzentrationen betrug die scheinbare Wechselzahl aber nur 60 – 65 % des Maximums.

Dass die Wechselzahl der HRP gegenüber Amplex Red von der HRP-Konzentration abhängt, war bereits literaturbekannt. Die Ursache ist vermutlich, dass der letzte Schritt in der Bildung des fluoreszierenden Resorufins eine enzymunabhängige Dismutation von zwei Amplex Red Radikalen ist. Wenn die HRP- und somit auch die Radikal-Konzentration gering ist, können die Amplex Red Radikale mit höherer Wahrscheinlichkeit anderweitig abreagieren und andere Produkte bilden, z.B. durch die Reaktion mit Gefäßoberflächen. Dadurch entsteht weniger Resorufin und die HRP-Aktivität scheint mit geringeren Enzymkonzentrationen zu sinken [63, 93].

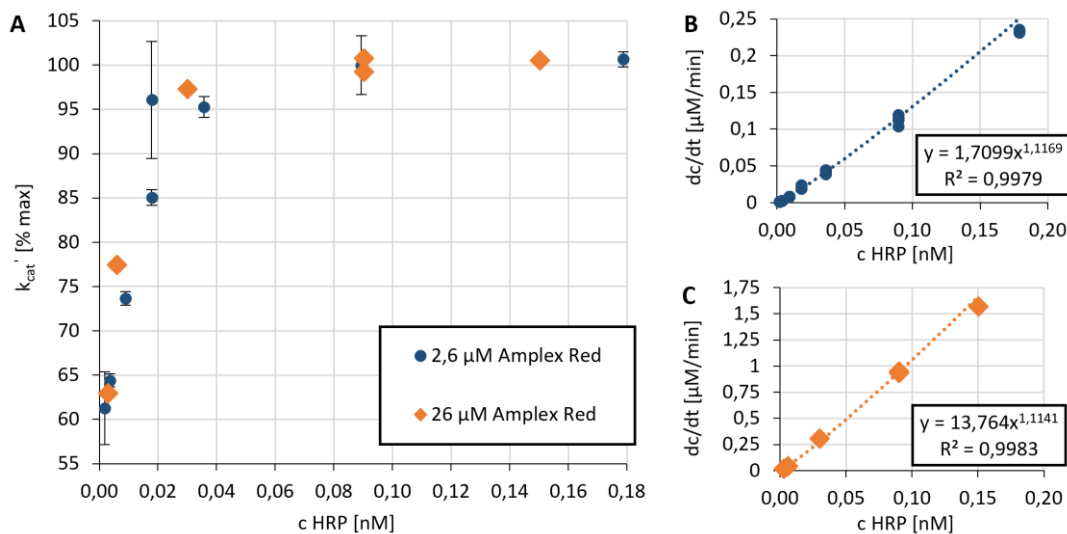


Abbildung 18: Aktivität der HRP in Abhängigkeit von HRP- und Amplex Red Konzentration [90].
 A: Konzentrationsabhängigkeit der scheinbaren Wechsellzahl für beide Substratkonzentrationen.
 B, C: Nichtlineare Regression für die Berechnung der HRP-Konzentration aus dem Anstieg der Resorufin-Konzentration (B: 2,6 µM Amplex Red, C: 26 µM Amplex Red).

Der Messbereich für die Assays auf dem Chip kann nicht auf den Bereich konstanter Wechsellzahl beschränkt werden. Eine vollständige Monolage aus HRP-Molekülen auf allen TiN-Ringelektroden auf einem Chip bestünde aus ca. 1,9 pg HRP. Mit einem Probenvolumen von 1,5 µL beträgt die erwartete HRP-Konzentration demnach 0,03 nM und liegt somit noch unterhalb des möglichen linearen Bereichs einer Kalibrierung. Deswegen wurden nichtlineare Kalibrierfunktionen berechnet (Abbildung 18B und C). Für die Berechnung der HRP-Konzentration aus dem Anstieg der Resorufin-Konzentration gilt demnach folgende Kalibriergleichung:

$$c(\text{HRP}) [\text{nM}] = \left(\frac{1}{g} \cdot \frac{dc_{\text{Resorufin}}}{dt} \right)^{\frac{1}{f}} \quad (4)$$

Mit $f = 1,12$ und $g = 1,76$ für $c(\text{Amplex Red}) = 26 \mu\text{M}$

und $f = 1,14$ und $g = 13,76$ für $c(\text{Amplex Red}) = 2,6 \mu\text{M}$

Übertragung des Assays auf den Chip: Messungen mit HRP in Lösung

Die am Fluoreszenzspektrometer kalibrierten HRP-Assays wurden nun auf das kleinere Volumen auf dem Chip übertragen. Statt in einer Küvette erfolgte die Messung direkt in einem 1,5 µL großen Tropfen der Substratlösung, die mit Hilfe eines Silikonspacers und eines Deckglases auf dem Chip gehalten wurde. Als Detektor diente die Kamera eines Fluoreszenzmikroskops. Mit Hilfe von Kalibriergeraden, die an im selben Aufbau eingeschlossenen Resorufin-Lösungen bekannter Konzentration gemessen wurden, können die

Helligkeitswerte der automatisch aufgenommenen Bilder in die vorliegende Resorufinkonzentration umgerechnet werden. Um die Assays auf dem Chip zu validieren und die besser geeignete Amplex Red Konzentration auszuwählen, wurden zunächst Messungen mit bekannten HRP-Konzentrationen durchgeführt, die direkt vor der Platzierung auf dem Chip zur Substratlösung gegeben wurden. Aus dem gemessenen linearen Anstieg der Resorufinkonzentration auf dem Chip und der entsprechenden Kalibrierfunktion wurde die wiedergefundene Konzentration und Masse des eingesetzten Enzyms berechnet (Tabelle 7). Dreifachmessungen ermöglichen die Berechnung der Quantifizierungsgrenze LOQ entsprechend der Gleichung (5) [103].

$$LOQ = \bar{y}_{blank} + 1,645 \cdot \sigma_{blank} + 1,645 \cdot \sigma_{low} \quad (5)$$

mit \bar{y}_{blank} = Mittelwert der Blindwerte

σ_{blank} = Standardabweichung der Blindwerte

σ_{low} = Standardabweichung der niedrigsten getesteten Konzentration

Tabelle 7: Blindwerte, Wiederfindung und Detektionslimit für Messungen mit gelöster HRP bekannter Konzentration in Amplex Red Assays auf TiN-Ringelektroden-Chips.

Eingesetzt Menge HRP	Wiedergefundene Menge HRP	
	Ansatz: 2,6 μ M Amplex Red	Ansatz: 26 μ M Amplex Red
0 pg	-0,01 \pm 0,00	0,00 \pm 0,01
0,2 pg	0,20 \pm 0,08	0,28 \pm 0,02
2 pg	1,2 \pm 0,1	2,1 \pm 0,1
10 pg	8,9 \pm 0,4	13,7 \pm 0,7
Quantifizierungsgrenze LOQ	0,12 pg	0,06 pg

Wurden Ansätze mit der höheren gewählten Amplex-Red-Konzentration verwendet, konnte es zu einer Überbestimmung der HRP-Konzentration kommen (Tabelle 7). Wegen der geringeren Standardabweichung, besonders für geringe HRP-Konzentrationen, ergibt sich aber auch eine niedrigere Quantifizierungsgrenze von nur 60 fg HRP auf dem Chip. Weil eher geringe Mengen an HRP auf dem Chip erwartet wurden, wurde der empfindlichere Ansatz mit 26 μ M Amplex Red für die folgenden Experimente gewählt.

Die Überbestimmung der HRP-Konzentration könnte durch Photooxidation verursacht worden sein. Durch Licht angeregtes Resorufin im Triplett-Zustand kann Amplex Red vermutlich zu Radikalkationen oxidieren, welche dann selbst zu Resorufin zerfallen. Das aktivierte Resorufin-Radikal wird durch die Reaktion mit Sauerstoff unter Bildung von $O_2^{\cdot-}$ regeneriert [95]. Am

Fluoreszenzmikroskop wird der Ansatz stärker dem Anregungslicht ausgesetzt als am Fluoreszenzspektrometer, weshalb dieser Effekt bei den Messungen auf dem Chip entsprechend ausgeprägter ist als in Küvetten. Zudem kann das geringe Volumen und das große Oberflächen-Volumen-Verhältnis auf dem Chip zusätzliche störende Effekte verursachen, wie die Verschleppung von Spuren von Enzym oder Produkt bei Wiederholungsversuchen auf demselben Chip, Akkumulation der Produkte an der Oberfläche und damit im Fokus des Fluoreszenzmikroskops oder auch katalytische Effekte der Oberflächen. Bedenkt man das 1000-fach verkleinerte Volumen im Vergleich zur Messung in der Küvette, erscheinen die Abweichungen akzeptabel.

Der Amplex Red Assay funktionierte auf den TiN-Ringelektroden-Chips zuverlässig. Wurden stattdessen W-Zylinderelektroden verwendet, traten bei Blindwertmessungen falsch-positive Ergebnisse auf. Der Anstieg der Resorufin-Konzentration entsprach dabei bis zu 3 pg HRP auf dem Chip, lag also in der Größenordnung der erwarteten HRP-Aktivität bei vollständiger Belegung aller Elektroden mit aktivem Enzym. Die hohen Blindwerte wurden wahrscheinlich durch die katalytische Aktivität der Elektrodenoberflächen verursacht. Wolframoxid-Nanopartikel katalysieren verschiedene Redoxreaktionen und auch Photooxidationen [104, 105]. Andere Metalloxid-Nanopartikel interferieren nachweislich mit dem hier verwendeten Amplex Red Assay [106]. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass sich auf den Elektrodenoberflächen Oxide gebildet haben, die auch ohne Zugabe von HRP die Oxidation von Amplex Red katalysieren. Für die Immobilisierung der HRP mit anschließendem quantitativem Nachweis der Aktivität über einen Amplex Red Assay oder ein ähnliches Substrat sind die W-Zylinderelektroden deswegen nicht geeignet.

3.3.2. Aktivität der HRP nach DEP: drei Modelle für die Stabilität des Immobilisats

Der auf dem Chip etablierte Amplex Red Assay mit 26 μM Amplex Red wurde eingesetzt, um die Aktivität immobilisierter HRP auf TiN-Ringelektroden zu bestimmen. Dafür wurde unmarkierte HRP mit einer Konzentration von 4 g/L HRP über 10 min bei 10 kHz und 7 V_{RMS} auf dem Chip immobilisiert. Nachdem der Chip für 15 min in Phosphatpuffer pH 7,5 inkubiert wurde, um ungebundene HRP zu entfernen, erfolgte die Messung der Aktivität auf dem Chip. Nach der Messung wurde die benutzte Substratlösung abgespült und die Aktivität auf dem Chip erneut gemessen. Die Aktivitätsmessung wurde mit jedem Immobilisat mindestens sieben Mal durchgeführt (Abbildung 19). Nach den Messungen und der Untersuchung des Immobilisats am Fluoreszenzmikroskop wurden die Chips gereinigt und gegebenenfalls für einen weiteren Immobilisierungsversuch eingesetzt.

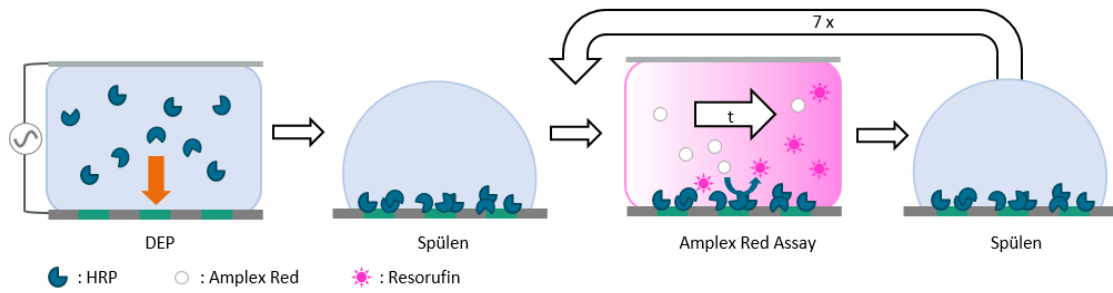


Abbildung 19: Ablauf der Aktivitätsbestimmung für immobilisierte HRP auf TiN-Ringelectroden [90].

Der Anschaulichkeit halber wurden die gemessenen Aktivitäten auf den Chips in die Menge gelöster HRP umgerechnet, der diese Aktivität entspricht. Die Aktivität des ersten Immobilisats auf Chip 01 entsprach in der ersten Messung 7,5 pg gelöster HRP. Mit jeder weiteren Messung sank die gemessene Aktivität, schien sich aber asymptotisch auf einen finiten Wert hinzubewegen (Abbildung 20). Daraufhin wurde versucht, durch Fitfunktionen (kleinste Quadrate) mehr Informationen aus den ermittelten Daten zu erhalten. Es wurden drei Modelle aufgestellt und ihre Eignung für die Approximation der Daten getestet:

$$m_{HRP}[pg] = m_1 \cdot e^{-\frac{N}{k_1}} \quad (6)$$

$$m_{HRP}[pg] = m_1 \cdot e^{-\frac{N}{k_1}} + m_2 \quad (7)$$

$$m_{HRP}[pg] = m_1 \cdot e^{-\frac{N}{k_1}} + m_2 + m_3 N \quad (8)$$

mit N = Anzahl der Mess- und Waschzyklen

m_1 = temporär adsorbierte HRP

k_1 = Waschrage von m_1

m_2 = permanent immobilisierte HRP

m_3 = Rate des linearen Aktivitätsverlusts von m_2

Das Modell (6) beschreibt einfaches, vollständiges Waschen des Enzyms vom Chip entsprechend dem Nernst'schen Verteilungssatz. Modell (7) entspricht ebenfalls einem exponentiellen Abfall der Aktivität, allerdings gegen einen konstanten Term anstatt gegen null, also einem Anteil permanent immobilisierter HRP. Modell (8) berücksichtigt zudem eine lineare Inaktivierung oder Desorption der permanent immobilisierten HRP.

Die Modelle wurden in Origin an die Daten der Aktivitätsmessungen auf Chip 01 angepasst (Abbildung 20). Der Abfall der Aktivität wird am überzeugendsten durch Modell (8) abgebildet. Die Anpassung der errechneten Kurve an die Daten ist nicht nur augenscheinlich am besten, sondern auch das Residuendiagramm zeigt deutlich kleinere und zufälliger verteilte Residuen. Die Residuen der gefitteten Funktionen nach Modell (6) und (7) zeigen dagegen einen deutlichen Trend. Dies weist darauf hin, dass ein Term im Anpassungsmodell fehlt. Auch das korrigierte R^2 , das anders als das unkorrigierte Bestimmtheitsmaß R^2 die Anzahl der Parameter berücksichtigt und deshalb besser für den Vergleich von Modellen verschiedener Komplexität geeignet ist, ist für die Anpassung nach Modell (8) am höchsten. Damit scheint Modell (8) den Mechanismus der Aktivitätsabnahme auf dem Chip am besten zu beschreiben.

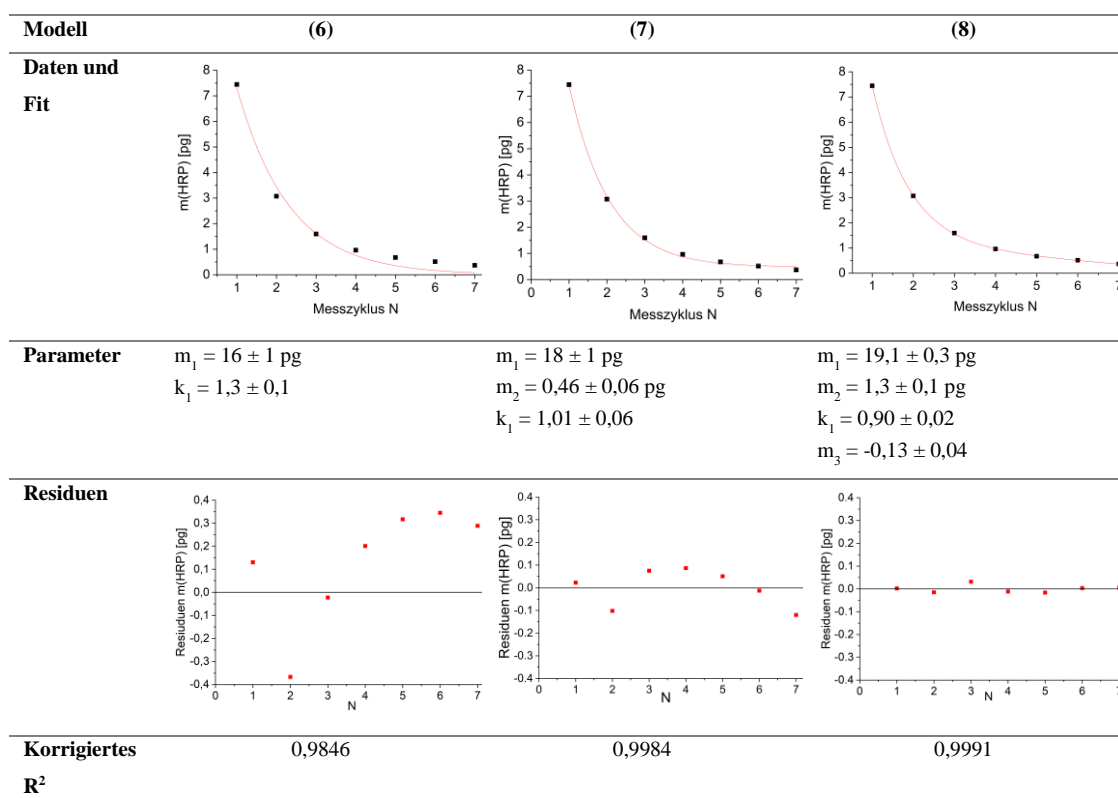


Abbildung 20: HRP-Aktivität in Äquivalenten gelöster HRP und Ergebnis der exponentiellen Fits der HRP-Aktivität nach DEP auf Chip 1, Durchgang 1 [90].

Eine mögliche Interpretation ist, dass zwei Fraktionen des Enzyms immobilisiert wurden: m_2 ist permanent immobilisiert, wird aber linear mit jedem Messzyklus inaktiviert. m_1 ist dagegen nur temporär immobilisiert, möglicherweise durch Adsorption auf der SiO_2 -Oberfläche, und wird exponentiell mit jedem Messzyklus abgewaschen. Versuche zur Immobilisierung von Virenmaterial auf W-Zylinderelektroden durch DEP haben ebenfalls ergeben, dass die Viren nur zum Teil permanent immobilisiert wurden. Das temporär immobilisierte Material löste sich durch Diffusion, vor allem aber durch Scherkräfte und Spülen von den Elektroden [102].

Die Immobilisierung der HRP und die Aktivitätsmessungen wurden auf demselben und weiteren Chips jeweils ein bis zwei Mal wiederholt. Bei allen Versuchen auf Chip 01, 03 und 05 lassen sich die Daten ebenfalls am besten durch Modell (8) anpassen. Insbesondere der Parameter m_2 , der den permanent immobilisierten Anteil der HRP darstellt, ist mit einer Aktivität entsprechend 0,8 – 1,3 pg HRP für diese Chips ähnlich (Abbildung 21). Die lineare Inaktivierung m_3 beträgt in diesen Fällen 6 - 10% der Anfangsaktivität pro Messung. Die Aktivität der temporär immobilisierten HRP m_1 variiert dagegen stärker. Wahrscheinlich wird dieser Parameter stark durch geringe Abweichungen beim Spülprozess vor den Messungen oder auch durch Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit der Chips beeinflusst.

