

Julia Metzner

Entwicklung einer neuartigen
Biosensor-Plattform zur
Protein-Detektion

Entwicklung einer neuartigen Biosensor-Plattform zur Protein-Detektion

Von der Fakultät für Ingenieurwissenschaften

der Universität Bayreuth

zur Erlangung der Würde eines

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigte Dissertation

von

M.Sc. Julia Metzner

aus

Landstuhl

Erstgutachter: Prof. Dr.-Ing. Ralf Moos

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ruth Freitag

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2019

Lehrstuhl für Funktionsmaterialien

Universität Bayreuth

2020

Bayreuther Beiträge zur Sensorik und Messtechnik

Band 30

Julia Metzner

**Entwicklung einer neuartigen Biosensor-Plattform
zur Protein-Detektion**

Shaker Verlag
Düren 2020

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Bayreuth, Univ., Diss., 2019

Copyright Shaker Verlag 2020

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-7209-9

ISSN 1862-9466

Shaker Verlag GmbH • Am Langen Graben 15a • 52353 Düren

Telefon: 02421 / 99 0 11 - 0 • Telefax: 02421 / 99 0 11 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Vorwort der Herausgeber

Zur Verbesserung der Diagnostik von Patienten unter besonderer Berücksichtigung des demographischen Wandels wird einer patientennahen Diagnostik, im engl. als „Point-of-Care-Testing“ bezeichnet und mit POC oder POCT abgekürzt, eine zunehmende Bedeutung prognostiziert. Gerade Biosensoren könnten hier einen großen Beitrag leisten. Es existieren viele wissenschaftliche Grundlagenarbeiten um einzelne für die menschliche Gesundheit relevante Analyte zu detektieren, selten aber wird an einer kompletten Plattform, die auch später industriell umsetzbar ist, gearbeitet. Von industriellem - und daher auch kommerziellem - Interesse ist die quantitative Detektion von Proteinen des Entzündungsstoffwechsels (Zytokine). Hier bieten sich Immunosensoren, das sind Biosensoren, deren biologische Erkennungselemente Antikörper sind, an.

Hier setzt die vorliegende Arbeit an. Ziel ist die Entwicklung einer elektrochemischen Biosensor-Plattform, die als Grundlage für ein späteres Gerät dienen könnte. Die Messung erfolgt nach dem ELISA-Prinzip (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), das bereits gut bekannt ist. Zur Signaltransduktion wird aber kein optisches, sondern ein elektrochemisches Ausleseprinzip ausgewählt. Als amperometrisches Messsignal dient der vom selektiv angekoppelten Enzym Meerrettichperoxidase katalysierte Reduktionsstrom, der bei H_2O_2 -Zugabe auftritt. Dessen Messung erfolgt temperaturkontrolliert und die gesamte Plattform wird mit einer Fließinjektionsanalyse (FIA) zur besseren Automatisierbarkeit und Reproduzierbarkeit ausgestattet. Die Funktionsfähigkeit der Plattform wird anhand der quantitativen Bestimmung der Zytokine Interleukin-13 (IL-13) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) nachgewiesen, wobei auch eine hohe Kreuzselektivität festgestellt wird.

Bayreuth im Dezember 2019

Prof. Dr.-Ing. Ralf Moos, Prof. Dr.-Ing. Gerhard Fischerauer

Allein der Wechsel ist das
Beständige.

(Schopenhauer)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Menschen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr.-Ing. Ralf Moos, für die freundliche Übernahme der Betreuung dieser Arbeit und die wissenschaftlichen Diskussionen danken. Ein großes Dankeschön geht an Dr. Martin Hämmerle für die konstruktiven Diskussionen rund um die Themen Biosensorik und Elektrochemie sowie für die hilfreichen praktischen Ratschläge.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Petra Neff und Dr. Karin Lemuth der Arbeitsgruppe *Chemical Sensors and Catalysis* bzw. *Life Science* für die Möglichkeit zur Nutzung der Räumlichkeiten und Ausstattung der Robert Bosch GmbH zur Durchführung dieser Forschungsarbeit, für die organisatorische Unterstützung sowie für die hilfreichen mitunter fachlichen Gespräche. Für die freundliche Übernahme der Betreuung seitens der Robert Bosch GmbH und die fachlichen sowie persönlichen Gespräche möchte mich ganz herzlich bei Dr. Katrin Luckert bedanken. Ein weiteres großes Dankeschön gilt Dr. Yvonne Beyl und Dr. Isabelle Raible für die fachlichen Diskussionen zum Thema Elektrochemie.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei Karen Ellen Ende und Christian Hein für die tatkräftige Unterstützung im Rahmen ihrer Forschungspraktika bedanken.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Dr. Tim Poguntke, Dr. Thibaut Reuschlé, Jana Bläsius, Clémence Vernier und Elke Flegel, mit denen ich das Doktorandenkolloquium 2016 organisieren durfte sowie bei meinen weiteren ehemaligen Kollegen und mittlerweile Freunden Dr. Anne Fuchs, Dr. Ingeborg Hospach und Dr. Klaus Wutz für den fachlichen und persönlichen Austausch in dieser nicht immer einfachen Zeit.

