



Frieder W. Scheller, Florian Schubert, Frank F. Bier

Vom Biosensor zur Nanobiotechnologie

(Vortrag in der gemeinsamen Sitzung der mathematisch-naturwissenschaftlichen, der biowissenschaftlich-medizinischen und der technikwissenschaftlichen Klasse am 16. Dezember 1994; Vortragender: Frieder W. Scheller)

In: Berichte und Abhandlungen / Berlin-Brandenburgische Akademie der Wissenschaften (vormals Preußische Akademie der Wissenschaften) ; 1.1995, S. 103-118

Persistent Identifier: [urn:nbn:de:kobv:b4-opus-28507](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:b4-opus-28507)

Die vorliegende Datei wird Ihnen von der Berlin-Brandenburgischen Akademie der Wissenschaften unter einer Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Germany (cc by-nc-sa 3.0) Licence zur Verfügung gestellt.



Frieder W. Scheller, Florian Schubert, Frank F. Bier

Vom Biosensor zur Nanobiotechnologie

(Vortrag in der gemeinsamen Sitzung der mathematisch-naturwissenschaftlichen, der biowissenschaftlich-medizinischen und der technikwissenschaftlichen Klasse am 16. Dezember 1994; Vortragender: Frieder W. Scheller)

1. Erkennung und Signaltransfer in Zellen und in Biosensoren

Lebewesen stehen über ihre Sinnesorgane in spezifischer Wechselwirkung mit der Umwelt und können damit auf Veränderungen des eigenen Stoffwechsels oder der Umwelt optimal reagieren. Diese Sinnesorgane zeichnen sich durch eine hohe Empfindlichkeit, die Fähigkeit der Wahrnehmung kleiner Änderungen des Signalpegels und eine hohe chemische Selektivität aus.

Bei der Signalerfassung erfolgt eine enge Wechselwirkung des Signals mit einer sensitiven Struktur, die sich auf komplex aufgebauten Systemen von Biomakromolekülen befindet. In der Regel tritt bei Biomakromolekülen ein begrenzter Abschnitt mit dem „chemischen Signal“ (Reaktionspartner) in Wechselwirkung. Dieses Reaktionsareal besitzt eine spezifische räumliche Anordnung unterschiedlicher Molekülbausteine und damit eine charakteristische Ladungsverteilung, so daß sich komplementäre Partner mit hoher Affinität binden können. Solche selektiv reagierenden Gebiete in molekularen und supramolekularen biologischen Strukturen werden als Rezeptoren (Rezeptorareale, Bindungsstellen) bezeichnet. Einfach gebaute Substanzen mit einem niedrigen Molekulargewicht werden relativ unspezifisch gebunden, während bei Stoffen mit 10 bis 20 Kohlenstoffatomen bereits eine hohe Spezifität bei der Bindung an den Rezeptor auftritt. Daraus wurde geschlossen, daß die Ausdehnung der Rezeptorareale, z. B. für Acetylcholin, Noradrenalin oder Dopamin, in der Größenordnung von 10 nm^2 liegt.

Die Bindung eines Wirkstoffes an das Rezeptorareal bedingt zunächst lokale Verschiebungen in der Elektronendichte, die sich auf weitere Gebiete des Gesamtmoleküls sowie benachbarte Membranbezirke auswirken und zu Umorientierungen (Konformationsänderungen) führen. Es erfolgt somit eine Signaltransformation und Signalweiterleitung auf Strukturen, deren Aktivierung den biologischen Effekt auslöst, z. B. Muskelkontraktion, die Nervenerregung und die Steuerung

enzymatischer Aktivitäten. Mit der Dissoziation des Wirkstoff-Rezeptor-Komplexes kehrt das Gesamtsystem unter Energieverbrauch in seinen Ausgangszustand zurück.