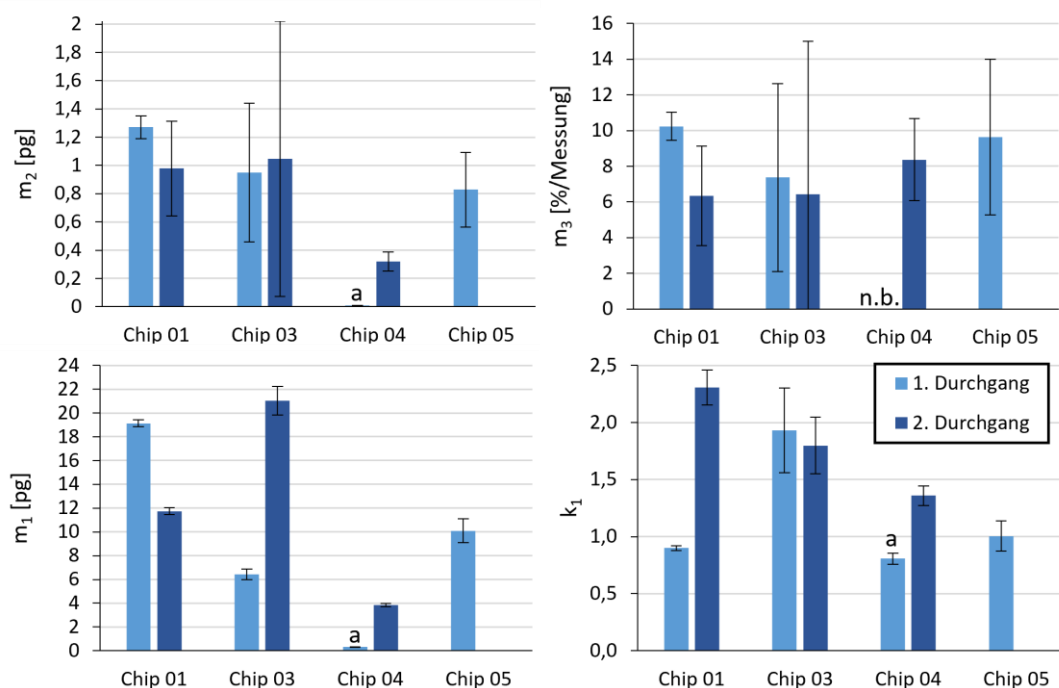


Abbildung 21: Fit-Ergebnisse für die Aktivität der HRP gegenüber 26 μM Amplex Red nach DEP auf TiN-Ringelectroden. Fits wurden entsprechend Modell (8) durchgeführt oder, im mit a gekennzeichneten Fall, mit Modell (7) (Modelle: s.S. 51). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Parameter, die durch das Fit-Programm angegeben wurden. n.b.: nicht bestimmt.

Im Gegensatz zu den anderen diskutierten Chips wurde auf Chip 04 weniger aktive HRP immobilisiert. Im ersten Versuch fiel die HRP-Aktivität auf dem Chip innerhalb weniger Messungen unter die Bestimmungsgrenze. Im zweiten Versuch entsprach die Aktivität des permanenten Immobilisats nur ca. 0,3 pg gelöster HRP, also weniger als halb so viel wie auf den drei anderen Chips (Abbildung 21). Die Ergebnisse auf diesem Chip werden deswegen als Ausreißer betrachtet. Wohlmöglich ist die elektrische Kontaktierung dieses Chips schlechter oder die Oberfläche wurde verunreinigt. Auch bei der Qualitätskontrolle der Chips mit Polystyrenpartikeln fielen bereits Abweichungen zwischen einzelnen Chips auf. Subtilere

Unterschiede der Oberflächenbeschaffenheit, Kontaktierung oder Topografie des Chips werden durch die Kontrollversuche eventuell nicht abgebildet, können aber trotzdem Unterschiede bei der Immobilisierung von Proteinen hervorrufen.

Die Aktivität der permanent immobilisierter HRP auf den drei zuverlässig funktionierenden Chips erscheint dagegen realistisch. Die erwartete Menge an HRP kann aus der Geometrie der Elektroden und des Enzymmoleküls abgeschätzt werden. Auf jedem Chip befinden sich 25.024 Ringelektroden mit einem Außerdurchmesser von 500 nm und einer Breite von 20 nm. Die Fläche aller Elektroden beträgt somit $7,55 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2$. Der Flächenbedarf des Enzyms kann aus dem Streumasseradius berechnet werden [107]. Dieser beträgt für die HRP 2,65 nm [108]. In einer lockeren Kugelpackung betrüge der Flächenbedarf eines HRP-Moleküls $2,81 \cdot 10^{-17} \text{ m}^2$. Demnach passen 1073 HRP-Moleküle auf jede Elektrode bzw. $4,46 \cdot 10^{-17} \text{ mol}$ HRP auf die Elektroden eines Chips. Dies entspricht bei einer molaren Masse von 44 kDa 1,96 pg HRP. Die gemessene Ausgangsaktivität der permanent immobilisierten HRP auf den zuverlässig funktionierenden Chips entspricht 0,82 – 1,27 pg HRP. Korrigiert man diesen Wert um die mögliche Überbestimmung der HRP-Aktivität um bis zu 37 % (siehe Tabelle 7) entspricht die Aktivität im Mittel $0,7 \pm 0,1 \text{ pg}$ gelöster HRP bzw. $38 \pm 6 \%$ der Aktivität der HRP, die als Monolage auf den Elektroden Platz finden würde.

3.3.3. Fluoreszenzmikroskopie nach dem Umsatz: Hinweise auf die Verteilung der HRP

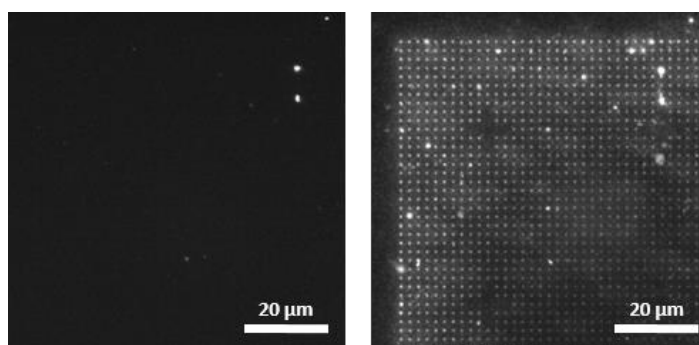


Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme immobilisierter HRP auf TiN-Ringelektroden nach DEP (links) und nach Amplex Red Umsatz (rechts) [90]. Maßstab, Helligkeits- und Kontrasteinstellungen sind identisch für beide Ausschnitte. Aufnahmeeinstellungen: Olympus BX 53; Filter Cy3, LED 550 nm (100 %), Belichtung 2 s, Objektiv 100 x NA 0.9.

Vor und nach den Aktivitätsmessungen mit Amplex Red wurden Bilder der Arrays im Trockenen mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Weil unmarkierte HRP immobilisiert wurde, war nach DEP bzw. vor der Inkubation mit Amplex Red nahezu keine

Fluoreszenz auf dem Chip detektierbar (Abbildung 22A). Nach den Umsatzversuchen wurden die Chips erneut mikroskopiert. Auf den Chips mit katalytisch aktivem Immobilisat waren die Elektroden nun deutlich im für Resorufin spezifischen Fluoreszenzkanal zu erkennen (Abbildung 22B). Die Fluoreszenzintensität ist dabei an den Rändern der Arrays höher als im Zentrum.

Die Fluoreszenz auf den Elektroden ist auf die Adsorption des fluoreszierenden Produkts Resorufin an den immobilisierten Proteinmolekülen zurückzuführen. An den Rändern des Arrays adsorbierte mehr Resorufin als im Zentrum, was darauf schließen lässt, dass hier auch mehr HRP, wahrscheinlich in mehreren Schichten, immobilisiert wurde. Eine ähnliche Verteilung entstand bei DEP mit fluoreszenzmarkierter HRP (Abbildung 16) bzw. BSA auf W-Zylinderelektroden und ist auf den höheren Gradienten des elektrischen Feldes in den Randbereichen der Arrays sowie Feld-induzierte Strömungen zurückzuführen [6]. Die Färbung von immobilisierter HRP durch das fluoreszierende Reaktionsprodukt ist auch für den Umsatz von Dihydrorhodamin 123 zu Rhodamin 123 bekannt und erfolgt ebenfalls selektiv auf den mit HRP belegten Elektroden [42]. Durch die Markierung der HRP durch das Reaktionsprodukt Resorufin kann so auch ohne vorherige Fluoreszenzmarkierung die Immobilisierung der HRP spezifisch am Ort der Elektroden nachgewiesen werden.

3.3.4. Unspezifische Adsorption ohne Feldeinwirkung

Um eine Fehlinterpretation der Ergebnisse der Aktivitätsmessungen an immobilisierter HRP auszuschließen, wurden mehrere Kontrollexperimente durchgeführt. Die erste Variante der Blindprobe ist die Immobilisierung der HRP ohne Feldeinwirkung. Dafür wurde das Enzym in derselben Konzentration wie während der Immobilisierung durch DEP und ebenfalls über 10 min auf dem Chip inkubiert. Die Elektroden waren dabei aber nicht mit der Spannungsquelle verbunden. Anschließend wurde der Chip wie zuvor nach DEP gespült und mehrmals die HRP-Aktivität gemessen. Dieser Versuch erfolgte auf jedem Chip mindestens einmal mit drei bis fünf Messzyklen. Auf Chip 3 wurde zudem ein Messdurchlauf mit sieben Messzyklen durchgeführt, um auch für diesen Fall exponentielle Fits in Origin durchzuführen.

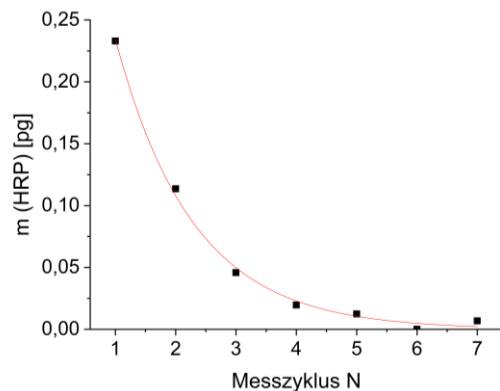


Abbildung 23: Exponentieller Fit der gemessenen HRP-Aktivität nach Adsorption von HRP auf Chip 03 ohne Feldeinwirkung in Abhängigkeit der durchgeführten Mess- und Waschzyklen. Fit entsprechend Modell (6).

Der Vergleich von Abbildung 20 und Abbildung 23 zeigt, dass die HRP-Aktivität auf dem Chip nach der unspezifischen Adsorption bereits in der ersten Messung um mindestens eine Größenordnung kleiner war als nach erfolgreicher Dielektrophorese. Die Aktivität sank innerhalb weniger Messungen unter die Bestimmungsgrenze. Das geeignetste Modell für die Anpassung der längeren Aktivitätsreihe mit einem exponentiellen Fit ist das einfache Modell exponentiellen Waschens gegen null laut Gleichung (6) (Abbildung 23). Somit wurde keine permanent adsorbierte HRP detektiert. Die Aktivität temporär adsorbierter HRP auf diesem Chip entsprach $m_1 = 0,51 \pm 0,03$ pg gelöster HRP. Auch die Menge temporär immobilisierter bzw. adsorbierter HRP ist somit etwa um eine Größenordnung kleiner als bei Aktivitätsmessungen nach erfolgreicher Dielektrophorese auf Chip 01, 03 und 05.

Dieser Versuch zeigt, dass die permanente Immobilisierung der HRP auf die Wirkung des elektrischen Feldes und nicht z.B. auf passive Adsorption an die Oberfläche des Chips zurückzuführen ist. Allerdings ist auch die Menge temporär immobilisierten HRP im Dielektrophorese-Experiment höher als nach unspezifischer Adsorption. Dieser Beobachtung können mindestens zwei Phänomene zu Grunde liegen. Einerseits könnte die Adsorption der Proteine an die SiO_2 -Oberfläche durch feldinduzierte Strömungen begünstigt worden sein, da ständig neues Enzymmaterial für die Adsorption zur Verfügung steht. Andererseits könnten an den permanent durch DEP immobilisierten Enzymen zusätzliche Proteine temporär adsorbieren, die während der späteren Waschschrte leicht wieder abgelöst werden können.

3.3.5. Immobilisierung inaktiver Proteine als Blindproben

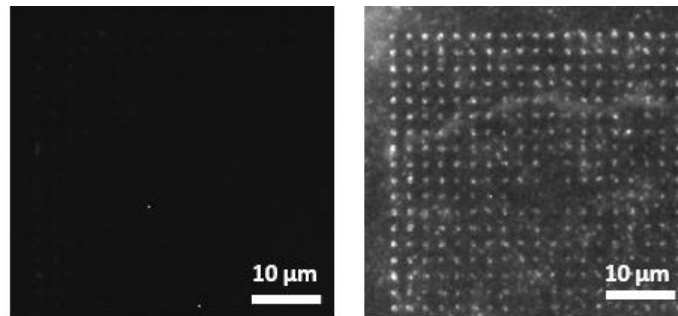


Abbildung 24: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von BSA immobilisiert auf TiN-Ringelektroden vor (links) und nach (rechts) Inkubation mit 10 μM Rhodamin 123 [90]. Aufnahmeeinstellungen: BX53, Filter FBW, LED 470 nm (100%), Objektiv 100x NA 0,9, Belichtungszeit 2 s. Beide Aufnahmen sind mit identischen Kontrasteinstellungen dargestellt.

Als eine zweite Art der Kontrollmessung wurden inaktive Proteine immobilisiert und deren Aktivität im Amplex Red Assay ermittelt. Dafür wurden BSA und durch Azid inaktivierte HRP verwendet sowie der frisch gereinigte Chip 01, auf dem zuvor erfolgreich aktive HRP immobilisiert worden war. So sollte ermittelt werden, ob die Fluoreszenzanstiege statt durch die katalytische Aktivität immobilisierter HRP durch andere Effekte verursacht worden sind, z.B. eine Veränderung der Elektroden durch das elektrische Feld oder durch Adsorption von Spuren von Resorufin an inaktive Proteine.

Weder immobilisiertes BSA noch inaktivierte, immobilisierte HRP wiesen größere HRP-Aktivitäten auf als die Elektroden ohne immobilisiertes Enzym. Da kaum Resorufin gebildet wurde, bleibt auch die Färbung der Immobilisate durch das fluoreszierende Reaktionsprodukt aus. Interessanterweise konnten die immobilisierten Enzyme auch nicht durch einen zugegebenen Resorufin-Standard gefärbt werden. Möglicherweise ist für die Resorufinfärbung der aktiven HRP eine höhere Konzentration des Farbstoffes notwendig, die sich kurzzeitig und lokal während der Umsatzversuche einstellt, oder die gebildeten Amplex-Red-Radikale sind daran beteiligt. Stattdessen kann immobilisiertes BSA durch das polarere, positiv geladene Rhodamin 123 gefärbt werden (Abbildung 24).

Serum-Albumine binden eine Vielzahl verschiedener Liganden, z.B. Fettsäuren, Aminosäuren, Arzneistoffe verschiedener Ladung sowie Metallionen [109]. Das bei pH 7 mehrfach negativ geladene BSA bindet das positiv geladene Rhodamin 123 vermutlich besser, eventuell auch unspezifisch, als das unpolare, ungeladene Resorufin [110]. Das so gefärbte BSA zeigt die erwartete Fluoreszenzverteilung. Der Farbstoff haftete auf den Elektroden stärker als auf dem SiO_2 -Hintergrund und am Rand des Arrays stärker als im Zentrum (Abbildung 24). So konnte

gezeigt werden, dass tatsächlich BSA in der typischen Verteilung, mit stärkerer Belegung der Randelektroden, immobilisiert wurde. Dasselbe Immobilisat zeigte zuvor keine messbare HRP-Aktivität. Somit wurde gezeigt, dass die gemessene Aktivität der aktiven, immobilisierten HRP nicht durch Adsorption von Farbstoffen an inaktives Protein oder eine katalytische Aktivität der kürzlich benutzten Elektroden hervorgerufen werden konnte.

3.3.6. Diskussion

Für die Messung der Aktivität immobilisierter HRP auf TiN-Ringelektroden konnte ein geeigneter Assay mit dem Substrat Amplex Red entwickelt werden. Dadurch war es zum ersten Mal möglich, die Aktivität eines durch DEP immobilisierten Enzyms quantitativ zu bestimmen. Zuvor wurde die Aktivität durch DEP immobilisierter HRP oder Antikörper zwar prinzipiell gezeigt, aber nicht quantifiziert [5, 42].

Auf den TiN-Ringelektrodenchips wurden, unter Berücksichtigung der möglichen Überbestimmung im Assay, eine HRP-Aktivität entsprechend 0,60 – 0,92 pg gelöster HRP nachgewiesen. Dies entspricht etwa 30 – 47 % der maximalen Aktivität der HRP, die als Monolage auf den Elektroden erwartet wird. Auf den Elektroden könnten zwar mehrere Schichten des Enzyms immobilisiert worden sein [6], es wird aber angenommen, dass aufgrund der räumlichen Abschirmung und der Konkurrenz um Substrate durch die darüberliegenden Moleküle die unteren Lagen nur wenig zur Aktivität des gesamten Immobilisats beitragen.

Die Färbung der immobilisierten HRP durch das Reaktionsprodukt Resorufin ermöglichte die orts aufgelöste Detektion der HRP nach den Aktivitätsmessungen und zeigt, dass diese überwiegend auf den Elektroden immobilisiert wurde. Unspezifische Adsorption der HRP auf dem Chip unabhängig vom elektrischen Feld oder Effekte inaktiver Proteine konnten durch entsprechende Kontrollexperimente als Ursache für die gemessene Aktivität ausgeschlossen werden.

Unter der Annahme, dass die Aktivität im Wesentlichen durch die oberste Monolage der immobilisierten HRP bedingt ist, war die immobilisierte HRP somit zu ca. 30 – 47 % aktiv. Eine scheinbare Reduzierung der Enzymaktivität durch Immobilisierung im Vergleich zu frei diffundierenden Enzymen tritt sehr häufig auf und ist ein Nachteil vieler Immobilisierungstechniken [111]. Intrinsische Effekte der Oberfläche, z.B. organisierte Wasserschichten oder Gradienten des pH-Werts und der Substratkonzentration können Einfluss auf die Struktur, die Stabilität, die Aktivität und auf die scheinbare Wechselzahl des Enzyms haben [112].

Sehr wichtig für die Aktivität des Enzyms ist auch dessen Orientierung gegenüber der Oberfläche. Für β -Galactosidase wurde gezeigt, dass die Aktivität des kovalent immobilisierten Enzyms identisch ist mit der des freien Enzyms in Lösung, wenn das katalytische Zentrum zum Volumen hin orientiert ist. Bei zufälliger Orientierung ist die Aktivität dagegen auf ein Drittel der Aktivität freien Enzyms reduziert [10]. Ist das aktive Zentrum kovalent immobilisierter β -Galactosidase in einem Winkel von 90° zur Oberflächennormalen ausgerichtet, wird eine Aktivität von 53 % der Aktivität des Enzyms in Lösung erreicht [11]. Mit ca. $38 \pm 6\%$ erhaltener Aktivität liegt die Aktivität der immobilisierten HRP eher im Bereich zufälliger Orientierung oder etwas darüber. Dies erlaubt die Interpretation, dass das Enzym ohne eine Inaktivierung durch das elektrische Feld oder Effekte der Oberfläche mindestens als eine Monolage auf den Elektroden immobilisiert wurde, die Moleküle aber in zufälliger Orientierung relativ zur Oberfläche immobilisiert wurden.