Der größte Dank geht an meine Familie und insbesondere an meinen Freund Philipp Schrempf für die endlose Geduld, die fortwährende Unterstützung und das uneingeschränkte Vertrauen in mich.

Kurzfassung

Biosensoren besitzen Potential zum Einsatz in der medizinischen Diagnostik, in der Lebensmittel- und Umweltanalytik sowie in der industriellen Prozesskontrolle. Sie eignen sich insbesondere zur Entwicklung von Systemen, welche eine patientennahe Labordiagnostik, *Point-of-Care-Testing* (POCT), gewährleisten. Diesbezüglich ist eine Vielzahl an Forschungsarbeiten in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben, jedoch gibt es wenige, auf elektrochemischen Biosensoren basierende, kommerzielle Geräte am Markt.

Deshalb war das Ziel dieser Arbeit die Entwicklung einer neuartigen elektrochemischen Biosensor-Plattform. Der Begriff Plattform bezeichnet in diesem Zusammenhang ein System, mit dem mehrere Analyten parallel und automatisiert erfasst werden können und stellt einen ersten Schritt in Richtung einer Geräteentwicklung dar. Hierzu sollten zunächst funktionsfähige Sensoren entwickelt werden. Als Novum sollte eine Temperatur-kontrollierte Messung der Analyten zu einem niedrigeren Detektionslimit führen. Als Analyten wurden Proteine des Entzündungsstoffwechsels, sogenannte Zytokine, ausgewählt. Für das Biosensor-Design wurden Antikörpern als Biorezeptoren und ein elektrochemisches Messprinzip festgelegt. Werden Antikörper als Rezeptoren eines Biosensors verwendet, spricht man von sogenannten Immunosensoren. Zur Umsetzung des beschriebenen Ziels wurde die Arbeit in die beiden Abschnitte Sensorentwicklung und Systementwicklung gegliedert.

Im Rahmen der Sensorentwicklung wurden zwei elektrochemische Biosensoren zum quantitativen Nachweis der Zytokine Interleukin-13 (IL-13) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) entwickelt. Hierzu wurde ein bekanntes Sensorprinzip verwendet und verschiedene Sensorkonzepte untersucht, welche sich bezüglich der Anbindung der Antikörper und der Art des Massentransfers chemischer Substanzen zur Sensoroberfläche unterscheiden. Nach einer Entscheidung für ein Sensorkonzept wurden die beiden Sensoren optimiert und charakterisiert. Die Detektionslimits, *Limits of Detection* (LOD), lagen bei 7 ng/ml (IL-13) und 0,7 ng/ml (TNF α). Im Vergleich zu durchgeführten *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays* (ELISAs) und in der Literatur beschriebener Sensoren mit Detektionslimits im Bereich von pg/ml bzw. fg/ml, sind die entwickelten Sensoren weniger sensitiv. Hauptgrund dafür könnte das relativ hohe Hintergrundsignal sein, welches keine eindeutige Unterscheidung geringer Analyt-Konzentrationen vom Hintergrund zulässt. Weitere Gründe könnten eine geringe Oberflächenvergrößerung der Elektrode und dadurch eine begrenzte Anzahl potentieller Bindestellen für die Analyten, mangelnde Signalverstärkung, nicht-orientierte

Anbindung der Antikörper sowie ein unzureichend unterstützter Elektronentransfer durch das Elektrodenmaterial sein.