Die Rezeptoren von Wirkstoffen, wie Hormonen und Pharmaka, sind meist auf Zellmembranen lokalisiert, wobei das chemische Signal in das Zellinnere übertragen wird. Durch Bindung des Wirkstoffes als „*first messenger*“ wird die Aktivität eines dem Rezeptor räumlich benachbarten Enzyms (z. B. Adenylatcyclase) gesteigert, so daß der intrazelluläre Spiegel dessen Produktes (z. B. zyklisches AMP) ansteigt. Dieser „*second messenger*“ stimuliert weitere Enzyme; so werden sie über spezifische Proteinkinasen phosphoryliert und damit in ihrer Funktion verändert, so daß ein entsprechender Wirkungseffekt zustande kommt. Die Überträger der Nervenerregung, die sogenannten Neurotransmitter, treten ebenfalls mit zellmembranständigen Rezeptoren in Wechselwirkung. Hier wird die Effektivierung dadurch ausgelöst, daß die Rezeptoren zu Untereinheiten von Ionenkanälen gehören oder eng mit Ionenkanälen gekoppelt sind, die durch Konformationsänderungen für Ionen permeabel werden. Dadurch bricht die Ladungstrennung durch die Membran zusammen, oder sie wird zeitlich verstärkt.

Enzyme sind eine große Klasse von Biomakromolekülen. Viele Pharmaka und Gifte verändern ihre katalytische Aktivität. Antikörper werden als ein Teil des Immunabwehrsystems von Wirbeltieren bei Anwesenheit von körperfremden Stoffen (Antigenen) gebildet. Die häufigsten Immunglobuline sind zuckerhaltige Proteine mit einem Molekulargewicht um 160.000. Die Variabilität von Antikörpern in einem Organismus liegt bei 10^8 bis 10^{10} unterschiedlicher Spezies (Alberts et al., 1986).

Die ausgezeichnete chemische Selektivität von Enzymen, Antikörpern und Wirkstoffrezeptoren, ihre hohe Affinität zu den Reaktionspartnern und die Fähigkeit, unter milden physikalischen und chemischen Bedingungen zu wirken, machen diese Biomakromoleküle zu vielseitigen analytischen Werkzeugen für all jene Bereiche, in denen empfindliche, spezifische und genaue quantitative Bestimmungen von Substanzen erforderlich sind.

Die hochempfindliche Bestimmung einer Vielzahl von Stoffen besitzt sowohl für die Forschung als auch für die Produktionsüberwachung in der chemischen, mikrobiologischen und Lebensmittelindustrie, für den Umweltschutz sowie im Gesundheitswesen für die Erkennung und Behandlung von Erkrankungen große Bedeutung. Deshalb stellen diese Biomoleküle eine interessante Alternative für die bisher in der Analytik üblichen chemischen Reagenzien dar. Der Einsatz von Biomolekülen in der Analytik erfordert hohe Reinheit sowie ausreichende Aktivität und Stabilität dieser Präparate, so daß sie wesentlich zu den Reagenzienkosten beitragen. Einem Trend in der Biotechnologie folgend, gewinnt deshalb der Einsatz immobilisierter, d. h. trägerfixierter Biomakromoleküle auch in der Analytik wachsende Bedeutung. Koppelt man die immobilisierten und damit wieder-

verwendbaren Biomakromoleküle mit physikochemischen Signalübertragungsbausteinen (Transduktoren), so erhält man eine neue Generation von analytischen Instrumenten, die *Biosensoren*.

Grundprinzipien von Biosensoren

Bereits 1956 wurde das Prinzip des Enzymteststreifens durch Imprägnierung von Filterpapier mit einer reagenzienhaltigen Enzymlösung entwickelt. Solche Teststreifen reduzieren die Analyse auf das Auftropfen und gegebenenfalls Abwischen der Probe sowie die visuelle oder photometrische Auswertung. Parallel dazu entwickelte man analytische Enzymreaktoren, in denen Biomoleküle entweder an der Innenwand von Schläuchen oder an porösen Trägern in Reaktoren eingesetzt werden. Bei beiden Varianten sind die Komponenten des Meßvorgangs räumlich getrennt (Abb. 1).