Zwar kann durch dielektrophoretische Immobilisierung auch eine orientierte Immobilisierung von Proteinen erreicht werden. Das fassförmige, eher längliche Protein eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) wird durch DEP vorzugsweise mit der geometrischen Längsachse parallel zum elektrischen Feld ausgerichtet [9]. Der permanente Dipol des Moleküls spielt dabei eine untergeordnete Rolle, da der induzierte Dipol stärker zu den anziehenden Kräften im stark inhomogenen elektrischen Feld beiträgt [9, 113]. Für die HRP ist allerdings nicht mit einer einheitlichen Richtung des Dipols und somit Orientierung im elektrischen Feld zu rechnen, da es sich nicht um identische Moleküle derselben Aminosäuresequenz, sondern um eine komplexe Mischung verschiedener Peroxidasen handelt. Die verwendete HRP wurde aus Meerrettich gewonnen und besteht laut dem Hersteller zu etwa 75 % aus dem Isoenzym C, enthält aber auch weitere Isoenzyme (persönliche Kommunikation mit Dr. Benjamin Herquel, 29.11.2018). In kommerziellen HRP-Präparaten können bis zu 40 verschiedene, durch isoelektrische Fokussierung trennbare Peroxidasen enthalten sein [114]. Allein das Isoenzym C wird zudem durch mindestens zwei verschiedenen Gene kodiert [115]. Hinzu kommt die inhomogene Glykosylierung, die nicht identisch für alle Moleküle ist, und bei einem Kohlenhydratanteil von 18 – 22 % im gesamten Molekül ebenfalls einen Einfluss auf die Ausbildung der Dipole haben könnte [46, 48]. Auch wenn für reine, rekombinante Proteine die Ausbildung einer Vorzugsrichtung aufgrund eines identischen Dipols möglich ist, scheint für diese komplexe Mischung eine unregelmäßige Orientierung des aktiven Zentrums relativ zur Oberfläche plausibler.

Für die Anwendbarkeit einer Immobilisierungstechnik ist nicht nur die Aktivität, sondern auch die Stabilität des immobilisierten Enzyms von Bedeutung. Während der DEP-Immobilisierung bleibt zwar zunächst ein hoher Anteil der Aktivität der HRP erhalten, aber in jedem Messzyklus

gehen 6 – 12 % der Aktivität des permanent immobilisierten Enzyms verloren (Abbildung 21). Dies könnte durch Inaktivierung oder Abspülen des Enzyms hervorgerufen werden, wahrscheinlich verursacht durch das kurze Spülen des Chips mit dH₂O oder die Trocknung im N₂-Strom zwischen den Messungen. Eine Verbesserung der Stabilität könnte durch eine Optimierung des Handlings erreicht werden, z.B. durch die Vermeidung der intensiven Trocknungs- und Spülschritte mit Hilfe einer geeigneten Mikrofluidik. Auch die Substratlösung könnte in Hinblick auf die Stabilität des Immobilisats optimiert werden, z.B. durch Vermeidung eines Überschusses an H₂O₂, der bei vollständigem Verbrauch des reduzierenden Substrats Amplex Red zur Suizidaktivierung der HRP führen kann [116].

3.4. DEP mit ChOx

3.4.1. Detektion anhand der intrinsischen Fluoreszenz

Aktivitätsmessungen an immobilisierter HRP haben ergeben, dass dieses Enzym zu einem hohen Anteil nach der Immobilisierung durch DEP aktiv ist. Nun sollte untersucht werden, ob dieses Ergebnis auf weitere, für die Biosensorik oder Grundlagenforschung interessante Enzyme übertragbar ist. Durch die Verfolgung der intrinsischen Fluoreszenz von Flavoproteinen ist deren Aktivität ortsaufgelöst detektierbar und kann sogar an Einzelmolekülen gemessen werden [69]. Als vielversprechender Kandidat für die Immobilisierung und ortsaufgelöste Aktivitätsmessung auf den Elektroden wurde deswegen ChOx ausgewählt. Es handelt sich um ein Flavoprotein mit starker intrinsischer Fluoreszenz, die zudem stark vom pH-Wert und der Substratkonzentration abhängt [76]. Das Optimum für die Fluoreszenzmessungen bei pH 9 wurde durch eigene, fluoreszenzspektroskopische Messungen an gelöster ChOx bestätigt, ebenso wie die reversible Änderung der Fluoreszenzintensität bei Cholinzugabe um mehr als 50 % [76] (Abbildung 25).

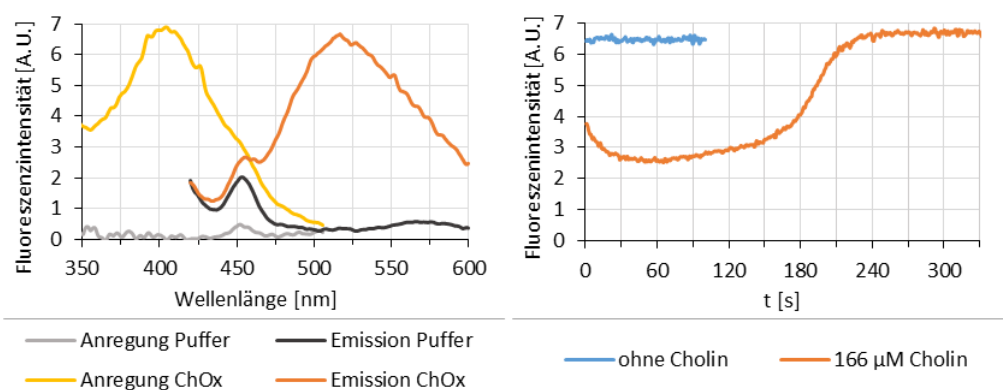


Abbildung 25: Fluoreszenz der ChOx bei pH 9. Links: Anregungs- und Emissionsspektrum von 0,1 g/L ChOx im Vergleich zu Spektren des Puffers ohne ChOx. rechts: Zeitlicher Verlauf der ChOx-Fluoreszenz vor und nach Cholin-Zugabe. Cholin-Zugabe erfolgte einige Sekunden vor Beginn der Messung. Anregung: 405 nm, Emission: 520 nm.

Anhand der gemessenen Fluoreszenzspektren (Abbildung 25) wurde ein geeigneter Filtersatz für die Detektion des Enzyms am Fluoreszenzmikroskop zusammengestellt (siehe Tabelle 4). An der durch DEP immobilisierten ChOx wurde getestet, ob ein ähnlicher zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität wie mit ChOx in Lösung (Abbildung 25) beobachtet werden kann. Dafür wurde unmodifizierte ChOx (ca. 0,5 g/L) über 10 min bei 7 V_{RMS} und 10 kHz auf für die Mikrofluidik durchbohrten W-Zylinderelektroden-Chips immobilisiert. Nach kurzem Spülen

wurden Spacer und Deckglas für die Fluidik aufgesetzt, ein konstanter Fluss über dem Chip eingestellt und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops die Intensität der intrinsischen Fluoreszenz des Immobilisats verfolgt (Abbildung 26A). Die Fluoreszenzintensität auf den Elektroden wurde dabei als korrigierte mittlere Intensität $I_{av.,\text{kor.}}$ dargestellt, die sich wie folgt aus der mittleren Intensität ausgewählter Elektroden und von nahegelegenen Positionen zwischen den Elektroden errechnet:

$$I_{av.,\text{kor.}} = \frac{\bar{I}_{\text{Elektrode}} - \bar{I}_{\text{Hintergrund}}}{\bar{I}_{\text{Hintergrund}} - I_0} \quad (9)$$

Mit $\bar{I}_{\text{Elektrode}}$ = mittlere Intensität der ausgewerteten Elektroden;

$\bar{I}_{\text{Hintergrund}}$ = mittlere Intensität im Zwischenraum und

I_0 = digitaler Offset der verwendeten Kamera.

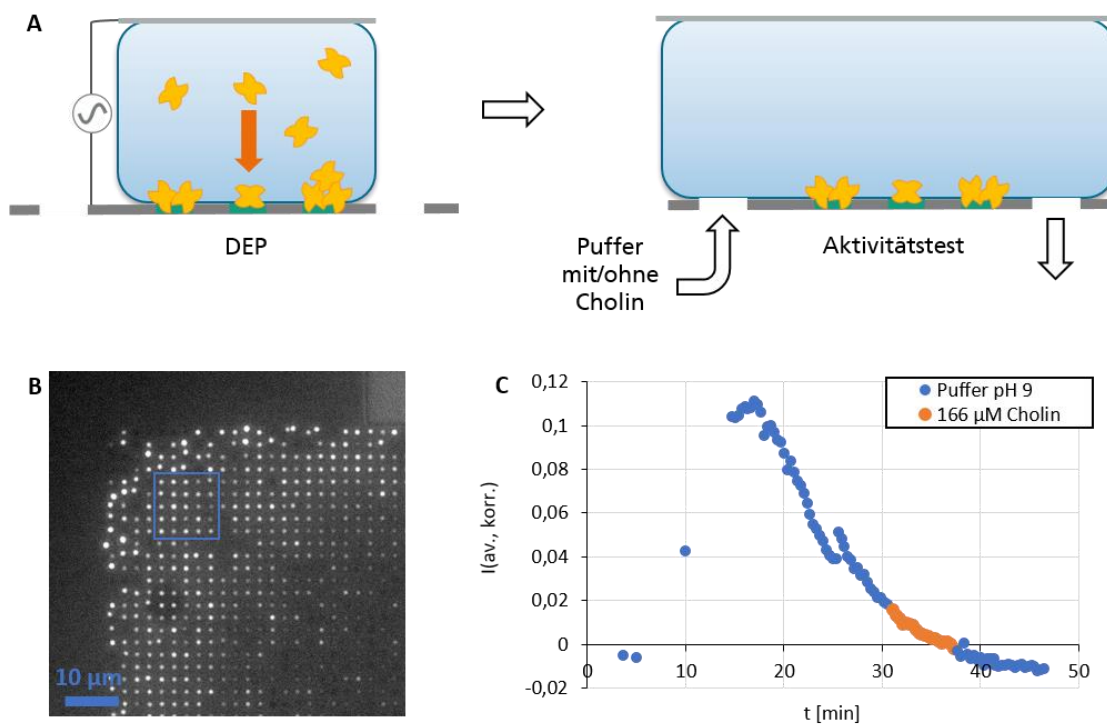


Abbildung 26: Beobachtung der intrinsischen Fluoreszenz von immobilisierter ChOx auf W-Zylinderelektroden. **A:** Schema des experimentellen Ablaufs. **B:** Einzelbild der immobilisierten ChOx mit Markierung (blaues Quadrat) für den Bereich, der für die quantitative Auswertung der Zeitserie ausgewählt wurde, zum Zeitpunkt der maximalen Fluoreszenzintensität ($t = 17$ min). **C:** Hintergrundkorrigierter Intensitätsverlauf auf den ausgewählten Elektroden in Abhängigkeit vom Substratangebot. Abbildungseinstellungen: Olympus BY 53, Filter ChOx, LED 405 nm (100%), Objektiv 40 x NA 0,95, Belichtungszeit 1 s.

Zu Beginn der Inkubation mit Puffer stieg die Fluoreszenzintensität auf den Elektroden an. Die Fluoreszenz auf den Elektroden erreichte ein Maximum, hier nach ca. 17 min Spülen mit Puffer, und nahm von da an stetig ab (Abbildung 26B und C). Einzig durch Nachfokussieren, im gezeigten Beispiel nach 25 min, kam es zu einer scheinbaren Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Weder entstand ein stärkerer Abfall der Fluoreszenzintensität, wenn das Enzym mit 166 μM Cholin-Lösung statt mit Puffer inkubiert wurde, noch stieg die Intensität wieder an, wenn die Fluidik wieder mit Puffer ohne Substrat gespült wurde.

Der Anstieg der Intensität zu Beginn des Spülens mit Puffer kann durch die pH-Abhängigkeit der ChOx-Fluoreszenz hervorgerufen worden sein. Für die Immobilisierung durch DEP wurden gegen dH_2O umgepufferte Enzymlösungen verwendet, die nur noch wenige Puffersalze enthalten. An der Umgebungsluft stellt sich ein Kohlensäuregleichgewicht und somit ein leicht saurer pH-Wert ein. Erst nach einiger Zeit scheint sich die Struktur des immobilisierten Enzyms an den durch den Puffer vorgegebenen pH-Wert von 9 anzupassen, bei dem die Fluoreszenz des Enzyms am höchsten ist [76]. Nach Erreichen des Intensitäts-Maximums fällt die Fluoreszenzintensität wieder, möglicherweise durch Bleichen des FADs oder Ablösen der ChOx-Moleküle. Für aktive ChOx wurde erwartet, dass die Intensität der intrinsischen Fluoreszenz bei Cholin-Zugabe sinkt und aufgrund des ständigen Substratnachschiebs durch die Fluidik niedrig bleibt, bis der Chip wieder mit Puffer ohne Cholin überströmt wird. Dies war weder bei dem hier gezeigten Versuch der Fall noch bei den Wiederholungen, für die einige Parameter wie die Spannung (3,5 - 5 V_{RMS} statt 7 V_{RMS}) und die Frequenz (15 kHz statt 10 kHz) während der Immobilisierung, die Cholin-Konzentration (1,6 mM statt 166 μM) oder die Belichtungszeit (200 ms statt 1 s) während der Beobachtung variiert wurden.

3.4.2. Rasterelektronenmikroskopie an immobilisierter ChOx

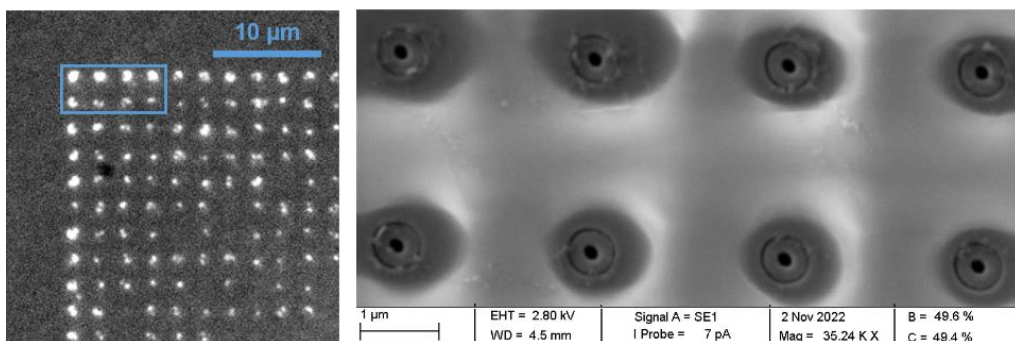


Abbildung 27: Fluoreszenzmikroskopisches Bild (links) und REM-Bild (rechts) DEP-immobilisierter ChOx auf TiN-Ringelektroden. Der im REM-Bild gezeigte Ausschnitt ist im Fluoreszenzbild durch einen blauen Rahmen markiert.

ChOx wurde außerdem auf TiN-Ringelektroden immobilisiert. Nach DEP bei 7 V_{RMS} und 10 kHz über 10 min und Spülen mit Puffer pH 9 wurde die immobilisierte ChOx am Fluoreszenzmikroskop anhand ihrer intrinsischen Fluoreszenz abgebildet. Das Immobilisat wurde anschließend ohne weitere Modifikation der Probe mit Hilfe des REM untersucht. Das auf den Elektroden immobilisierte Material war mit beiden Mikroskopie-Methoden detektierbar (Abbildung 27). Auf den im Fluoreszenzbild hell erscheinenden Elektroden sind auch im REM-Bild Partikel zu erkennen. Hellere Elektroden tragen dabei mehr Partikel als dunklere. Die Ablagerungen sind allerdings unregelmäßig auf den Ringelektroden und auf dem SiO₂-Hintergrund um die Ringe herum verteilt und auch breiter als die Ringe selbst. Es scheint sich um unregelmäßig geformte Partikel mit über 20 nm Durchmesser zu handeln. An einigen Elektroden bildeten sich dendritenförmige Strukturen, wie z.B. an der zweiten Elektrode von links in der oberen Reihe.

Dass überhaupt Ablagerungen auf den Elektroden im REM sichtbar sind, zeigt, dass es sich nicht um eine oder wenige gleichmäßige Monolagen von ChOx auf den Elektroden handeln kann. Die Auflösungsgrenze des REM für unbehandelte biologische Proben liegt bei ≥ 20 nm [27]. Da einzelne Proteine nur wenige nm groß wären, muss es sich um Aggregate aus vielen Proteinmolekülen handeln.

3.4.3. Diskussion

ChOx wurde durch DEP immobilisiert und die intrinsische Fluoreszenz des Enzyms wurde beobachtet, während die Mikrofluidik auf dem Chip mit Puffer oder einer Substratlösung durchströmt wurde. Dieses Messprinzip erlaubt die orts- und zeitaufgelöste Beobachtung der Aktivitätszyklen immobilisierter Flavoenzyme unabhängig von einem fluoreszierenden Reaktionsprodukt. Die intrinsische Fluoreszenz wurde auf den Elektroden nachgewiesen. Somit wurde gezeigt, dass auch ChOx durch DEP immobilisiert werden kann.

Die Aktivität der immobilisierten ChOx konnte durch diesen Versuch allerdings nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache ist die Inaktivierung des Enzyms durch die Immobilisierung. ChOx könnte durch im elektrischen Wechselfeld entwickelte, kapazitive Erwärmung denaturiert worden sein [34]. Die Lösung auf dem Chip erwärmt sich bei den gewählten Bedingungen jedoch um weniger als 10°C [5], sodass eine vollständige Inaktivierung des Enzyms innerhalb von 10 min aufgrund der Wärme allein ausgeschlossen ist. Doch auch Effekte des elektrischen Feldes selbst oder daraus resultierende Scherkräfte könnten das Enzym beschädigt haben [36, 117].

Die REM-Bilder der ChOx nach DEP auf TiN-Ringelektroden zeigen über 20 nm große Partikel auf den Elektroden. Dies unterstützt die Vermutung, dass die ChOx-Moleküle als Aggregate immobilisiert wurden. Die Immobilisierung der Proteine könnte an Rauheiten auf der Elektrodenoberfläche, die im REM nicht aufgelöst werden können, aufgrund des dadurch erhöhten Gradienten des elektrischen Feldes begünstigt worden sein. An solchen Stellen könnten sich die Partikel direkt auf der Elektrode durch die DEP-Immobilisierung gebildet haben. Auf so einen Mechanismus deuten auch dendritische Strukturen hin, die durch Kettenbildung während der Dielektrophorese entstanden sein könnten [118]. Eine weitere mögliche Erklärung für das Auftreten der Partikel wäre die Immobilisierung von Aggregaten, die sich bereits vor DEP in der Enzymlösung gebildet hatten. Solche Aggregate waren im DLS nachweisbar, machten aber weniger als 1 % des Volumens des untersuchten Enzymmaterials aus (vgl. Kapitel 3.1.2). Es könnte sich also auch um Partikel handeln, die durch Aggregation der Proteine im Volumen während des Immobilisierungsversuchs entstanden sind und anschließend durch DEP immobilisiert wurden. Möglicherweise wurde das Enzym also durch Scherkräfte, die durch die Bewegung der Moleküle im elektrischen Feld verursacht werden, denaturiert und in der Folge aggregiert [36].

Auch hydrophobe Wechselwirkungen mit der Oberfläche, eine ungünstige Orientierung des Enzyms oder eine zu enge, für die Aktivität hinderliche Packung der Enzyme könnte die Aktivität vermindert haben [112].

Das fluoreszierende FAD ist kovalent an das Enzym gebunden, ginge also bei einer Inaktivierung oder Denaturierung nicht verloren und würde trotzdem zur Fluoreszenz, aber nicht mehr zur Aktivität beitragen [119]. Eine teilweise Inaktivierung oder inaktive Schichten unter einer teilweise aktiven ChOx-Monolage könnten deswegen einen fluoreszierenden Hintergrund erzeugen, über dem der Effekt einer geringen Menge aktiver ChOx nicht detektierbar ist. Die Reaktion könnte zudem durch die Immobilisierung verlangsamt worden sein, sodass ein flacherer und somit vor diesem Hintergrund schwerer detektierbarer Abfall der Fluoreszenz stattfand als aufgrund der Vorversuche in Lösung (Abbildung 25) erwartet wurde. Auch photochemische und photophysikalische Effekte, wie Photooxidation, Photoreduktion oder ein *Inner Filter Effect*, können Experimente mit Flavinen beeinträchtigen und könnten auch in diesem Versuch die Reduktion durch das Substrat überlagert haben [71, 74]. Zur Inaktivierung der ChOx könnte insbesondere die Bildung des photoinduzierten Protein-FAD-Addukts beigetragen haben [73]. Dass keine Aktivität anhand der intrinsischen Fluoreszenz gezeigt werden kann, bedeutet also nicht zwangsläufig, dass ChOx nach der Immobilisierung durch DEP vollständig inaktiv ist. Theoretisch könnte durch den Nachweis des Produktes H_2O_2 in einem gekoppelten Assay mit HRP und Amplex Red auch eine Restaktivität der ChOx gezeigt werden.