Im Rahmen der Systementwicklung wurde ein Fließsystem mit integrierter Temperaturkontrollfunktion entwickelt und zur teilautomatisierten Messung der Biosensoren eingesetzt. Zunächst wurden geeignete Systemparameter experimentell bestimmt, bevor der IL-13-Biosensor im Fließsystem charakterisiert wurde. Die Messungen im Fließsystem (LOD = 5,8 ng/ml) und die bisherigen manuellen Messungen (LOD = 7 ng/ml) zeigten eine ähnliche Sensorcharakteristik. Dennoch bietet das Fließsystem einige Vorteile, da es eine teilautomatisierte Detektion erlaubt und manuelle Einflüsse minimiert. Die Charakterisierung bei einem ermittelten Temperaturoptimum von 30 °C führte zu einer erhöhten Sensitivität (Steigung der Kalibrierkurve), jedoch ohne Verbesserung des Detektionslimits (LOD = 5,4 ng/ml). Der Grund für die erhöhte Sensitivität ist möglicherweise eine gesteigerte Aktivität des Enzyms Meerrettichperoxidase, *Horseradish Peroxidase* (HRP), welches als Auslesemolekül (*Label*) der Sensoren eingesetzt wurde. Ein unverändertes Detektionslimit könnte, wie zuvor beschrieben, auf das relativ hohe Hintergrundsignal des Sensors zurückzuführen sein. In einer ersten Selektivitätsstudie wurde IL-13 erfolgreich in einer komplexen biologischen Matrix nachgewiesen. Zudem wurde keine Kreuzreaktivität des IL-13- und des TNF α -Sensors festgestellt.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit zwei elektrochemische Biosensoren und ein Fließsystem entwickelt sowie das Potential einer Temperatur-kontrollierten Messung aufgezeigt.

Abstract

Biosensors have the potential to be applied in medical diagnostics, food and environmental analytics as well as industrial process control. They are especially suitable for the development of devices ensuring diagnostics near the patient, POCT. Regarding this field of application a lot of research work is described in literature but only few devices based on electrochemical biosensors are commercially available.

Hence, aim of this work was the development of a novel electrochemical biosensor platform. The term platform describes a system which is capable of automation and multiple analyte detection and therefore presents a prototypical device. At the beginning, sensor development should be addressed. Furthermore, a temperature-controlled read-out of the biosensors was assumed to enhance their detection limit. As target analytes, proteins which are involved in inflammatory reactions, so-called cytokines, were chosen. The biosensors were set up by using antibodies as receptors and by applying an electrochemical detection principle for read-out. Biosensors using antibodies as receptors are also known as immunosensors. To accomplish the aforementioned aim, this thesis was divided into two main parts: sensor development and system development.

During sensor development, two electrochemical biosensors for quantitative detection of the cytokines IL-13 and TNF α were developed. Based on a well-known sensor principle, different sensor concepts were investigated differing by their electrode or support materials for antibody immobilization and types of mass transfer. After choosing a suitable sensor concept, the sensors were optimized and characterized. The calculated detection limits, LOD, were 7 ng/ml for the IL-13-sensor and 0.7 ng/ml for the TNF α -sensor. Compared to performed ELISAs and described sensors in literature, the here developed sensors are less sensitive. The main issue could be the relatively high background signal which makes it difficult to discriminate between small analyte concentrations and the background. Further reasons could be an insufficient increase in the electrode's surface area and hence limited binding sites for analytes, little signal amplification and randomly oriented antibodies as well as an insufficiently supported electron transfer by the electrode material.

During system development, a fluidic system with an integrated heating function was developed and applied for semi-automated biosensor measurements. After determination of suitable flow parameters, the system was used for IL13-sensor characterization. Thereby

the IL-13-sensor showed a detection limit (LOD = 5.8 ng/ml) which is comparable to the detection limit of the previously performed manual characterization (LOD = 7 ng/ml). Nevertheless, the fluidic system offers some advantages as it allows semi-automated detection and minimizes manual interactions. A characterization of the IL-13-sensor at the determined temperature optimum of 30 °C led to an increase in sensitivity (slope of calibration curve) instead of detection limit enhancement (LOD = 5.4 ng/ml). Signal increase with elevated temperature is most likely related to an increased activity of the enzymatic label HRP. The unchanged detection limit could be presumably explained by the previously described high background signal. In a first selectivity study, IL-13 was analysed concentration-depended in a complex biological matrix. Furthermore, no cross reactivity of the IL-13- and TNF α -sensor was determined.

In conclusion, two electrochemical biosensors and a fluidic system were developed and the potential of a temperature-controlled read-out was shown.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|--|
| AP | alkalische Phosphatase |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| BCA | <i>Bicinchoninic Acid</i> |
| β-Gal | β -Galaktosidase |
| BNP | <i>Brain natriuretic Peptide</i> |
| BSA | <i>Bovine Serum Albumin</i> |
| BSD | Rückstreuелеktronendetektor |
| CCD | <i>Charge-Coupled Device</i> |
| CD | <i>Circular Dichroism</i> |
| CDR | <i>Complementary Determing Region</i> |
| CH | <i>Constant Heavy Domain</i> |
| CL | <i>Constant Light Domain</i> |
| CNT | <i>Carbon Nanotubes</i> |
| COPD | <i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i> |
| CR | <i>Cross Reactivity</i> |
| CRP | <i>C-reactive Protein</i> |
| cTNI | <i>Cardiac Troponin I</i> |
| CV | <i>Cyclic Voltammogram</i> |
| CVD | <i>Chemical Vapor Deposition</i> |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DPV | <i>Differential Pulse Voltammetry</i> |
| DWCNT | <i>Double-Walled Carbon Nanotubes</i> |
| EDC | 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid |

| | |
|-------------------------------|--|
| EDTA | <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> |
| ELISA | <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> |
| Fab-Fragment | <i>Fragment antibody binding</i> |
| Fc-Fragment | <i>Fragment crystallizable</i> |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FET | Feldeffekttransistor |
| FIA | <i>Flow Injection Analysis</i> |
| HRP | <i>Horseradish Peroxidase</i> |
| HQ | Hydrochinon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL-1β | Interleukin-1 β |
| IL-4 | Interleukin-4 |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| IL-8 | Interleukin-8 |
| IL-13 | Interleukin-13 |
| IUPAC | <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> |
| K_D | Affinitätskonstante |
| LFA | <i>Lateral Flow Assay</i> |
| LOD | <i>Limit of Detection</i> |
| LTCC | <i>Low Temperature Cofired Ceramics</i> |
| MES | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure |
| MMP | Matrixmetalloprotease |
| MWCNT | <i>Multi-Walled Carbon Nanotubes</i> |
| NTC | <i>Negative Temperature Coefficient</i> |
| p.A. | <i>pro Analysis</i> |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |

| | |
|-------------------------------|--|
| PEEK | Polyetheretherketon |
| PF-4 | <i>Platelet-Factor-4</i> |
| PMMA | Polymethylmethacrylat |
| POC | <i>Point-of-Care</i> |
| POCT | <i>Point-of-Care-Testing</i> |
| PSA | <i>Prostate Specific Antigen</i> |
| PSMA | <i>Prostate Specific Membran Antigen</i> |
| PTFE | Polytetrafluorethylen |
| Q | Verdünnungsfaktor |
| REM | Rasterelektronenmikroskopie |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| RuBPY | Ruthenium Bipyridin |
| SD | <i>Standard Deviation</i> |
| SE | Sekundärelektronendetektor |
| SPE | <i>Screen-printed Electrode</i> |
| SPR | <i>Surface Plasmon Resonance</i> |
| Sulfo-NHS | N-Hydroxysulfosuccinimid |
| SWCNT | <i>Single-Walled Carbon Nanotubes</i> |
| SWV | <i>Square Wave Voltammetry</i> |
| TIMP | <i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i> |
| TMB | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin |
| TNFα | Tumor-Nektrose-Faktor α |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| VH | <i>Variable Heavy Domain</i> |
| VL | <i>Variable Light Domain</i> |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------------|
| Danksagung | iii |
| Kurzfassung | v |
| Abstract | vii |
| Abkürzungsverzeichnis | ix |
| 1 Einleitung und Zielsetzung | 1 |
| 2 Grundlagen | 4 |
| 2.1 Entzündung | 4 |
| 2.1.1 Pathophysiologie der chronischen Entzündung | 4 |
| 2.1.2 Protein-Biomarker pulmonaler Krankheiten | 5 |
| 2.2 Immunoassays | 6 |
| 2.2.1 Struktur von Antikörpern | 6 |
| 2.2.2 Immunoassay-Formate | 7 |
| 2.2.3 Immobilisierung von Proteinen | 9 |
| 2.3 Biosensoren | 10 |
| 2.3.1 Transduktionsprinzipien | 11 |
| 2.3.2 Mikro- und Nanomaterialien | 12 |
| 2.4 Kenngrößen bioanalytischer Methoden | 14 |
| 2.5 Elektrochemie | 17 |
| 2.5.1 Zyklovoltammetrie | 19 |
| 2.5.2 Amperometrie | 20 |
| 2.5.3 Einflussfaktoren elektrochemischer Reaktionen | 21 |
| 2.6 Fließinjektionsanalyse | 22 |
| 3 Stand der Technik | 24 |
| 3.1 Standardmethoden zur Detektion von Zytokinen | 24 |
| 3.2 Elektrochemische Immunosensoren zur Detektion von Zytokinen | 25 |
| 3.3 Temperierte elektrochemische Sensoren und Systeme | 28 |
| 3.4 Defizite hinsichtlich einer Anwendung | 29 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4 | Das Sensorprinzip im Detail | 33 |
| 5 | Methoden der Sensorentwicklung | 36 |
| 5.1 | Durchführung eines optischen ELISA | 36 |
| 5.2 | Charakterisierung der Elektroden mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) | 37 |
| 5.3 | Präparation der Immunosensoren | 38 |
| 5.3.1 | Kovalente Anbindung der Fängerantikörper an <i>Single-Walled Carbon Nanotubes</i> (SWCNT)-Elektroden | 38 |
| 5.3.2 | Kovalente Anbindung der Fängerantikörper an Magnetpartikel | 39 |
| 5.4 | Überprüfung der kovalenten Anbindung der Fängerantikörper | 40 |
| 5.4.1 | Überprüfung der kovalenten Anbindung an SWCNT-Elektroden | 40 |
| 5.4.2 | Überprüfung der kovalenten Anbindung an Magnetpartikel | 41 |
| 5.5 | Immunologische Nachweisreaktion | 41 |
| 5.5.1 | Immunologische Nachweisreaktion auf SWCNT-Elektroden | 42 |
| 5.5.2 | Immunologische Nachweisreaktion auf Magnetpartikeln | 42 |
| 5.6 | Elektrochemische Charakterisierung der Immunosensoren | 43 |
| 5.6.1 | Zyklovoltammetrie | 43 |
| 5.6.2 | Amperometrie | 44 |
| 6 | Ergebnisse und Diskussion der Sensorentwicklung | 46 |
| 6.1 | Systematische Bewertung verschiedener Sensorkonzepte | 46 |
| 6.1.1 | Arbeitspotential und Wasserstoffperoxid-Konzentration | 47 |
| 6.1.2 | Konzeptbewertung und Konzeptauswahl | 50 |
| 6.2 | Optimierung des IL-13-Immunsensors | 54 |
| 6.2.1 | Untersuchung der analytunabhängigen Sensorantwort | 55 |
| 6.2.2 | Verwendung von Streptavidin-HRP als Ausleseemolekül | 57 |
| 6.2.3 | Optimierung der Antikörper-Konzentrationen | 59 |
| 6.3 | Charakterisierung der Elektrodenoberfläche mittels REM | 61 |
| 6.4 | Charakterisierung des IL-13-Immunsensors | 62 |
| 6.5 | Entwicklung eines Immunsensors zum Nachweis von $\text{TNF } \alpha$ | 66 |
| 6.6 | Charakterisierung des $\text{TNF } \alpha$ -Immunsensors | 67 |
| 6.7 | Zusammenfassung der Sensorentwicklung | 70 |
| 7 | Methoden der Systementwicklung | 73 |
| 7.1 | Bestimmung der Strömungsparameter des Fließsystems | 73 |
| 7.2 | Elektrochemische Charakterisierung der Immunosensoren im Fließsystem | 74 |
| 7.3 | Untersuchung von Querempfindlichkeiten der Immunosensoren | 75 |
| 7.3.1 | Bestimmung des Einflusses der Temperatur auf die Immunosensoren | 75 |
| 7.3.2 | Bestimmung der Selektivität der Immunosensoren | 76 |