Der Assay zeigte aber hohe Blindwerte auf dem Chip, die vermutlich durch eine H_2O_2 -Produktion durch Kontaktelektifizierung an der SiO_2 -Wasser-Grenzfläche erzeugt wurden [120]. Die katalytische Aktivität der ChOx ist außerdem vergleichsweise gering. Die Versuche, trotz der Hintergrundaktivität des Chips einen Assay für ChOx mit einer für diese Fragestellung sinnvollen Bestimmungsgrenze und Messdauer zu etablieren, blieben deswegen ohne Erfolg (vgl. Kapitel 3.5.2).

3.5.DEP mit GOx

Teile dieser Arbeit wurden unter dem Titel „M. Prüfer, S. Stanke, F.F. Bier und R. Hölzel: „Catalytic activity of glucose oxidase after dielectrophoretic immobilization on nanoelectrodes.“ in *Electrophoresis* (2023) veröffentlicht (online verfügbar ab 09.03.2023) [96].

3.5.1. Fluoreszenzmikroskopie an immobilisierter GOx

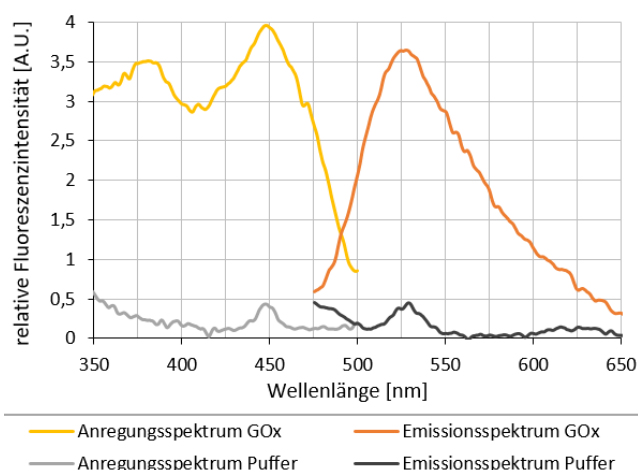


Abbildung 28: Anregungs- und Emissionsspektren von 0,3 g/L GOx bei pH 6 im Vergleich zu Spektren des Puffers ohne GOx. Anregungsspektren bei $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$; Emissionsspektren bei $\lambda_{ex} = 450 \text{ nm}$ [96].

Wie ChOx ist auch GOx ein Flavoenzym. Aufgrund der unterschiedlichen Bindung und chemischen Umgebung im Inneren der Proteine unterscheiden sich die Fluoreszenzspektren und auch die Fluoreszenzintensität des in den Enzymen gebundenen FAD [74]. Das Maximum der Fluoreszenzanregung für GOx in Puffer mit pH 6 beträgt wie für freies FAD 450 nm, die Emission ist bei 525 nm am höchsten (Abbildung 28). Damit fallen die Maxima der Fluoreszenzspektren der GOx mit der anscheinenden Fluoreszenz des Puffers überein. Die Maxima im Spektrum des Puffers sind durch Ramanstreuung des Wassers zu erklären. Das Maximum der Raman-Emission von Wasser liegt im Bereich $3400 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ [121]. Bei einer Anregungswellenlänge von 450 nm ist demnach ein Raman-Peak bei ca. 533 nm zu erwarten, was gut mit dem beobachteten Spektrum des Puffers übereinstimmt. Derselbe Peak tritt in dH_2O in einer Einweg-Küvette auf. Wie für Raman-Streuung zu erwarten, verschiebt sich der Peak zudem bei Anregung mit anderen Wellenlängen. Bei der scheinbaren Fluoreszenzemission des Puffers handelt es sich also tatsächlich um Ramanstreuung des Wassers.

Die Fluoreszenzintensität der oxidierten Form der GOx soll laut der Literatur 50 mal geringer sein als die der oxidierten ChOx [74, 76]. Bezogen auf die Proteinkonzentration war die

gemessene Fluoreszenz der GOx hier nur etwa sechs Mal niedriger als die von ChOx. Der Literaturwert bezieht sich möglicherweise auf die Fluoreszenz pro Enzym-Unit, die aufgrund der 20-mal geringeren Aktivität der ChOx hier sogar ca. 124-mal höher ist als die der GOx. Der Unterschied zum Literaturwert um den Faktor 2,5 kann durch eine unterschiedliche Reinheit der verwendeten Enzympräparate begründet sein oder in unterschiedlichen Herangehensweisen bei der Bestimmung der Enzymkonzentration.

Dass das Fluoreszenzspektrum der GOx der Ramanstreuung in Wasser so ähnlich ist, ist ein Nachteil für die Nutzung der intrinsischen Fluoreszenz für die Mikroskopie. Eine Verfolgung der Enzymaktivität anhand der intrinsischen Fluoreszenz ist so nicht möglich, weil die notwendigen wässrigen Puffer- bzw. Substratlösungen aufgrund der Streuung eine zu starke Hintergrundintensität erzeugen. Fluoreszenzaufnahmen immobilisierter GOx wurden stattdessen im Trockenen angefertigt. Nach DEP mit GOx auf TiN-Ringelektroden bei $7 V_{RMS}$ ist dabei eine Steigerung der Fluoreszenz auf dem Chip am Ort der Elektroden erkennbar, nicht jedoch nach DEP bei nur $3,5 V_{RMS}$ (Abbildung 29). Wie zuvor für HRP und ChOx beobachtet, tritt auch für die durch DEP immobilisierte GOx die typische Verteilung der immobilisierten Proteine auf dem Elektrodenarray auf, bei der die Belegung der Rand- und Eckelektroden stärker ist als die im Zentrum des Arrays (Abbildung 29D). Somit kann auch GOx durch DEP immobilisiert und anhand ihrer intrinsischen Fluoreszenz nachgewiesen werden, allerdings erst bei Spannungen über $3,5 V_{RMS}$.

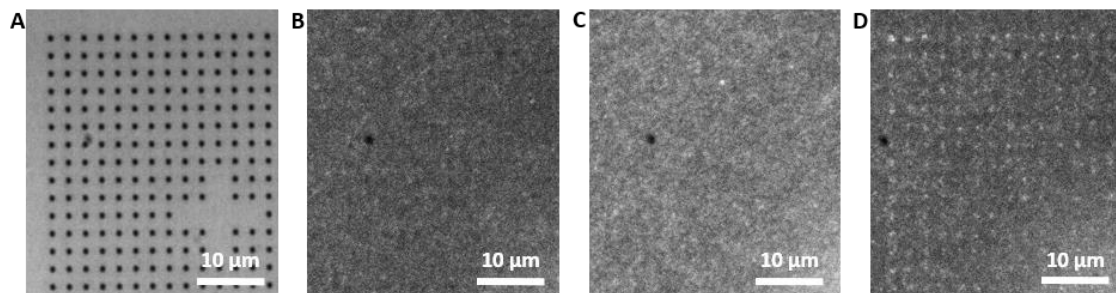
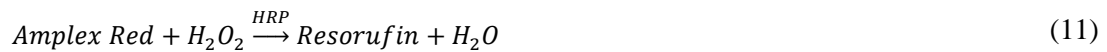
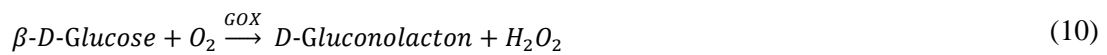


Abbildung 29: Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie von TiN-Ringelektroden an Luft vor und nach Immobilisierung von GOx durch DEP (10 kHz, 10 min). **A:** Hellfeld-Bild des gezeigten Ausschnitts. **B:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Chips nach Inkubation von GOx ohne Feld. **C:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach DEP bei $3,5 V_{RMS}$. **D:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach DEP bei $7 V_{RMS}$. Aufnahmeeinstellungen (B bis D): Filter GOX, Belichtungszeit 1 s, LED 435 nm und 460 nm (100%), Objektiv 100x NA 0,9; gleiche Ausschnitte sowie Helligkeits- und Kontrasteinstellungen für alle Bilder [96].

3.5.2. Entwicklung eines gekoppelten On-Chip Enzymassays

Sowohl GOx als auch ChOx erzeugen bei der Oxidation ihres Substrates auch H₂O₂. Dieses kann in einem gekoppelten Enzymtest mit Hilfe der HRP nachgewiesen werden. Dafür wird das Substrat Amplex Red verwendet, das bereits für die Detektion der HRP-Aktivität auf dem Chip mittels Fluoreszenzmikroskopie bewährt ist und sich auch für die sensitive Detektion von enzymatisch gebildetem H₂O₂ eignet [94]. Wie beim Nachweis der HRP entsteht das fluoreszierende Produkt Resorufin, das mittels Fluoreszenzspektroskopie oder –Mikroskopie quantifiziert werden kann. Der gekoppelte Enzymtest kann vereinfacht durch folgende Reaktionsgleichungen beschrieben werden:



Die Optimierung der Amplex Red- und HRP-Konzentration dieses Assays erfolgte mit sieben verschiedenen Ansätzen. Glucose wurde im Überschuss eingesetzt. Die Amplex-Red- und HRP-Konzentrationen wurden so gewählt, dass der Umsatz des H₂O₂ durch die HRP schneller abläuft als dessen Bildung durch GOx, sodass letztere Reaktion geschwindigkeitsbestimmend ist. Für die parallele Messung in verschiedenen Reaktionsansätzen wurden 96-Well-Platten und ein Plattenreader verwendet. Insbesondere für die Bestimmung niedriger GOx-Konzentrationen ergab der Ansatz mit 25 µM Amplex Red, 1,5 · 10⁻⁵ g/L HRP und 50 mM Glucose bei pH 7,5 die besten Ergebnisse. Die Aktivität der in dH₂O gelagerten GOx beträgt in diesem Assay 106 ± 2 U/mg in den ersten 5 – 15 min der Reaktion. Ein sehr ähnlicher Assay mit 5 mM Cholinchlorid als Substrat und einem Puffer mit pH 8 eignet sich auch für die Bestimmung der ChOx-Konzentration am Plattenreader. Wegen der geringen Aktivität dieses Enzyms von nur 5 U/mg sind dafür allerdings längere Messzeiten nötig.

Diese Assays sollten analog zum Assay für die HRP-Aktivität auf den Chip übertragen werden. Dafür wurden wie zuvor Messungen am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Es wurden je 1,5 µL der Reaktionslösung mit oder ohne gelöster GOx bzw. ChOx auf Elektrodenchips oder Objektträger aufgetragen, mit einem Deckglas mit Silikonspacer abgedeckt und die Anstiege der Resorufin-Konzentration am Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Dabei traten Probleme auf: Die Anstiege der Resorufin-Konzentration für Blindwerte ohne zugegebenes Flavoenzym waren gegenüber den Messungen am Plattenreader erhöht, nicht linear und variierten stark zwischen Wiederholungsmessungen. Wurde die Messung nicht zwischen einer SiO₂- bzw. Glasoberfläche

und einem regulären Deckglas, sondern zwischen zwei Deckgläsern aus einem PVC-Acetat-Copolymer durchgeführt, war der Anstieg der Fluoreszenz in den Blindwert-Messungen deutlich geringer und nahezu linear (Abbildung 30).

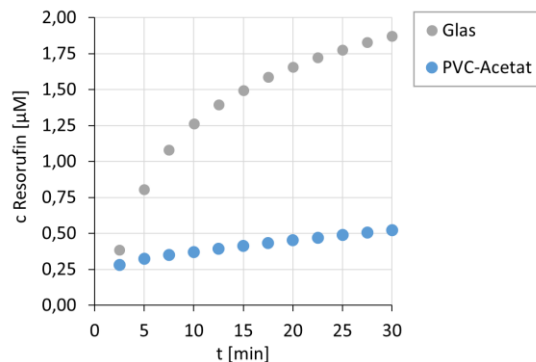


Abbildung 30: Blindwertmessungen des ChOx-Assays am Fluoreszenzmikroskop (mit Amplex Red, HRP und Cholin, aber ohne ChOx) zwischen Glas- bzw. PVC-Acetat-Oberflächen. Probenvolumen: 1,5 µL; Höhe der Messkammer: 100 µm.

Die verringerten Blindwerte beim Wechsel der verwendeten Trägeroberfläche legen nahe, dass die unerwünschten Anstiege der Resorufin-Konzentration zu einem großen Anteil durch eine Reaktion der SiO₂-Oberflächen ausgelöst werden. Glasoberflächen können als Katalysatoren wirken und abhängig vom Oberflächen-Volumen-Verhältnis Reaktionsgeschwindigkeiten um Größenordnungen erhöhen [122]. Das hier beobachteten Phänomen könnte durch die spontane Generierung von H₂O₂ an der Glas-Wasser-Grenzfläche ausgelöst worden sein. Durch die Reaktion der Hydroxylgruppen mit Wasser können in einen 20 µm hohen Kanal innerhalb von 10 s 56 µM H₂O₂ entstehen [120]. Da die in dieser Arbeit verwendeten Elektroden in SiO₂ eingebettet sind, kann der Effekt auf den Chips nicht vollständig vermieden werden. Die SiO₂-Wasser-Grenzfläche wurde aber um den Faktor 8 verkleinert, indem die Reaktionslösung statt mit einem Deckglas mit dem PVC-Acetat-Copolymer abgedeckt wurde, das Volumen der Reaktionslösung halbiert und die Höhe des verwendeten Spacers verdoppelt wurde. Da die verwendeten Pipetten für Volumina < 1 µL große Fehler aufweisen, wurde das genaue Volumen der Reaktionslösung aus der Fläche der Tropfen errechnet, welche mikroskopisch bestimmt werden konnte. Die Anstiege im Assay ohne GOx auf dem Chip konnten durch die verkleinerten SiO₂-Wasser-Grenzflächen verringert werden. Die Blindwert-Anstiege waren dennoch gegenüber der Messung im größeren Volumen im Plattenreader erhöht und zu Beginn der Inkubation nicht linear (Abbildung 31). Nach einigen Minuten Inkubationszeit unterschieden sich die Aktivitäten in Ansätzen mit niedrigen GOx-Konzentrationen trotzdem signifikant von den Blindwerten. Für die GOx-Bestimmung wurde deshalb der Anstieg der Resorufin-Konzentration zwischen 20 min und 30 min nach Beginn der Reaktion herangezogen. Die

dazugehörige Kalibrierfunktion (12) für Messungen auf dem Chip wies ein R^2 von 0,9958 auf. Das LOQ entsprach laut Gleichung (5) (Seite 49) 70 fg gelöster GOx auf dem Chip. Das Detektionslimit (LOD) entspricht der Summe aus dem Mittelwert der Blindwerte und der dreifachen Standardabweichung der Blindwerte und wurde für jeden einzelnen Chip tagesaktuell aus drei Blindwertmessungen bestimmt [123]. Wegen der im Verhältnis zu den Blindwert-Anstiegen geringeren Aktivität des Enzyms war für ChOx keine Kalibrierung auf dem Chip im benötigten Konzentrationsbereich möglich.

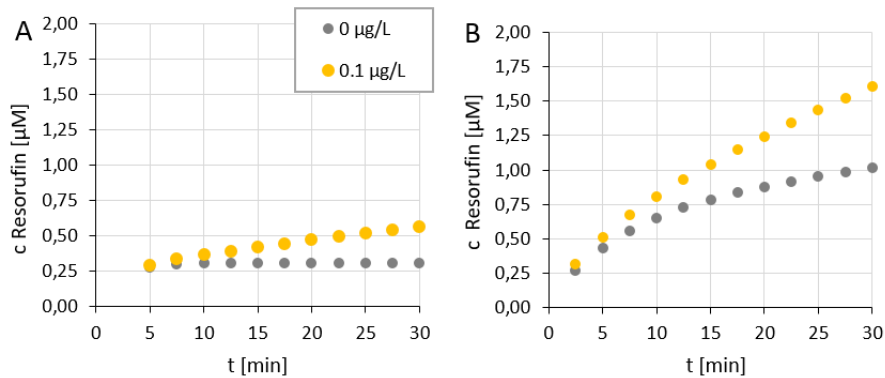


Abbildung 31: Verlauf der Resorufin-Fluoreszenz im Aktivitätstest für GOx in Abhängigkeit der eingesetzten GOx-Konzentration. A: Messung in 160 µL Reaktionslösung in 96-Well-Platte am Plattenreader. B: Messung in 0,75 µL Reaktionslösung auf einem Chip mit PVC-Acetat-Deckglas und 200 µm starkem Silikonspacer am Fluoreszenzmikroskop.

$$c(GOx) [nM] = \left(\frac{\frac{dc}{dt} - \overline{\frac{dc}{dt}}(BW) \left[\frac{\mu M}{min} \right]}{0,1345} \right)^{0,9153} \quad (12)$$

Mit $\frac{dc}{dt}$ = Anstieg der Resorufin-Konzentration (t = 20 – 30 min)

und $\overline{\frac{dc}{dt}}(BW)$ = mittlerer Anstieg der Resorufin-Konzentration in Blindwertmessungen auf demselben Chip (t = 20 – 30 min)

3.5.3. Aktivitätsmessungen an immobilisierter GOx

Der entwickelte Enzymtest wurde nun für durch DEP immobilisierte GOx angewendet (Abbildung 32). Dafür wurde die GOx-Aktivität auf dem Chip sowohl nach unspezifischer Adsorption ohne Feld als auch nach Immobilisierung der GOx durch DEP bei 7 V_{RMS} und 10 kHz über 10 min gemessen. Die Enzymkonzentration und Inkubationszeit war für die Inkubation ohne Feld und DEP gleich. Vor jeder Messung wurde der Chip kurz gespült und im

N_2 -Strom getrocknet, um eine Kontamination des frischen Reaktionsansatzes mit gelösten Enzymen oder Reaktionsprodukten zu vermeiden. Wie für immobilisierte HRP erfolgten mehrere Aktivitätsmessungen auf demselben funktionalisierten Chip. Wegen der nötigen längeren Messzeit für die Bestimmung der GOx-Aktivität auf dem Chip dauerte jeder Messzyklus etwa 30 min.

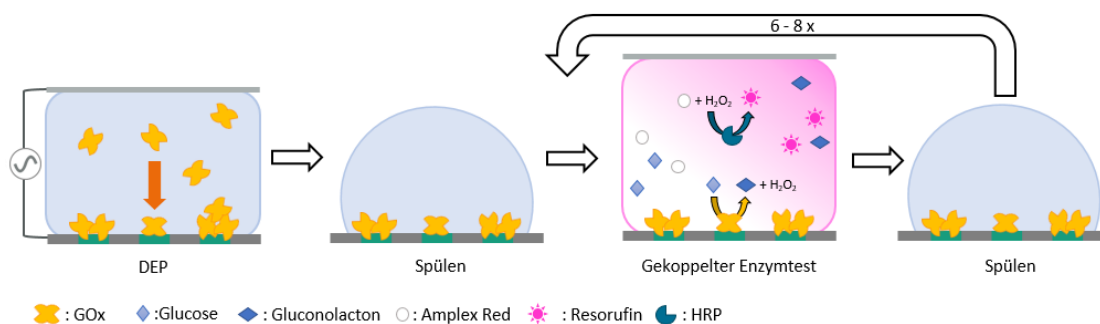


Abbildung 32: Ablauf der Aktivitätsbestimmung für immobilisierte GOx auf TiN-Ringelektroden [96].

Auch die Aktivität der immobilisierten GOx wurde der Anschaulichkeit halber in Äquivalenten des gelösten Enzyms angegeben (Abbildung 33 und Tabelle 8). Nach Inkubation des Chips unter der GOx-Lösung ohne Feld wurde keine oder nur eine sehr geringe GOx-Aktivität gemessen, die weniger als 0,1 pg GOx entsprach und innerhalb von drei Mess- und Waschzyklen unter die Detektionsgrenze fiel. Die Aktivität auf dem Chip nach Immobilisierung der GOx durch DEP war in allen Fällen größer als nach der unspezifischen Adsorption und entsprach 0,1 – 0,7 pg gelöster GOx. Die Aktivität sank nach jeder Messung, lag aber auch nach sechs bis acht Messzyklen signifikant über den Blindwerten auf dem Chip bzw. dem Detektionslimit LOD. Da nur wenige der Messwerte für jeden Chip über der Bestimmungsgrenze LOQ lagen, war die Ermittlung einer permanenten Aktivität auf dem Chip durch exponentielle Fits, wie sie für immobilisierte HRP durchgeführt wurden, dennoch nicht sinnvoll. Die Aktivität der durch DEP permanent immobilisierten GOx liegt somit unter der Bestimmungsgrenze und entspricht weniger als 0,07 pg gelöster GOx.

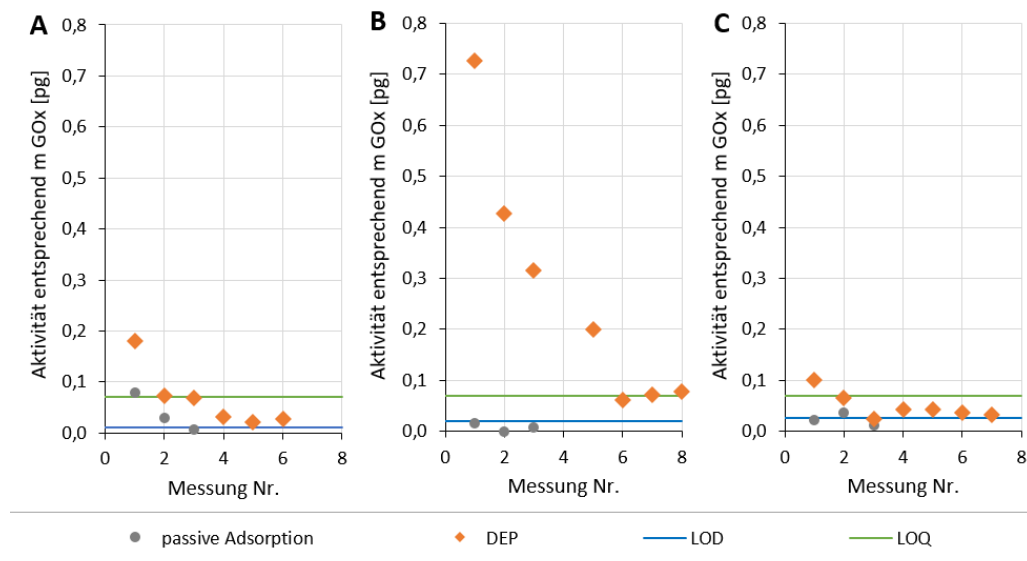


Abbildung 33: Verlauf der GOx-Aktivität auf Chips nach unspezifischer Adsorption bzw. DEP mit GOx in Äquivalenten gelöster GOx [96].

Tabelle 8: Anscheinende Aktivität der immobilisierten GOx in Äquivalenten gelöster GOx nach DEP bzw. unspezifischer Adsorption ohne Feld für ausgewählte Messzyklen [96].

Chip	LOD ^{a)} [pg]	m nach Adsorption 1. Messung [pg]	m nach Adsorption 3. Messung [pg]	m nach DEP 1. Messung [pg]	m nach DEP 6. Messung [pg]
A	0.01	0.08	< 0.01	0.18	0.01 < m < 0.07
B	0.02	0.02 < m < 0.07	< 0.02	0.73	0.02 < m < 0.07
C	0.03	0.03 < m < 0.07	< 0.03	0.10	0.03 < m < 0.07

^{a)} Das LOD wurde tagesaktuell auf dem betreffenden Chip durch drei Messungen ohne GOx bestimmt. LOQ bezieht sich auf die Kalibrierung und beträgt 0.07 pg.

Die erwartete Menge immobilisierter GOx kann aus der Fläche der Ringelektroden von $7,55 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2$ und dem Platzbedarf eines GOx-Moleküls abgeschätzt werden. Wie für die HRP wird angenommen, dass sich mindestens eine Monolage immobilisierten Enzyms bildet. Eine Monolage GOx besteht laut kristallografischen Daten und Messungen mit einer Quarz-Microwaage aus ca. $4,6 \cdot 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$ bzw. $4,6 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2}$ [124, 125]. Somit finden auf den Elektroden $3,5 \cdot 10^{-17} \text{ mol}$ GOx Platz. Bei einem Molekulargewicht von etwa 160 kDa entspricht dies einer Masse von 5,6 pg GOx. Es könnten sich zwar auch in diesem Fall mehrere Schichten immobilisierten Enzyms gebildet haben [6], an der gemessenen Aktivität wird aber die oberste Schicht mutmaßlich den größten Anteil haben. Die Aktivität der permanent immobilisierten GOx auf den Chips entspricht maximal 0,07 pg gelöster GOx und somit nicht mehr als 1,3 % der Aktivität, die maximal für eine Monolage aktiver GOx möglich wäre.

3.5.4. Diskussion

Wie in der Literatur beschrieben ist die Intensität der intrinsischen Fluoreszenz der GOx detektierbar, aber gering [126]. Die Fluoreszenz des FADs hat aufgrund eines internen Quenchens der Fluoreszenz des Isoalloxazins durch das Adenin eine geringe Quanteneffizienz von 0,023 [127, 128]. Zusätzlich wird sie durch benachbartes Tyrosin und Tryptophan innerhalb der GOx stark gequenchet [74, 129]. Ungünstig für die Nutzung der Fluoreszenz zur Detektion ist zudem die Ähnlichkeit mit dem Ramanspektrum des Wassers (Abbildung 28). Dennoch konnte die intrinsische Fluoreszenz des Enzyms genutzt werden, um durch DEP immobilisierte GOx nachzuweisen (Abbildung 29). Dies zeigt zum einen, dass tatsächlich GOx auf den Elektroden immobilisiert wurde. Zum anderen legt es nahe, dass zumindest ein Teil des immobilisierten Enzyms in seiner nativen Form vorliegt: FAD ist nicht kovalent an die Aminosäurekette der GOx gebunden und wird beim Denaturieren des Enzyms frei [84]. Interessanterweise wurde erst nach DEP bei 7 V_{RMS}, nicht jedoch bei 3,5 V_{RMS} eine Immobilisierung der GOx durch DEP beobachtet. In vorherigen Arbeiten wurde jedoch auch bei 3,5 V_{RMS} und 10 kHz eine Immobilisierung von HRP bzw. BSA gezeigt [6, 42]. Der Unterschied könnte auf einen niedrigeren Clausius-Mossotti-Faktor K_{micro} der GOx, aber auch auf ein höheres Detektionslimit aufgrund der schwachen Eigenfluoreszenz der immobilisierten GOx zurückzuführen sein.

Nach Immobilisierung durch DEP wurden dementsprechend auch GOx-Aktivitäten auf dem Chip detektiert, die höher waren als nach unspezifischer Adsorption ohne Feldeinwirkung. Diese nahm nach jedem Messzyklus ab und stagnierte zwischen dem LOD und dem LOQ, welches der Aktivität von 0,07 pg GOx in Lösung entspricht (Abbildung 33). Die Anfangsaktivität war dabei um eine Größenordnung niedriger als die der HRP nach DEP. Ein Vergleich der erhaltenen Enzymaktivitäten sollte allerdings die Unterschiede in den Messmethoden berücksichtigen. Wegen der höheren Wechselzahl der HRP und der niedrigeren Hintergrundaktivität der Chipoberfläche im Enzymassay konnte die HRP-Aktivität auf dem Chip innerhalb von 2 min gemessen werden, während für eine Aktivitätsmessung an immobilisierter GOx der Chip zunächst für 20 min unter der Reaktionslösung inkubiert werden musste, bevor die eigentliche, 10-minütige Messung beginnen konnte. Somit dauerte die Inkubation vor Beginn der ersten Messung an GOx länger als alle Messzyklen an der immobilisierten HRP zusammen. Da der Mechanismus des Aktivitätsverlusts der Immobilisate auf dem Chip unklar ist, sollte die Aktivität und Stabilität zunächst unter ähnlicheren Bedingungen gemessen werden, bevor ein direkter Vergleich der Aktivitäten angestrebt wird.

3.6. Vergleich der Enzymaktivitäten nach Immobilisierung durch

DEP

Teile dieses Kapitels wurden unter dem Titel „M. Prüfer, S. Stanke, F.F. Bier und R. Hölzel: „Catalytic activity of glucose oxidase after dielectrophoretic immobilization on nanoelectrodes.“ in *Electrophoresis* (2023) veröffentlicht (online verfügbar ab 09.03.2023) [96].

3.6.1. Aktivitätsmessung an immobilisierter HRP mit verlängerten Messzyklen

Um die Aktivität und Stabilität der immobilisierten GOx und HRP besser vergleichen zu können, wurde die Dauer der Messzyklen für immobilisierte HRP an die GOx-Messungen angeglichen. Im Gegensatz zum GOx-Assay enthielt der HRP-Assay H_2O_2 , das bei einer längeren Inkubation im Überschuss zur Inaktivierung der HRP führen kann. H_2O_2 entsteht zwar auch im GOx-Assay, wird allerdings umgehend von der im Überschuss vorliegenden HRP verbraucht (siehe Gleichung (10) und (11) auf S. 69). Im HRP-Assay mit einer verlängerten Inkubationszeit fiel zudem viel mehr Resorufin an, welches durch Adsorption an die Oberflächen und eine mögliche Desorption sowie beschleunigte Photooxidation im nächsten Messzyklus das Ergebnis verfälschen könnte. Deswegen wurde für die Aktivitätsmessungen an HRP nicht die Inkubation in der Reaktionslösung verlängert. Diese wurde wie zuvor nach 2 min abgespült, woraufhin der Chip aber vor der nächsten Messung 27 min lang unter Puffer gelagert wurde. Der Puffer entsprach in seiner Zusammensetzung dem Puffer des gekoppelten Enzymassays für die GOx-Aktivität. So konnte auch die Wartezeit zwischen zwei HRP-Aktivitätsmessungen auf insgesamt 30 min verlängert werden.

Auch die so untersuchte HRP war nach der Immobilisierung aktiver als die GOx. Die Anfangsaktivität des Immobilisats entsprach fast 19 pg gelöster HRP und sank exponentiell. Sie lag dabei aber über die Dauer von 8 Messzyklen bzw. 4 Stunden über dem LOQ von 0,06 pg gelöster HRP (Abbildung 34). Damit ist auch bei gleicher Messzeit die immobilisierte HRP aktiver als immobilisierte GOx. Wie für die HRP-Aktivität in kürzeren Messzyklen wurden exponentielle Fits entsprechend Gleichung (6) bis (8) (siehe S. 51) mit dem Datensatz durchgeführt. Das beste Fit-Ergebnis wurde auch für dieses Experiment mit Modell (8), also einem exponentiellem Abfall der Aktivität überlagert mit linearem Abfall, erzielt. Sowohl der Parameter m_1 , der als lose adsorbierte und exponentiell abgewaschene HRP interpretiert werden kann, als auch der als permanent immobilisierte HRP interpretierte Parameter m_2 waren mit einer Aktivität entsprechend 94 pg bzw. 1,9 pg gelöster HRP sogar noch höher als in den

vorherigen Versuchen mit kürzerer Inkubationszeit. Die Rate der Inaktivierung der permanent immobilisierten HRP war mit 13,5 % pro Messzyklus zwar ebenfalls etwas höher als in den vorhergehenden Versuchen (vgl. Abbildung 21), aber nicht um die Größenordnung, um die die Inkubationszeit verlängert wurde.

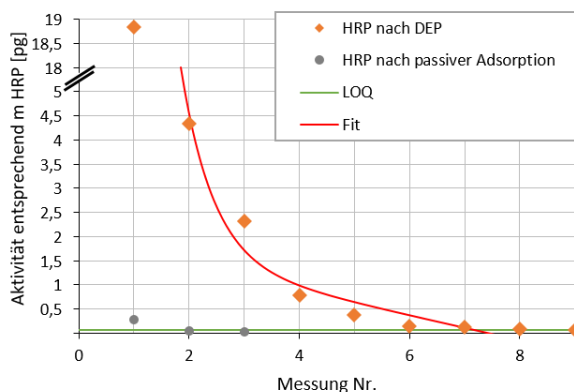


Abbildung 34: Verlauf der HRP-Aktivität auf dem Chip nach unspezifischer Adsorption bzw. DEP mit HRP in Äquivalenten gelöster HRP mit Ergebnis des exponentiellen Fits entsprechend Gleichung (8). Der zeitliche Abstand der Mess-Schritte wurde durch 27-minütige Inkubation unter Puffer nach jeder Messung auf 30 min verlängert [96].

Die Inkubationszeit allein scheint also nicht die Geschwindigkeit des Aktivitätsverlusts zu bestimmen. Allerdings bildet die Fitfunktion die Daten schlechter ab als nach den Versuchen mit kürzeren Messzyklen und fällt nach sieben Zyklen sogar unter null, obwohl zu diesem Zeitpunkt noch aktive HRP detektiert wird (vgl. Abbildung 20, Abbildung 34). Dies weist darauf hin, dass der Mechanismus, insbesondere bei verlängerter Inkubationszeit, durch das gewählte Modell noch nicht korrekt abgebildet wird und möglicherweise komplizierter ist. Außer der Dauer der Inkubation kann auch die in diesem Versuch erhöhte Anzahl von Spülschritten und Trocknungsvorgängen zwischen den Messungen eine Rolle gespielt haben.

3.6.2. Diskussion der erzielten Enzymaktivitäten für drei verschiedene Enzyme nach Immobilisierung durch DEP

GOx und HRP wurden durch DEP auf TiN-Ringelektroden immobilisiert und ihre Aktivität im Vergleich zur maximal möglichen Aktivität einer unbeschädigten, optimal orientierten Monolage der Enzyme auf den Elektroden gemessen. Die Aktivität beider Enzyme nahm dabei exponentiell ab, tendierte aber nicht gegen null. Für immobilisierte HRP konnten zwei Fraktionen immobilisierten Enzyms ermittelt werden, von der eine als permanent immobilisierte, nur linear mit jedem Messzyklus inaktivierte HRP betrachtet wird. Die Aktivität dieser Fraktion entspricht direkt nach der Immobilisierung $38 \pm 6\%$ der maximalen Aktivität

einer vollständig aktiven HRP-Monolage auf allen Elektroden. Dieser Wert stimmt in etwa mit der Aktivität einer Monolage eines kovalent an eine Oberfläche gebundenen Enzyms überein, dessen Ausrichtung relativ zur Oberfläche zufällig verteilt ist [10]. Die Aktivität der immobilisierten GOx war zwar auch nach sechs bis acht Messzyklen noch detektierbar, fiel aber unter das LOQ entsprechend 0,07 pg gelöster GOx und somit unter 1,3 % der Aktivität der GOx-Moleküle, die auf den Elektroden als Monolage Platz hätten. Die durch DEP permanent immobilisierte GOx scheint somit überwiegend inaktiv zu sein. Die Messzyklen für die Bestimmung der GOx-Aktivität waren dabei länger als die für die HRP-Aktivität. Wie eine Wiederholungsmessung mit immobilisierter HRP mit längeren Messzyklen zeigte, scheint die Dauer der Inkubation zwischen den Messungen die Stabilität der HRP zwar zu beeinflussen, erklärt aber nicht die um mindestens eine Größenordnung niedrigere Aktivität der GOx.

ChOx wurde auf W-Zylinderelektroden immobilisiert. Der zeitliche Verlauf der intrinsischen Fluoreszenz des Enzyms wurde während der Inkubation mit und ohne Cholin beobachtet (Abbildung 26). Die intrinsische Fluoreszenz dieses Enzyms hängt stark vom Oxidationszustand des gebundenen FADs ab und kann somit das Vorhandensein des Substrates Cholin bzw. die Aktivität des Enzyms anzeigen (Abbildung 25) [76]. Die Immobilisierung der ChOx auf den Elektroden konnte auf diese Weise nachgewiesen werden, nicht aber die Aktivität des Enzyms. Nach der Immobilisierung der ChOx auf TiN-Ringelektroden waren im REM-Bild zudem Aggregate erkennbar, die während der Dielektrophorese entstanden sein könnten.

Eine mögliche Ursache für die sehr unterschiedliche Wirkung der DEP-Immobilisierung auf die Aktivität ist die unterschiedliche Stabilität der Enzyme gegenüber Effekten im elektrischen Feld. Ein gut vergleichbares Maß für die Beständigkeit einer Proteinstruktur gegenüber äußeren Einflüssen ist die Temperaturstabilität. HRP ist außergewöhnlich thermostabil mit einer aktiven Halbwertszeit von 117 min bei 60°C und 13 – 35 min bei 80°C [130, 131]. Ohne stabilisierende Zusätze ist die GOx wesentlich thermolabiler mit einer aktiven Halbwertszeit von 13 min bei 60°C [84]. Durch das angelegte elektrische Wechselfeld erwärmt sich die Lösung, was prinzipiell zur Inaktivierung der gelösten Enzyme führen kann [34]. Die kapazitive Erwärmung der Lösung über den verwendeten Elektroden ist unter den gewählten Bedingungen mit unter 10°C aber zu gering, um für die Inaktivierung von GOx und ChOx allein verantwortlich zu sein [5].

Bei der Immobilisierung wirken jedoch weitere Kräfte auf die Enzyme, die die Proteinstruktur verändern könnten. In einem oszillierenden elektrischen Feld beobachteten Bekard et. al. bereits ab einer Feldstärke von nur $78 \text{ V} \cdot \text{m}^{-1}$ eine Destabilisierung der Struktur von BSA und Lysozym, die nicht durch Erwärmung erklärbar ist [36]. Die elektrische Kraft, die auf die

Proteine wirkt, ist dabei um fünf Größenordnungen zu gering, um sie zu entfalten. Stattdessen wird angenommen, dass hydrodynamische Kräfte bzw. die erzeugten Scherkräfte bei der Bewegung der Proteine im elektrischen Feld die Proteinstruktur destabilisieren [36]. Auch während der Dielektrophorese werden die Moleküle im elektrischen Feld bewegt und es entstehen zudem Strömungen, durch die Scherkräfte auf die Enzyme wirken können.

Außerdem ist das elektrische Feld, das auf die Proteine wirkt, auf den hier verwendeten Elektroden um Größenordnungen stärker als in den von Bekard et. al. beschriebenen Experimenten. Molekulardynamik-Simulationen und einfachere Berechnungen anhand der Enthalpie der Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb eines Proteins stimmen darin überein, dass Feldstärken in der Größenordnung von $\geq 10^8 \text{ V} \cdot \text{m}^{-1}$ benötigt werden, um die Proteinfaltung zu beeinflussen [36, 132]. Ab $7 \cdot 10^8 \text{ V} \cdot \text{m}^{-1}$ ist die Entfaltung der Proteinstruktur dimerer Superoxid-Dismutase laut der Simulationen innerhalb von $< 100 \text{ ns}$ irreversibel. Alternierende Felder interferieren dabei stärker mit dem Enzym als ein monopolarer Puls [132]. An den Kanten der hier verwendeten Elektroden können Feldstärken in der Größenordnung von $10^7 \text{ V} \cdot \text{m}^{-1}$ erreicht werden [31]. Diese Feldstärken sind theoretisch zu gering, um die Struktur der Enzyme innerhalb von Nanosekunden nachhaltig zu beeinflussen. Durch eine längere Exposition können allerdings auch bei niedrigeren Feldstärken Proteinstrukturen verändert werden [117]. Der Verzicht auf einen Puffer während der Dielektrophorese geht außerdem mit Abweichungen von den Optima des pH-Wertes und der Ionenkonzentration der Enzyme einher. Dadurch könnten die Proteinstrukturen destabilisiert und somit für die Kräfte des elektrischen Feldes anfälliger geworden sein. Zudem treten an den Elektroden starke Gradienten des elektrischen Feldes auf, deren Einfluss auf die Proteinstruktur unbekannt ist. Die hohe Aktivität der HRP nach DEP legt dennoch nahe, dass dieses Enzym trotz dieser möglichen Effekte zu einem großen Anteil in seiner nativen, aktiven Form immobilisiert wurde. Gleichzeitig wurde GOx wahrscheinlich überwiegend inaktiviert und ChOx möglicherweise auch aggregiert. Mit ihrer geringeren Größe und der kompakteren, stabileren und monomeren Struktur könnte die HRP nicht nur gegenüber Wärme, sondern auch gegenüber Reibung und elektrischen Feldern stabiler sein als z.B. die größeren, flexibleren Flavoenzyme, die zudem als Dimere aktiv sind.