| | | |
|----------------------------------|--|------------|
| 7.3.3 | Untersuchung der Kreuzreaktivität der Immunosensoren | 78 |
| 8 | Ergebnisse und Diskussion der Systementwicklung | 79 |
| 8.1 | Design und Aufbau eines Fließsystems | 79 |
| 8.2 | Ermittlung der optimalen Strömungsparameter | 81 |
| 8.3 | Vergleichende Sensorcharakterisierung im Fließsystem und im Becherglas | 84 |
| 8.4 | Untersuchung des Temperatureinflusses auf das Sensorsignal | 86 |
| 8.4.1 | Bestimmung des Temperaturoptimums des IL-13-Immunosensors | 86 |
| 8.4.2 | Sensorcharakterisierung bei verschiedenen Temperaturen | 88 |
| 8.5 | Untersuchung weiterer Querempfindlichkeiten | 90 |
| 8.5.1 | Selektivitätsstudie des IL-13-Immunosensors | 90 |
| 8.5.2 | Ermittlung der Kreuzreaktivität der Immunosensoren | 93 |
| 8.6 | Zusammenfassung der Systementwicklung | 94 |
| 9 | Fazit und Ausblick | 96 |
| Anhang | | 99 |
| A.1 | Chemikalien und Biochemikalien | 100 |
| A.2 | Puffer und Lösungen | 101 |
| A.3 | Geräte und Verbrauchsmaterialien | 102 |
| A.4 | Technische Zeichnungen | 104 |
| A.5 | Weitere experimentelle Ergebnisse | 108 |
| Literaturverzeichnis | | 112 |
| Eigene Veröffentlichungen | | 125 |