Außer durch die Kraftwirkung des Feldes oder der Strömungen könnten die Enzyme auch elektrochemisch verändert worden sein. GOx kann durch ein Potential von $\geq +850 \text{ mV}$, das an einer Elektrode mit adsorbierter GOx angelegt wird, oxidiert und so zum Teil inaktiviert werden [133]. Dennoch konnte auch für bei 160 V (*peak to peak*) direkt auf einem Platindraht durch AC-Elektrophorese immobilisierte GOx ihre biologische Aktivität nachgewiesen werden. Dabei wurden aber keine monomolekulare Belegung, sondern eine mehrere Mikrometer dicke Schicht erzeugt [134].

Nicht nur die Exposition im elektrischen Feld, sondern auch die Immobilisierung an sich bzw. die unmittelbare Nähe zur Festkörperoberfläche kann sich unterschiedlich auf die Aktivität der Enzyme auswirken. Oberflächen erzeugen unvermeidbare, intrinsische Effekte, wie Gradienten in der Ionenkonzentration, des pH-Wertes und ggf. der Substrat- bzw. Produktkonzentration [112], die sich auf die HRP mit ihrem sehr breiten pH-Optimum ebenfalls weniger stark auswirken als auf andere Enzyme. Durch Wechselwirkungen mit der Oberfläche kann es zu Konformationsänderungen der Enzyme kommen, insbesondere für „weiche“ Proteine mit einer flexiblen Struktur, zu denen auch die GOx zählt [37].

Außerdem ist die Orientierung des aktiven Zentrums gegenüber der Oberfläche entscheidend für die Aktivität immobilisierter Enzyme [10, 11]. Bei der Immobilisierung von Proteinen durch DEP kann sich eine Vorzugsrichtung der Orientierung einstellen [9]. Die verwendete HRP ist allerdings eine Mischung verschiedener Peroxidasen mit unterschiedlichen Aminosäure-Sequenzen, pI-Werten und Glykosylierungszuständen [46, 48, 114, 115]. Diese Enzyme werden vermutlich nicht einheitlich gegenüber der Oberfläche orientiert sein, sodass zumindest ein Teil der immobilisierten Peroxidasen eine günstige Orientierung mit zur Lösung ausgerichtetem, aktiven Zentrum annimmt. Die Präparate der ChOx und GOx sind homogener, sodass sich theoretisch auch eine für die Aktivität dieser Enzyme ungünstige Orientierung ergeben könnte.

Neben der Aktivität der einzelnen Enzymmoleküle entscheidet auch die Anzahl der immobilisierten Moleküle über die Aktivität des Ensembles. Für alle verwendeten Proteine konnte die Immobilisierung fluoreszenzmikroskopisch anhand der intrinsischen Fluoreszenz (ChOx: Abbildung 26 und Abbildung 27; GOx: Abbildung 29) bzw. im Falle der HRP mit Hilfe einer Fluoreszenzmarkierung vor der Immobilisierung (Abbildung 16 und Abbildung 17) oder nach der Immobilisierung (Abbildung 22) nachgewiesen werden. Für die Quantifizierung der Enzyme anhand dieser fehlt allerdings ein Standard, gegen den die Fluoreszenzintensität der Aufnahmen kalibriert werden kann. Bei der Quantifizierung müsste zudem ein mögliches Quenchen der Fluoreszenz durch die Oberfläche und benachbarte Moleküle berücksichtigt werden. Wegen dieser Schwierigkeiten kann die absolute Proteinmenge für die jeweiligen Immobilisate derzeit nicht bestimmt und verglichen werden. Höchst wahrscheinlich erfahren alle getesteten Moleküle unter der eingestellten Frequenz von 10 kHz positive Dielektrophorese an den Nanoelektroden [29]. Wie es zur permanenten Immobilisierung über die Feldeinwirkung hinaus kommt, ist jedoch unklar. Als Arbeitshypothese wird angenommen, dass sich durch die Verdrängung der Wassermoleküle zwischen den Proteinen und der Oberfläche starke Van-der-Waals-Wechselwirkungen bilden [31]. Die Adsorption von Proteinen an Oberflächen, an denen ein elektrisches Potential anliegt, kann aber auch durch rein elektrostatische Anziehung erklärt werden. Diese hängt von der Ladung der Oberfläche und der des Proteins bzw. seinem pI und

dem vorliegenden pH-Wert ab [51, 135]. Ein an die Oberfläche angelegtes Potential kann somit auch zur Abstoßung oder teilweisen Desorption von Proteinen führen [136, 137]. Sollten für die Immobilisierung selbst elektrostatische Kräfte entscheidend sein, könnten die Effekte für die HRP mit einem pI von überwiegend 8,8 und die GOx mit einem pI von 4,2 sogar entgegengesetzt sein, wobei durch das alternierende elektrische Feld sowohl anziehende als auch abstoßende Phasen für beide Enzyme möglich sind. Außer der Ladung ist auch für die Adsorption die Flexibilität der Proteinstruktur bedeutend. Flexiblere Proteine wie die GOx adsorbieren dabei langsamer [138]. Für immobilisierte Enzyme ist eine größere Menge aber nicht unbedingt optimal für die Aktivität, da auch eine zu dichte Belegung der Oberfläche zu sterischer Hinderung oder einer Konkurrenz um Substrate führen kann.

4. Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit wurden die Enzyme HRP, GOx und ChOx durch DEP auf verschiedenen Nanoelektroden-Arrays immobilisiert und hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivität untersucht. Die Immobilisierung aller drei Enzyme auf den Nanoelektroden wurde anhand ihrer Fluoreszenz nachgewiesen. Dafür wurde die intrinsische FAD-Fluoreszenz der Flavoenzyme ChOx und GOx verwendet, während die HRP durch eine Fluoreszenzmarkierung vor oder nach der Immobilisierung nachgewiesen werden konnte. Außerdem wurde in dieser Arbeit erstmalig die Aktivität durch DEP immobilisierter Enzyme quantitativ bestimmt. Die quantitative Aktivitätsbestimmung immobilisierter HRP und GOx erfolgte durch die Messung der gebildeten Resorufin-Konzentration am Fluoreszenzmikroskop im direkten bzw. gekoppelten Assay mit Amplex Red. Die Bestimmungsgrenzen für diese Enzyme auf dem Chip betragen 60 fg für HRP bzw. 70 fg für GOx. Nach der Entwicklung einer geeigneten Mikrofluidik konnte außerdem die intrinsische Fluoreszenz der immobilisierten ChOx, die vom Oxidationszustand des Cofaktors abhängt und somit die Enzymaktivität anzeigen kann, unter verschiedenen Bedingungen im Durchfluss beobachtet werden.

Auch wenn die Stabilität des Immobilisats für eine Anwendung in der Biosensorik noch nicht optimal ist und es zusätzlich zur temporären Adsorption des Enzyms kam, konnte die permanente Immobilisierung aktiver HRP durch DEP gezeigt werden. Die Aktivität der permanent immobilisierten HRP nach erfolgreicher DEP entsprach dabei in etwa der Aktivität einer zufällig ausgerichteten Monolage aktiver HRP-Moleküle auf den Elektroden. Somit konnte die Eignung der Methode für die Immobilisierung aktiver Enzymmoleküle prinzipiell gezeigt werden.

Wegen der außerordentlich hohen Stabilität der HRP eignete sich dieses Enzym gut für die Erprobung der Immobilisierungs- und Messstrategie, erlaubt aber keine zweifelsfreien Schlüsse auf Enzyme im Allgemeinen. Deswegen wurden zwei weitere für die Biosensorik interessante Enzyme, die Flavoprotein-Oxidasen GOx und ChOx, untersucht. Die Aktivität der immobilisierten GOx war in einem ähnlichen Messverfahren für die Ensemble-Aktivität auf dem ganzen Chip nachweisbar. Die Aktivität des permanent immobilisierten Enzyms scheint aber gering zu sein und weniger als 1,3 % der Aktivität einer vollständig aktiven Monolage zu entsprechen. Durch eine orts aufgelöste Aktivitätsmessung konnte die Immobilisierung, nicht aber die Aktivität der immobilisierten ChOx nachgewiesen werden. REM-Messungen an immobilisierter ChOx lassen vermuten, dass das Enzym während der Immobilisierung aggregiert sein könnte.

Beide Flavoenzyme könnten aufgrund ihrer geringeren Stabilität durch Effekte des elektrischen Feldes oder der Elektrodenoberfläche denaturiert worden sein. Aber auch eine ungünstige Ausrichtung der Enzyme oder eine unvollständige Belegung der Elektroden sind mögliche Ursachen für den Aktivitätsunterschied zwischen immobilisierter GOx und HRP. Um dies zu untersuchen, müsste eine Methode entwickelt werden, mit der die Belegung der TiN-Elektroden mit Proteinen ermittelt werden kann. Dazu würde die Rasterkraftmikroskopie in Frage kommen [6]. Auch elektrische Detektionsmethoden, besonders kapazitive Messungen, könnten sich für eine Quantifizierung eignen [17, 139]. Neben der immobilisierten Menge wäre auch die Struktur der immobilisierten Moleküle wichtig. Fluoreszenzspektren der Immobilisate bei Anregung mit UV-Licht mit einer Wellenlänge von etwa <300 nm könnten spektrale Verschiebungen der Tryptophan-Fluoreszenz aufdecken und so anzeigen, zu welchem Anteil die Tertiärstruktur der Proteine intakt oder entfaltet ist [36]. Anhand von Spektren des Zirkulardichroismus im Wellenlängen-Bereich von 190 – 250 nm könnte außerdem der Erhalt der Sekundärstruktur der Enzyme überprüft werden [140, 141]. Dafür müssten diese spektroskopischen Methoden aber mit der Mikroskopie kombiniert werden. Zwar sind für beide spektroskopischen Verfahren Kopplungen mit der Fluoreszenzmikroskopie möglich [142, 143], diese wird bisher aber nicht mit dem für diese Fragestellungen benötigten, kurzwelligen UV-Licht betrieben.

Die Immobilisierung aktiver Proteine durch DEP erfordert also noch einige Optimierung sowie Methodenentwicklungen für die detailliertere Untersuchung der immobilisierten Enzyme, ist aber prinzipiell möglich. Die Aktivität und Stabilität der immobilisierten Enzyme könnte gesteigert werden, indem eine für die Proteinaktivität förderliche Beschichtung aufgebracht wird oder die Enzyme während der Immobilisierung durch Zusätze stabilisiert werden. Wegen der resultierenden Nebeneffekte wie Elektrolyse und Erwärmung kommen stabilisierende Puffer nicht oder nur in sehr geringer Konzentration in Frage. GOx kann aber auch durch einen Zusatz von Lysozym stabilisiert werden [84]. Dieses würde zwar ebenfalls durch DEP immobilisiert werden, das Co-Immobilisat könnte aber aktiver sein als die einzeln immobilisierte GOx. Auch BSA als Zusatz kommt zur Stabilisierung der Enzymlösungen und Immobilisate infrage. Für auf Nanopartikeln immobilisierte HRP wurde gezeigt, dass ein BSA-Zusatz während der Immobilisierung zu einer höheren Aktivität des Immobilisats führt, möglicherweise durch Co-Immobilisierung mit BSA [97]. Ein BSA-Zusatz könnte außerdem die Aggregatbildung von Proteinen verhindern [144]. Alternativ könnten langkettige, polare Moleküle, wie PEG oder Poly(Sorbitol-Methacrylat), als Co-Immobilisat eine hydrophile Umgebung für die immobilisierten Moleküle erzeugen. Diese Herangehensweise stabilisiert Enzyme selbst unter extremen Bedingungen, z.B. für die Katalyse in der Gasphase [112]. Eine Beschichtung der Elektroden mit einer geeigneten Kopplungschemikalie, z.B. mit Polydopamin, könnte die

Immobilisierung ebenfalls verbessern. Polydopamin bindet Enzyme kovalent, erzeugt gleichzeitig eine hydrophile Umgebung und ist mit elektrokinetischen Immobilisierungstechniken kompatibel [41, 145]. Es könnte durch Photolithografie oder elektrochemische Methoden entsprechend der Elektrodengeometrie aufgetragen werden [146, 147]. Eine alternative Strategie zur Stabilisierung der Enzyme wäre ihre Verkapselung vor der Immobilisierung. Die Enzymmoleküle können als Einzelne und ohne Aktivitätsverlust in ein Polyacrylamid-Nanogel eingeschlossen werden, was sowohl für GOx als auch für HRP bereits erprobt ist [148]. Auch eine Quervernetzung der Enzyme könnte die Stabilität der Proteinstruktur während der Immobilisierung verbessern und gleichzeitig die Wirkung elektrokinetischer Immobilierungsstrategien erhöhen [138]. Die überwiegend intramolekulare Quervernetzung mit Glutarialdehyd eignet sich beispielsweise gut für die Stabilisierung der GOx [149]. Alternativ könnte die Stabilität durch eine Modifizierung der Enzymoberflächen mit PEG verbessert werden, welches auch die Aggregation der Moleküle verhindert [150]. Ein neuer Ansatz für eine verbesserte Enzymaktivität des Immobilisats wäre die Nutzung der Ausrichtung der Enzyme durch DEP. Bei der Immobilisierung durch DEP werden Proteine entlang eines induzierten Dipols ausgerichtet, wie für eGFP gezeigt wurde [9]. Durch gezielte Kopplung mit einem weiteren Protein könnten die Geometrie und somit der induzierte Dipol des Konjugats so verändert werden, dass das aktive Enzym günstig gegenüber der Oberfläche ausgerichtet ist. Gleichzeitig könnte das gekoppelte Protein, wenn es zuunterst immobilisiert ist, das aktive Enzym vor negativen Effekten der Elektrodenoberfläche schützen.

Für eine Verwendung der mit Enzymen funktionalisierten Elektroden als Sensor sollte zudem das *Readout* überdacht werden. GOx und HRP können unter bestimmten Voraussetzungen Elektronen direkt, oder „quasi-direkt“ über einen an die GOx gekoppelten Redoxmediator, auf die Elektroden übertragen, auf denen sie immobilisiert sind [18, 19]. Die verwendete GOx weist eine Aktivität von mindesten 100 U/mg auf (vgl. 3.5.2). Eine vollständige Monolage auf den TiN-Ringelektroden eines Chips bestünde aus 5,6 pg GOx (vgl. 3.5.3). Pro Umsatzereignis werden zwei Elektronen übertragen. Geht man von einer Immobilisierung einer Monolage vollständig aktiver GOx sowie einem vollständigen Elektronenübergang aus, könnten etwa $1,2 \cdot 10^{10}$ Elektronen pro Sekunde auf den Chip übertragen werden. Dies entspricht einer Stromstärke von 2 nA, die Größenordnungen über dem erreichbaren LOQ elektrochemischer Analytik liegt [151]. Die weitere Optimierung der Immobilisierung könnte also zur Entwicklung neuer Typen von Biosensoren im nano-Maßstab führen.

Wegen der schnellen Immobilisierung, die theoretisch keine Modifikation von Enzym oder Elektrode erfordert, sowie der Nanostruktur der Elektroden ist die Protein-DEP also nach wie vor interessant für neue Konzepte von Biosensoren. Diese könnten idealerweise aus gleichartig

ausgerichteten Einzelmolekülen bestehen und als solche nicht nur für die Sensorik, sondern auch für die Grundlagenforschung, z.B. für Einzelenzymmolekül-Experimente, von Interesse sein [27]. Ideal für die Beobachtung der katalytischen Aktivität, unabhängig von diffundierenden Produktmolekülen, wäre ein Enzym mit starker intrinsischer Fluoreszenz, wie die ChOx. Auch die selektive Immobilisierung auf den Elektroden, die gleichzeitig als Transducer dienen könnten, ist von Vorteil zum Erreichen niedriger LOD. DEP könnte dabei nicht nur zur Immobilisierung der Enzyme als Rezeptor eine Rolle spielen, sondern auch durch den Transport der Analyten zu an Elektroden immobilisierten Fängermolekülen das LOD verschiedenster Analyten senken [13]. Wie diese Arbeit gezeigt hat, können ausgewählte Enzyme durch DEP in ihrer aktiven Form immobilisiert werden. Die tatsächliche Anwendung der durch DEP immobilisierten Enzym-Nanoarrays erfordert aber noch eine umfangreiche Optimierung bezüglich der Stabilität und Aktivität der Enzyme.

5. Literatur

- 1 Perumal, V. and Hashim, U. (2014) Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *J Appl Biomed*, **12** (1), 1–15.
- 2 Rodrigues, D., Barbosa, A.I., Rebelo, R., Kwon, I.K., Reis, R.L., Correlo, V.M. (2020) Skin-integrated wearable systems and implantable biosensors: A comprehensive review. *Biosensors*, **10** (7), 79.
- 3 Birkholz, M., Gloegener, P., Basmer, T., Glös, F., Genschow, D., Welsch, C., Ruff, R., Hoffmann, K.P. (2014) System integration of a silicone-encapsulated glucose monitor Implant. *Biomedical Technology*, **59** (s1), 1089-1092.
- 4 Hölzel, R., Gajovic-Eichelmann, N., Bier, F.F. (2003) Oriented and vectorial immobilization of linear M13 dsDNA between interdigitated electrodes—towards single molecule DNA nanostructures. *Biosens Bioelectron*, **18** (5-6), 555–564.
- 5 Otto, S., Kaletta, U., Bier, F.F., Wenger, C., Hölzel, R. (2014) Dielectrophoretic immobilisation of antibodies on microelectrode arrays. *Lab Chip*, **14** (5), 998–1004.
- 6 Laux, E.-M., Knigge, X., Bier, F.F., Wenger, C., Hölzel, R. (2015) Dielectrophoretic immobilization of proteins: Quantification by atomic force microscopy. *Electrophoresis*, **36** (17), 2094–2101.
- 7 Yamamoto, T. and Fujii, T. (2007) Active immobilization of biomolecules on a hybrid three-dimensional nanoelectrode by dielectrophoresis for single-biomolecule study. *Nanotechnology*, **18** (49), 495503.
- 8 Hölzel, R., Calander, N., Chiragwandi, Z., Willander, M., Bier, F.F. (2005) Trapping single molecules by dielectrophoresis. *Phys Rev Lett*, **95** (12), 128102.
- 9 Laux, E.-M., Knigge, X., Bier, F.F., Wenger, C., Hölzel, R. (2016) Aligned immobilization of proteins using AC electric fields. *Small*, **12** (11), 1514–1520.
- 10 Liu, Y., Ogorzalek, T.L., Yang, P., Schroeder, M.M., Marsh, E.N.G., Chen, Z. (2013) Molecular orientation of enzymes attached to surfaces through defined chemical linkages at the solid-liquid interface. *J Am Chem Soc*, **135** (34), 12660–12669.
- 11 Jasensky, J., Ferguson, K., Baria, M., Zou, X., McGinnis, R., Kaneshiro, A., Badiyan, S., Wei, S., Marsh, E.N.G., Chen, Z. (2018) Simultaneous observation of the orientation and activity of surface-immobilized enzymes. *Langmuir*, **34** (31), 9133–9140.

- 12 Henriksson, A., Kasper, L., Jäger, M., Neubauer, P., Birkholz, M. (2020) An approach to ring resonator biosensing assisted by dielectrophoresis: Design, simulation and fabrication. *Micromachines*, **11** (11), 954.
- 13 Henriksson, A., Neubauer, P., Birkholz, M. (2022) Dielectrophoresis: An Approach to Increase sensitivity, reduce response time and to suppress nonspecific binding in biosensors? *Biosensors*, **12** (10), 784.
- 14 Li, S., Cui, H., Yuan, Q., Wu, J., Wadhwa, A., Eda, S., Jiang, H. (2014) AC electrokinetics-enhanced capacitive immunosensor for point-of-care serodiagnosis of infectious diseases. *Biosens Bioelectron*, **51**, 437–443.
- 15 Salari, A. and Thompson, M. (2018) Recent advances in AC electrokinetic sample enrichment techniques for biosensor development. *Sens Actuators B Chem*, **255**, 3601–3615.
- 16 Laux, E.-M., Wenger, C., Bier, F.F., Hölzel, R. (2020) AC electrokinetic immobilization of organic dye molecules. *Anal Bioanal Chem* (412), 3859–3870.
- 17 Bergveld, P. (1991) A critical evaluation of direct electrical protein detection methods. *Biosens Bioelectron*, **6** (1), 55–72.
- 18 Suzuki, N., Lee, J., Loew, N., Takahashi-Inose, Y., Okuda-Shimazaki, J., Kojima, K., Mori, K., Tsugawa, W., Sode, K. (2020) Engineered glucose oxidase capable of quasi-direct electron transfer after a quick-and-easy modification with a mediator. *Int J Mol Sci*, **21** (3), 1137.
- 19 Li, M., Xu, S., Tang, M., Liu, L., Gao, F., Wang, Y. (2011) Direct electrochemistry of horseradish peroxidase on graphene-modified electrode for electrocatalytic reduction towards H₂O₂. *Electrochim Acta*, **56** (3), 1144–1149.
- 20 Pethig, R. (2017) *Dielectrophoresis*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- 21 Castellanos, A., Ramos, A., González, A., Green, N.G., Morgan, H. (2003) Electrohydrodynamics and dielectrophoresis in microsystems: Scaling laws. *J Phys D Appl Phys*, **36** (20), 2584–2597.
- 22 Washizu, M., Suzuki, S., Kurosawa, O., Nishizaka, T., Shinohara, T. (1994) Molecular dielectrophoresis of biopolymers. *IEEE Trans Ind Appl*, **30** (4), 835–843.
- 23 Pohl, H.A. and Hawk, I. (1966) Separation of living and dead cells by dielectrophoresis. *Science*, **152** (3722), 647–649.

-
- 24 Abd Rahman, N., Ibrahim, F., Yafouz, B. (2017) Dielectrophoresis for biomedical sciences applications: A review. *Sensors (Basel)*, **17** (3), 449.
 - 25 Ortiz, R., Koh, D., Kim, D.H., Rabbani, M.T., Anguaya Velasquez, C., Sonker, M., Arriaga, E.A., Ros, A. (2022) Continuous organelle separation in an insulator-based dielectrophoretic device. *Electrophoresis*, **43** (12), 1283–1296.
 - 26 Stanke, S., Wenger, C., Bier, F.F., Hölzel, R. (2022) AC electrokinetic immobilization of influenza virus. *Electrophoresis*, **43** (12), 1309–1321.
 - 27 Knigge, X., Wenger, C., Bier, F.F., Hölzel, R. (2018) Dielectrophoretic immobilisation of nanoparticles as isolated singles in regular arrays. *J Phys D Appl Phys*, **51** (6), 65308.
 - 28 Hayes, M.A. (2020) Dielectrophoresis of proteins: experimental data and evolving theory. *Anal Bioanal Chem*, **412** (16), 3801–3811.
 - 29 Pethig, R. (2022) Protein dielectrophoresis: A tale of two Clausius-Mossottis-Or something else? *Micromachines*, **13** (2), 261.
 - 30 Nakano, A. and Ros, A. (2013) Protein dielectrophoresis: Advances, challenges, and applications. *Electrophoresis*, **34** (7), 1085–1096.
 - 31 Knigge, X. (2019) Einzelmolekül-Manipulation mittels Nano-Elektroden und Dielektrophorese. Universität Potsdam. Dissertation.
 - 32 Guido, I., Jaeger, M.S., Duschl, C. (2011) Dielectrophoretic stretching of cells allows for characterization of their mechanical properties. *Eur Biophys J*, **40** (3), 281–288.
 - 33 Laux, E.-M., Bier, F.F., Hölzel, R. (2018) Dielectrophoretic stretching of DNA. *Methods Mol Biol*, **1811**, 199–208.
 - 34 Brochier, B., Mercali, G.D., Marczak, L.D.F. (2019) Effect of moderate electric field on peroxidase activity, phenolic compounds and color during ohmic heating of sugarcane juice. *J Food Process Preserv*, **43** (12), 321.
 - 35 Tian, M.-l., Fang, T., Du, M.-y., Zhang, F.-s. (2016) Effects of pulsed electric field (PEF) treatment on enhancing activity and conformation of α -amylase. *Protein J*, **35** (2), 154–162.
 - 36 Bekard, I. and Dunstan, D.E. (2014) Electric field induced changes in protein conformation. *Soft Matter*, **10** (3), 431–437.

-
- 37 Benavidez, T.E., Torrente, D., Marucho, M., Garcia, C.D. (2015) Adsorption of soft and hard proteins onto OTCEs under the influence of an external electric field. *Langmuir*, **31** (8), 2455–2462.
- 38 Chi, E.Y., Krishnan, S., Randolph, T.W., Carpenter, J.F. (2003) Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharm Res*, **20** (9), 1325–1336.
- 39 Ammam, M. and Fransaer, J. (2010) Two-enzyme lactose biosensor based on β -galactosidase and glucose oxidase deposited by AC-electrophoresis: Characteristics and performance for lactose determination in milk. *Sens Actuators B Chem*, **148** (2), 583–589.
- 40 Ammam, M. and Fransaer, J. (2011) AC-electrophoretic deposition of metalloenzymes: Catalase as a case study for the sensitive and selective detection of H₂O₂. *Sens Actuators B Chem*, **160** (1), 1063–1069.
- 41 Aktan, M.K., van der Gucht, M., Hendrix, H., Vande Velde, G., Baert, K., Hauffman, T., Killian, M.S., Lavigne, R., Braem, A. (2022) Anti-infective DNase I coatings on polydopamine functionalized titanium surfaces by alternating current electrophoretic deposition. *Anal Chim Acta*, **1218**, 340022.
- 42 Laux, E.-M., Kaletta, U.C., Bier, F.F., Wenger, C., Hölzel, R. (2014) Functionality of dielectrophoretically immobilized enzyme molecules. *Electrophoresis*, **35** (4), 459–466.
- 43 Hölzel, R. and Pethig, R. (2020) Protein dielectrophoresis: I. Status of experiments and an empirical theory. *Micromachines*, **11** (5), 533.
- 44 Pethig, R. (2019) Limitations of the Clausius-Mossotti function used in dielectrophoresis and electrical impedance studies of biomacromolecules. *Electrophoresis*, **40** (18-19), 2575–2583.
- 45 Zavatski, S., Bandarenka, H., Martin, O.J.F. (2023) Protein dielectrophoresis with gradient array of conductive electrodes sheds new light on empirical theory. *Anal Chem*, **95** (5), 2958–2966.
- 46 Veitch, N.C. (2004) Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, **65** (3), 249–259.
- 47 Welinder, K.G. (1976) Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7). *FEBS letters*, **72** (1), 19–23.

-
- 48 Yang, B.Y., Gray, J.S.S., Montgomery, R. (1996) The glycans of horseradish peroxidase. *Carbohydr Res*, **287** (2), 203–212.
- 49 Krainer, F.W. and Glieder, A. (2015) An updated view on horseradish peroxidases: Recombinant production and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, **99** (4), 1611–1625.
- 50 Hiner, A.N.P., Hernández-Ruíz, J., Arnao, M.B., García-Cánovas, F., Acosta, M. (1996) A comparative study of the purity, enzyme activity, and inactivation by hydrogen peroxide of commercially available horseradish peroxidase isoenzymes A and C. *Biotechnol Bioeng*, **50** (6), 655–662.
- 51 Ferapontova, E. and Domínguez, E. (2002) Adsorption of differently charged forms of horseradish peroxidase on metal electrodes of different nature: effect of surface charges. *Bioelectrochemistry*, **55** (1-2), 127–130.
- 52 Berglund, G.I., Carlsson, G.H., Smith, A.T., Szöke, H., Henriksen, A., Hajdu, J. (2002) The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature*, **417** (6887), 463–468.
- 53 Rodriguez-Lopez, J.N., Hernández-Ruiz, J., Garcia-Cánovas, F., Thorneley, R.N., Acosta, M., Arnao, M.B. (1997) The inactivation and catalytic pathways of horseradish peroxidase with m-chloroperoxybenzoic acid: A spectrophotometric and transient kinetic study. *J Biol Chem*, **272** (9), 5469–5476.
- 54 Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N., Haugland, R.P. (1997) A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: Applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal Biochem*, **253** (2), 162–168.
- 55 Bobrow, M.N., Harris, T.D., Shaughnessy, K.J., Litt, G.J. (1989) Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification application to immunoassays. *J Immunol Methods*, **125** (1-2), 279–285.
- 56 van Gijlswijk, R.P., Wiegant, J., Raap, A.K., Tanke, H.J. (1996) Improved localization of fluorescent tyramides for fluorescence in situ hybridization using dextran sulfate and polyvinyl alcohol. *J Histochem Cytochem*, **44** (4), 389–392.
- 57 Gajovic-Eichelmann, N. and Bier, F.F. (2005) Novel electrochemical assay for H₂O₂ determination in aqueous solutions: A non time-critical method for H₂O₂ trace level detection. *Electroanalysis*, **17** (12), 1043–1050.

-
- 58 Gorris, H.H., Rissin, D.M., Walt, D.R. (2007) Stochastic inhibitor release and binding from single-enzyme molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104** (45), 17680–17685.
- 59 Claessen, V.I., Engelkamp, H., Christianen, P.C.M., Maan, J.C., Nolte, R.J.M., Blank, K., Rowan, A.E. (2010) Single-biomolecule kinetics: The art of studying a single enzyme. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, **3**, 319–340.
- 60 Edman, L., Földes-Papp, Z., Wennmalm, S., Rigler, R. (1999) The fluctuating enzyme: A single molecule approach. *Chem Phys*, **247** (1), 11–22.
- 61 Hassler, K., Rigler, P., Blom, H., Rigler, R., Widengren, J., Lasser, T. (2007) Dynamic disorder in horseradish peroxidase observed with total internal reflection fluorescence correlation spectroscopy. *Opt Express*, **15** (9), 5366–5375.
- 62 Comellas-Aragonès, M., Engelkamp, H., Claessen, V.I., Sommerdijk, N.A.J.M., Rowan, A.E., Christianen, P.C.M., Maan, J.C., Verduin, B.J.M., Cornelissen, J.J.L.M., Nolte, R.J.M. (2007) A virus-based single-enzyme nanoreactor. *Nat Nanotechnol*, **2** (10), 635–639.
- 63 Gorris, H.H. and Walt, D.R. (2009) Mechanistic aspects of horseradish peroxidase elucidated through single-molecule studies. *J Am Chem Soc*, **131** (17), 6277–6282.
- 64 Ehrl, B.N., Liebherr, R.B., Gorris, H.H. (2013) Single molecule kinetics of horseradish peroxidase exposed in large arrays of femtoliter-sized fused silica chambers. *The Analyst*, **138** (15), 4260–4265.
- 65 Kooy, N., Royall, J., Ischiropoulos, H., Beckman, J. (1994) Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med*, **16** (2), 149–156.
- 66 Wardman, P. (2008) Methods to measure the reactivity of peroxynitrite-derived oxidants toward reduced fluoresceins and rhodamines, in *Nitric Oxide, Part G Oxidative and Nitrosative Stress in Redox Regulation of Cell Signaling*, Elsevier, 261–282.
- 67 Rota, C., Chignell, C.F., Mason, R.P. (1999) Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: Possible implications for oxidative stress measurements. *Free Radic Biol Med*, **27** (7), 873–881.
- 68 Wrona, M. and Wardman, P. (2006) Properties of the radical intermediate obtained on oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein, a probe for oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, **41** (4), 657–667.

-
- 69 Lu, H.P., Xun, L., Xie, X.S. (1998) Single-molecule enzymatic dynamics. *Science*, **282** (5395), 1877–1882.
- 70 Pimviriyakul, P. and Chaiyen, P. (2020) Overview of flavin-dependent enzymes. *Enzymes*, **47**, 1–36.
- 71 van den Berg, P.A.W., Widengren, J., Hink, M.A., Rigler, R., Visser, A.J.W.G. (2001) Fluorescence correlation spectroscopy of flavins and flavoenzymes: photochemical and photophysical aspects. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, **57** (11), 2135–2144.
- 72 Martin, C., Binda, C., Fraaije, M.W., Mattevi, A. (2020) The multipurpose family of flavoprotein oxidases. *Enzymes*, **47**, 63–86.
- 73 Gadda, G. (2020) Choline oxidases. *Enzymes*, **47**, 137–166.
- 74 Galbán, J., Sanz-Vicente, I., Navarro, J., Marcos, S. de (2016) The intrinsic fluorescence of FAD and its application in analytical chemistry: a review. *Methods Appl Fluoresc*, **4** (4), 42005.
- 75 Galbán, J., Sanz-Vicente, I., Ortega, E., del Barrio, M., Marcos, S. de (2012) Reagentless fluorescent biosensors based on proteins for continuous monitoring systems. *Anal Bioanal Chem*, **402** (10), 3039–3054.
- 76 Ortega, E., Marcos, S. de, Sanz-Vicente, I., Ubide, C., Ostra, M., Vidal, M., Galbán, J. (2016) Fluorescence of the Flavin group in choline oxidase. Insights and analytical applications for the determination of choline and betaine aldehyde. *Talanta*, **147**, 253–260.
- 77 Rahimi, P. and Joseph, Y. (2019) Enzyme-based biosensors for choline analysis: A review. *Trends Analyt Chem*, **110**, 367–374.
- 78 Kaur, J., Bandyopadhyay, D., Singh, P.K. (2022) A simple and convenient choline oxidase inhibition based colorimetric biosensor for detection of organophosphorus class of pesticides. *J Mol Liq*, **347** (27), 118258.
- 79 Wilson, R. and Turner, A.P.F. (1992) Glucose oxidase: an ideal enzyme. *Biosens Bioelectron*, **7** (3), 165–185.
- 80 Degani, Y. and Heller, A. (1987) Direct electrical communication between chemically modified enzymes and metal electrodes. I. Electron transfer from glucose oxidase to metal electrodes via electron relays, bound covalently to the enzyme. *J Phys Chem*, **91** (6), 1285–1289.

-
- 81 Kornecki, J.F., Carballares, D., Tardioli, P.W., Rodrigues, R.C., Berenguer-Murcia, Á., Alcántara, A.R., Fernandez-Lafuente, R. (2020) Enzyme production of d -gluconic acid and glucose oxidase: successful tales of cascade reactions. *Catal Sci Technol*, **10** (17), 5740–5771.
- 82 Tsuge, H., Natsuaki, O., Ohashi, K. (1975) Purification, properties, and molecular features of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *J Biochem*, **78** (4), 835–843.
- 83 Nakamura, S., Hayashi, S., Koga, K. (1976) Effect of periodate oxidation on the structure and properties of glucose oxidase. *Biochim Biophys Acta - Enzymology*, **445** (2), 294–308.
- 84 Gouda, M.D., Singh, S.A., Rao, A.G.A., Thakur, M.S., Karanth, N.G. (2003) Thermal inactivation of glucose oxidase. Mechanism and stabilization using additives. *J Biol Chem*, **278** (27), 24324–24333.
- 85 Pazur, J.H. and Kleppe, K. (1964) The oxidation of glucose and related compounds by glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochemistry*, **3**, 578–583.
- 86 Trettnak, W. and Wolfbeis, O.S. (1989) Fully reversible fibre-optic glucose biosensor based on the intrinsic fluorescence of glucose oxidase. *Anal Chim Acta*, **221**, 195–203.
- 87 Ortiz de Montellano, P.R., David, S.K., Ator, M.A., Tew, D. (1988) Mechanism-based inactivation of horseradish peroxidase by sodium azide. Formation of meso-azidoporphyrin IX. *Biochemistry*, **27** (15), 5470–5476.
- 88 Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci*, **4** (11), 2411–2423.
- 89 Birkholz, M., Ehwald, K.-E., Wolansky, D., Costina, I., Baristiran-Kaynak, C., Fröhlich, M., Beyer, H., Kapp, A., Lisdat, F. (2010) Corrosion-resistant metal layers from a CMOS process for bioelectronic applications. *Surface and Coatings Technology*, **204** (12-13), 2055–2059.
- 90 Prüfer, M., Wenger, C., Bier, F.F., Laux, E.-M., Hölzel, R. (2022) Activity of AC electrokinetically immobilized horseradish peroxidase. *Electrophoresis*, **43** (18-19), 1920–1933.
- 91 Laux, E.-M., Bier, F.F., Hölzel, R. (2018) Electrode-based AC electrokinetics of proteins: A mini-review. *Bioelectrochemistry*, **120**, 76–82.
- 92 Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, **9** (7), 671–675.

-
- 93 Dębski, D., Smulik, R., Zielonka, J., Michałowski, B., Jakubowska, M., Dębowska, K., Adamus, J., Marcinek, A., Kalyanaraman, B., Sikora, A. (2016) Mechanism of oxidative conversion of Amplex® Red to resorufin: Pulse radiolysis and enzymatic studies. *Free Radic Biol Med*, **95**, 323–332.
- 94 Mishin, V., Gray, J.P., Heck, D.E., Laskin, D.L., Laskin, J.D. (2010) Application of the Amplex red/horseradish peroxidase assay to measure hydrogen peroxide generation by recombinant microsomal enzymes. *Free Radic Biol Med*, **48** (11), 1485–1491.
- 95 Zhao, B., Summers, F.A., Mason, R.P. (2012) Photooxidation of Amplex Red to resorufin: implications of exposing the Amplex Red assay to light. *Free Radic Biol Med*, **53** (5), 1080–1087.
- 96 Prüfer, M., Stanke, S., Bier, F.F., Hölzel, R. (2023) Catalytic activity of glucose oxidase after dielectrophoretic immobilization on nanoelectrodes. *Electrophoresis*.
- 97 Ni, Y., Li, J., Huang, Z., He, K., Zhuang, J., Yang, W. (2013) Improved activity of immobilized horseradish peroxidase on gold nanoparticles in the presence of bovine serum albumin. *J Nanopart Res*, **15** (11), 5689.
- 98 Pomory, C.M. (2008) Color development time of the Lowry protein assay. *Anal Biochem*, **378** (2), 216–217.
- 99 Stetefeld, J., McKenna, S.A., Patel, T.R. (2016) Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev*, **8** (4), 409–427.
- 100 Navapour, L., Mogharrab, N., Amininasab, M. (2014) How modification of accessible lysines to phenylalanine modulates the structural and functional properties of horseradish peroxidase: a simulation study. *PloS one*, **9** (10), e109062.
- 101 Ramos, A., Morgan, H., Green, N.G., Castellanos, A. (1998) AC electrokinetics: a review of forces in microelectrode structures. *J Phys D Appl Phys*, **31** (18), 2338–2353.
- 102 Stanke, S., Bier, F.F., Hölzel, R. (2011) Fluid streaming above interdigitated electrodes in dielectrophoresis experiments. *Electrophoresis*, **32** (18), 2448–2455.
- 103 Armbruster, D.A. and Pry, T. (2008) Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev*, **29** (Suppl 1), 49-52.
- 104 Dai, W.-L., Ding, J., Zhu, Q., Gao, R., Yang, X. (2016) Tungsten containing materials as heterogeneous catalysts for green catalytic oxidation process, in *Catalysis*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1–27.

- 105 Luna, M.L. and Cedeno-Caero, L. (2018) Tungsten based catalysis for oxidative desulfurization: surface species and partially reduced systems as key features to improve the activity. *J Appl Res Technol*, **12**, 455–465.
- 106 Lee, C.-W., Chen, Y.-C., Ostafin, A. (2009) The accuracy of Amplex Red assay for hydrogen peroxide in the presence of nanoparticles. *J Biomed Nanotechnol*, **5** (5), 477–485.
- 107 Fritzen-Garcia, M.B., Monteiro, F.F., Cristofolini, T., Acuña, J.J.S., Zanetti-Ramos, B.G., Oliveira, I.R.W.Z., Soldi, V., Pasa, A.A., Creczynski-Pasa, T.B. (2013) Characterization of horseradish peroxidase immobilized on PEGylated polyurethane nanoparticles and its application for dopamine detection. *Sens Actuators B Chem*, **182**, 264–272.
- 108 Laberge, M., Huang, Q., Schweitzer-Stenner, R., Fidy, J. (2003) The endogenous calcium ions of horseradish peroxidase C are required to maintain the functional nonplanarity of the Heme. *Biophys J*, **84** (4), 2542–2552.
- 109 Wolf, F.A. de and Brett, G.M. (2000) Ligand-binding proteins: their potential for application in systems for controlled delivery and uptake of ligands. *Pharmacol Rev*, **52** (2), 207–236.
- 110 Böhme, U. and Scheler, U. (2007) Effective charge of bovine serum albumin determined by electrophoresis NMR. *Chem Phys Lett*, **435** (4), 342–345.
- 111 Katchalski-Katzir, E. (1993) Immobilized enzymes - Learning from past successes and failures. *Trends Biotechnol*, **11** (11), 471–478.
- 112 Hoarau, M., Badiéyan, S., Marsh, E.N.G. (2017) Immobilized enzymes: Understanding enzyme - surface interactions at the molecular level. *Org Biomol Chem*, **15** (45), 9539–9551.
- 113 Giraud, G., Pethig, R., Schulze, H., Henihan, G., Terry, J.G., Menachery, A., Ciani, I., Corrigan, D., Campbell, C.J., Mount, A.R., Ghazal, P., Walton, A.J., Crain, J., Bachmann, T.T. (2011) Dielectrophoretic manipulation of ribosomal RNA. *Biomicrofluidics*, **5** (2), 24116.
- 114 Hoyle, M.C. (1977) High resolution of peroxidase-indoleacetic acid oxidase isoenzymes from horseradish by isoelectric focusing. *Plant Physiol*, **60** (5), 787–793.
- 115 Fujiyama, K., Takemura, H., Shibayama, S., Kobayashi, K., Choi, J.K., Shinmyo, A., Takano, M., Yamada, Y., Okada, H. (1988) Structure of the horseradish peroxidase isozyme C genes. *Eur J Biochem*, **173** (3), 681–687.

-
- 116 Arnao, M.B., Acosta, M., del Rio, J.A., Varón, R., García-Cánovas, F. (1990) A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta*, **1041** (1), 43–47.
- 117 Samaranyake, C.P. and Sastry, S.K. (2021) Molecular dynamics evidence for nonthermal effects of electric fields on pectin methylesterase activity. *Phys Chem Chem Phys*, **23** (26), 14422–14432.
- 118 Kretschmer, R. and Fritzsche, W. (2004) Pearl chain formation of nanoparticles in microelectrode gaps by dielectrophoresis. *Langmuir*, **20** (26), 11797–11801.
- 119 Ohta-Fukuyama, M., Miyake, Y., Emi, S., Yamano, T. (1980) Identification and properties of the prosthetic group of choline oxidase from *Alcaligenes sp.* *J Biochem*, **88** (1), 197–203.
- 120 Chen, B., Xia, Y., He, R., Sang, H., Zhang, W., Li, J., Chen, L., Wang, P., Guo, S., Yin, Y., Hu, L., Song, M., Liang, Y., Wang, Y., Jiang, G., Zare, R.N. (2022) Water-solid contact electrification causes hydrogen peroxide production from hydroxyl radical recombination in sprayed microdroplets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **119** (32), e2209056119.
- 121 Carey, D.M. and Korenowski, G.M. (1998) Measurement of the Raman spectrum of liquid water. *J Chem Phys*, **108** (7), 2669–2675.
- 122 Li, Y., Mehari, T.F., Wei, Z., Liu, Y., Cooks, R.G. (2021) Reaction acceleration at solid/solution interfaces: Katritzky reaction catalyzed by glass particles. *Angew Chem Int Ed Engl*, **60** (6), 2929–2933.
- 123 Magnusson, B. and Örnemark, U. (2014) *Eurachem Guide: The fitness for purpose of analytical methods - A laboratory guide to method validation and related topics*, 2nd edn, Eurachem, Teddington.
- 124 Calvo, E.J., Etchenique, R., Pietrasanta, L., Wolosiuk, A., Danilowicz, C. (2001) Layer-by-layer self-assembly of glucose oxidase and Os(Bpy)₂CIPyCH₂NH-poly(allylamine) bioelectrode. *Anal Chem*, **73** (6), 1161–1168.
- 125 Hecht, H.J., Kalisz, H.M., Hendle, J., Schmid, R.D., Schomburg, D. (1993) Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol*, **229** (1), 153–172.
- 126 Wolfbeis, O.S. and Trettnak, W. (1989) A new type of fiber optic biosensor based on the intrinsic fluorescence of immobilized flavoproteins, in *Chemical, Biochemical, and*

- Environmental Fiber Sensors* (eds R.A. Lieberman and M.T. Włodarczyk). OE/FIBERS '89, Tuesday 5 September 1989, Boston. SPIE, 287.
- 127 WEBER, G. (1950) Fluorescence of riboflavin and flavin-adenine dinucleotide. *Biochem J*, **47** (1), 114–121.
- 128 Champion, P.M. and Lange, R. (1980) On the quantitation of light emission from cytochrome c in the low quantum yield limit. *J Chem Phys*, **73** (12), 5947–5957.
- 129 Zhong, D. and Zewail, A.H. (2001) Femtosecond dynamics of flavoproteins: charge separation and recombination in riboflavine (vitamin B2)-binding protein and in glucose oxidase enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98** (21), 11867–11872.
- 130 Humer, D. and Spadiut, O. (2019) Improving the performance of horseradish peroxidase by site-directed mutagenesis. *Int J Mol Sci*, **20** (4), 916.
- 131 Asad, S., Torabi, S.-F., Fathi-Roudsari, M., Ghaemi, N., Khajeh, K. (2011) Phosphate buffer effects on thermal stability and H₂O₂-resistance of horseradish peroxidase. *Int J Biol Macromol*, **48** (4), 566–570.
- 132 Della Valle, E., Marracino, P., Pakhomova, O., Liberti, M., Apollonio, F. (2019) Nanosecond pulsed electric signals can affect electrostatic environment of proteins below the threshold of conformational effects: The case study of SOD1 with a molecular simulation study. *PloS one*, **14** (8), e0221685.
- 133 Benavidez, T.E., Torrente, D., Marucho, M., Garcia, C.D. (2014) Adsorption and catalytic activity of glucose oxidase accumulated on OTCE upon the application of external potential. *J Colloid Interface Sci*, **435**, 164–170.
- 134 Ammam, M. and Fransaer, J. (2009) AC-electrophoretic deposition of glucose oxidase. *Biosens Bioelectron*, **25** (1), 191–197.
- 135 Htwe, E.E., Nakama, Y., Yamamoto, Y., Tanaka, H., Imanaka, H., Ishida, N., Imamura, K. (2018) Adsorption characteristics of various proteins on a metal surface in the presence of an external electric potential. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **166**, 262–268.
- 136 Furusaki, S. and Asai, N. (1983) Enzyme immobilization by the coulomb force. *Biotechnol Bioeng*, **25** (9), 2209–2219.
- 137 Fritz, P.A., Bera, B., van den Berg, J., Visser, I., Kleijn, J.M., Boom, R.M., Schroën, C.G.P.H. (2021) Electrode surface potential-driven protein adsorption and desorption

- through modulation of electrostatic, van der Waals, and hydration interactions. *Langmuir*, **37** (21), 6549–6555.
- 138 Benavidez, T.E. and Garcia, C.D. (2013) Potential-assisted adsorption of bovine serum albumin onto optically transparent carbon electrodes. *Langmuir*, **29** (46), 14154–14162.
- 139 Nasir, N.S.A., Deivasigamani, R., Wee, M.F.M.R., Hamzah, A.A., Zaid, M.H.M., Rahim, M.K.A., Kayani, A.A., Abdulhameed, A., Buyong, M.R. (2022) Protein albumin manipulation and electrical quantification of molecular dielectrophoresis responses for biomedical applications. *Micromachines*, **13** (8), 1308.
- 140 Shimizu, M., Kobayashi, K., Morii, H., Mitsui, K., Knoll, W., Nagamune, T. (2003) Secondary structure analyses of protein films on gold surfaces by circular dichroism. *Biochem Biophys Res Commun*, **310** (2), 606–611.
- 141 Chen, Y.H., Yang, J.T., Martinez, H.M. (1972) Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion. *Biochemistry*, **11** (22), 4120–4131.
- 142 Haraguchi, T., Shimi, T., Koujin, T., Hashiguchi, N., Hiraoka, Y. (2002) Spectral imaging fluorescence microscopy. *Genes Cells*, **7** (9), 881–887.
- 143 Narushima, T. and Okamoto, H. (2016) Circular dichroism microscopy free from commingling linear dichroism via discretely modulated circular polarization. *Sci Rep*, **6**, 35731.
- 144 Bianco, V., Alonso-Navarro, M., Di Silvio, D., Moya, S., Cortajarena, A.L., Coluzza, I. (2019) Proteins are solitary! Pathways of protein folding and aggregation in protein mixtures. *J Phys Chem Lett*, **10** (17), 4800–4804.
- 145 Aktan, M.K., Coppola, G.A., van der Gucht, M., Yoshioka, T., Killian, M.S., Lavigne, R., van der Eycken, E., Steenackers, H.P., Braem, A. (2022) Influence of polydopamine functionalization on the rapid protein immobilization by alternating current electrophoretic deposition. *Surf Interfaces*, **34** (A), 102347.
- 146 Topolniak, I., Elert, A.M., Knigge, X., Ciftci, G.C., Radnik, J., Sturm, H. (2022) High-precision micropatterning of polydopamine by multiphoton lithography. *Adv Mater*, **34** (18), e2109509.
- 147 Szewczyk, J., Aguilar-Ferrer, D., Coy, E. (2022) Polydopamine films: Electrochemical growth and sensing applications. *Eur Polym J*, **174** (1), 111346.

-
- 148 Beloqui, A., Baur, S., Trouillet, V., Welle, A., Madsen, J., Bastmeyer, M., Delaittre, G. (2016) Single-Molecule Encapsulation: A straightforward route to highly stable and printable enzymes. *Small*, **12** (13), 1716–1722.
- 149 Solomon, B., Lotan, N., Katchalski-Katzir, E. (1977) Enzymic activity and conformational properties of native and crosslinked glucose oxidase. *Biopolymers*, **16** (9), 1837–1851.
- 150 Hsieh, Y.-P. and Lin, S.-C. (2015) Effect of PEGylation on the activity and stability of horseradish peroxidase and l-N-carbamoylase in aqueous phases. *Process Biochem*, **50** (9), 1372–1378.
- 151 Gao, R., Edwards, M.A., Harris, J.M., White, H.S. (2020) Shot noise sets the limit of quantification in electrochemical measurements. *Curr Opin Electrochem*, **22**, 170–177.

Anhang

ImageJ Macros für die automatisierte Bildauswertung

Ermittlung der mittleren hintergrundkorrigierten Helligkeit für eine Gruppe von Elektroden

```
//für Bilder W-Zylinderelektroden, 100x, FView, ohne Binning
//anderes Format: Translate-Werte anpassen

//Macro zum Auswerten von Intensität auf Elektroden und zwischen Elektroden
//benötigte eine kombinierte ROI aus n einzel-ROIs.
//Diese wird auf den Elektroden platziert und im ROI-Manager angewählt,
//dann kann Macro gestartet werden.
//Das Macro teilt die Kombi-ROI wieder in einzel-ROIs und misst deren mittlere Helligkeit
//Dafür muss Mean grey Value in Set Measurements angewählt sein.
//Mittelwert und Standardabweichung werden gespeichert.
//Das ROI Set wird um x=15, y=15 auf Flächen zwischen den Elektroden verschoben
//Es wird erneut gemessen, gemittelt.
//Die ursprüngliche Kombi-ROI wird wiederhergestellt.

//Kombinierte ROIs erstellt man im ROI Manager: einzelne ROIs platzieren,
//auswählen (oder nichts auswählen),
//und unter More>Combine zu einer kombinierten ROI zusammenfügen
//Diese kann auch gespeichert und in ImageJ eingelesen werden wie ein normales ROI Set
//(Beispiel ist im Ordner: 5x5Elektroden_10pixel_eineroi_03.roi)

Dateiname=getTitle()

roiManager("Split");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Delete");
nROI=roiManager("count")
run("Clear Results");
roiManager("Measure");
run("Summarize");
```

```
//die Zählung in ImageJ beginnt mit 0; 25 ist also eigentlich die 26. Zeile
MeanROI=getResult("Mean",nROI)
SD_ROI=getResult("Mean",nROI+1)
run("Clear Results");

roiManager("translate", 15, 15);
roiManager("Measure");
run("Summarize");

MeanBG=getResult("Mean",nROI)
SD_BG=getResult("Mean",nROI+1)

//Die Aussage vom BG ist so kompliziert, damit im Fenster auffällt,
//wenn nicht auf die richtige Zeile zugegriffen wird,
//z.B. weil nicht 25 ROIs ausgewählt sind.
Label25=getResultString("Label",nROI) + " BG - Offset"
Label26=getResultString("Label",nROI+1) + " BG"

//Die ROIs werden wieder zusammengefasst und die Einzel-ROIs gelöscht
//Array.get.Sequence(n) erzeugt eine Array mit den Zahlen 0,.., n-1
roiManager("translate", -15, -15);
roiManager("Combine")
roiManager("Add");
A2=Array.getSequence(nROI);
roiManager("Select", A2);
roiManager("Delete");

run("Clear Results");
setResult("Bild", 0, Dateiname)
setResult("Mean ROI - Offset", 0, MeanROI-128)
setResult("SD ROI", 0, SD_ROI)
setResult(Label25, 0, MeanBG-128)
setResult(Label26, 0, SD_BG)
setResult("N ROI", 0, nROI)
```

Lineare Regression der Bildhelligkeit in einem Stack und Berechnung der HRP-Menge auf dem Chip

```
//Dieses Macro ermittelt den Anstieg der Resorufin-Konzentration in einem Stack
//Daraus wird die HRP-Konzentration und die resultierende Menge auf dem Chip berechnet
//Kalibrierung gilt für Olympus BX53, Objektiv 60x NA 0,7; verkleinerter Bildausschnitt
//Filter Cy3, LED 550 nm 100%, Belichtung 200 ms, Leuchfeldblende geschlossen
//Aktivitätsberechnung gilt für Intervall 10 s; 1,5 µL Ansatz auf dem Chip
// Amplex Red Konzentration wird abgefragt (Ansatz B: 2,6 µM; C: 26 µM) und berücksichtigt

//Daten Abrufen
//Kalibrierfunktion (25.08.2021) in 1/µM: k=1208.7
Dateiname=getTitle()
Ansatz = getString("Amplex Red Ansatz", "B");
k = getNumber("Kalibrierwert Resorufin [1/uM]", 1208.7);
if (Ansatz == "B")
    {f = 1.1214;
    g = 1.7553;}
else if (Ansatz == "C")
    {f = 1.1141;
    g = 13.7640; }
else
    print ("keine Kalibrierdaten fuer Ansatz vorhanden") ;

//{ROI erstellen: wie die, die für Resorufin-Kalibrierung verwendet wurde}
makeOval(90, 90, 580, 580);
roiManager("Add");
roiManager("multi-measure measure_all one append");

//Arrays für Fit definieren
y = Table.getColumn("Mean1");
y2 = Array.slice(y, 0, 7);

x = newArray(0, 10, 20, 30, 40, 50, 60);
selectWindow("Results");
run("Close");
selectWindow("ROI Manager");
run("Close");

// Lineare Regression:
```

```

Fit.doFit("Straight Line", x, y2);
n = (d2s(Fit.p(0),6) ) ;
m = (d2s(Fit.p(1),6));
R2=(d2s(Fit.rSquared,4));

//Berechnung Aktivität unter Beachtung dc/dt=f(cHRP)
a = m * (1/k) * 60;
if (a>0){
cHRP = exp((1/f) * log(a * 1/g));
mHRP = cHRP * 0.0000015 * 44000 * 1000;}
else {
cHRP = (-1)*exp((1/f) * log(a * -1/g));
mHRP = cHRP * 0.0000015 * 44000 * 1000;}

//auf Überbelichtung kontrollieren
selectWindow(Dateiname);
setSlice(7);
getStatistics(area, mean, min, max, std);
z = (max);

//Ist Log vorhanden? Dann nur Werte eintragen; sonst Tabellenkopf anlegen
if (isOpen("Log")){
    print (Dateiname,";",Ansatz,";", k,";",f,";", g, " ";"n,";"m,";" R2,
";",a,";",cHRP,";"mHRP,";" z, ");}
else{
    print("Bild; Ansatz; Kalibrierwert; f; g; Achsenschnitt n; Anstieg m; R2; dc/dt
[µM/min]; cHRP [nM]; m(HRP) [pg]; Imax bei 60s;");
    print (Dateiname,";",Ansatz,";", k,";",f,";", g, " ";"n,";"m,";" R2,
";",a,";",cHRP,";"mHRP,";" z, ");}

selectWindow(Dateiname);
run("Close");

```

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Frank F. Bier für die Betreuung dieser Arbeit, das Interesse an meinem Thema und für die Möglichkeit, in freundlicher Atmosphäre Vorträge zu halten und zu diskutieren.

Diese Arbeit wurde am Fraunhofer IZI-BB in Potsdam-Golm in der Arbeitsgruppe von Dr. Ralph Hölzel durchgeführt. Ihm möchte ich für die gute fachliche Betreuung und die ausführlichen Diskussionen, für die freundliche Atmosphäre in der Arbeitsgruppe und nicht zuletzt auch für die Reparaturen und Erweiterungen an Mikroskopen und Spektrometern danken.

Auch allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, Dr. Eva-Maria Laux, Dr. Xenia Knigge, Sandra Stanke, Dr. Marlen Kruse und Victor Daisuke Kietzmann, möchte ich ganz herzlich für die vielen Diskussionen, die mich oft weitergebracht haben, und die freundliche Zusammenarbeit danken. Mein besonderer Dank gilt dabei Xenia für die geduldige Einführung in die Arbeit mit den Elektrodenchips sowie Sandra für die Unterstützung beim Schreiben der Macros und bei vielen kleinen und großen technischen Problemen, aber vor allem für die Gespräche und die gute Zusammenarbeit auch am Ende dieser Arbeit. Ich danke Eva außerdem für die Bereitstellung der AFM-Bilder und Emily Kroll für die Hilfe bei der Erstellung der 3D-Grafiken. Außerdem danke ich allen Kollegen am IZI-BB, besonders Dr. Nenad Gajovic-Eichelmann und Dr. Marina Neumann für die Auskunft und Unterstützung bei Fragen zum Mechanismus der HRP und zur Kopplungschemie sowie Bettina Junker für die Hilfe bei der SDS-PAGE.

Für die Bereitstellung der Elektroden danke ich Prof. Dr. Christian Wenger vom IHP.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und Motivation in dieser Zeit, aber auch für die vielen Gelegenheiten zur Ablenkung und Erholung. Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Mann Tobias für den Rückhalt und die persönliche Unterstützung, aber auch für die vielen fachlichen Diskussionen bedanken.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel von mir verfasst wurde. Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Hochschule eingereicht.

Potsdam, den 18. April 2023

(Mareike Prüfer)