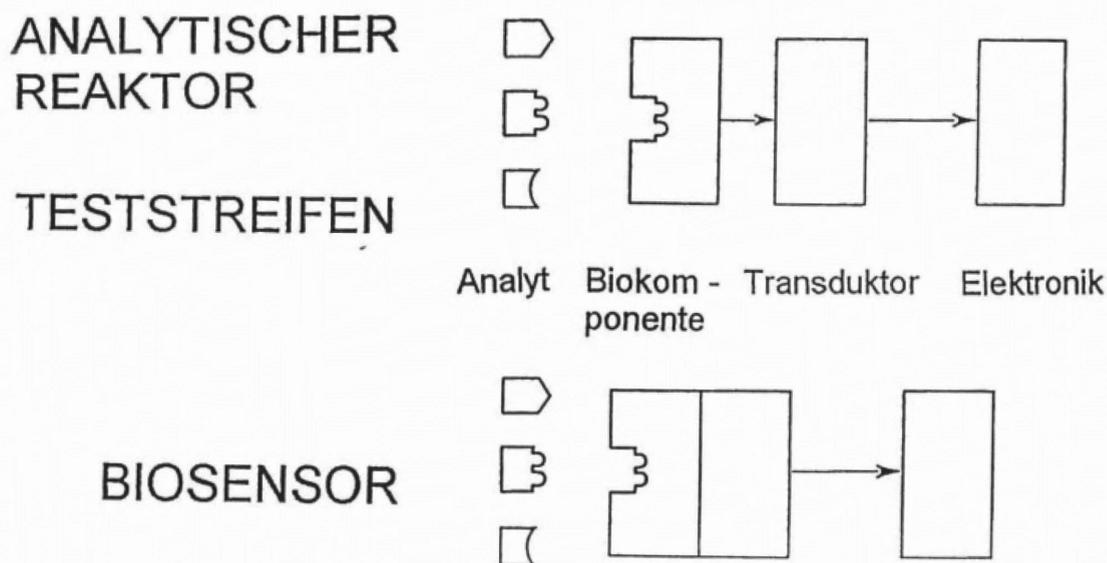


Abb. 1

Ein anderes grundlegendes Prinzip in der analytischen Anwendung immobilisierter Enzyme realisierten Clark und Lyons 1962 in den USA. Sie verwendeten eine Sauerstoffelektrode, die zum Schutz vor Störsubstanzen mit einer Membran bedeckt war, und schlossen vor ihr die Enzymlösung mit einer halbdurchlässigen Folie ein. Diese direkte Integration von Enzym mit dem Meßfühler in einer „Enzymelektrode“ erlaubt die Wiederverwendung der Enzyme und stellte die Geburt des Biosensors dar. Biosensoren basieren auf der direkten räumlichen Kopplung einer immobilisierten biologisch aktiven Substanz mit einem Signalumwandler und einem elektronischen Verstärker (Abb. 1). In den Biosensoren laufen nacheinander folgende Prozesse ab:

1. Erkennung der Meßsubstanz (Analyt),
2. Umwandlung der physikochemischen Veränderung, die bei der Wechselwirkung mit dem Analyten entsteht, in ein elektrisches Signal,
3. elektronische Signalverstärkung.

Eine ähnliche Schrittfolge wird in biotischen Rezeptoren auf der Grundlage sehr komplexer Biomoleküle und Membranen realisiert.

In Analogie zur Affinitätschromatographie, die auf der spezifischen Bindungsfähigkeit biologischer Moleküle beruht, wurden sogenannte *Affinitätssensoren* entwickelt. Dabei werden Farbstoffe, zuckerbindende Proteine (Lektine), Antikörper oder Hormonrezeptoren in immobilisierter Form für die molekulare Erkennung von Enzymen, Glycoproteinen, Antigenen oder Hormonen benutzt (Tab. 1).

Tab. 1: Signalübertragung in Biosensoren

Biokomponente	Analyt	Reaktions- Effekt	Produkt	Transduktor
Enzym		ΔE ΔH		Photometer Thermistor
Enzym	Substrat		O_2, H_2O_2	Elektrode/ amperom.
Zelle	Inhibitor	ΔU	H^+, CO_2, NH_3	Elektrode/ potentiom.
Rezeptoren	Agonist/ Antagonist		Dielektrizitätskonstante	Elektrode – konduktom. – kapazitiv
Antikörper	Antikörper/ Antigen	Δm Δn		Schwingquarz Interferometer Refraktometer Fluorimeter
			Fluoreszenzlabel	
Nukleinsäure	DNA/RNA	Δn		Interferometer Refraktometer Fluorimeter
			Fluoreszenzlabel	

Δ = Änderung in: E Extinktion, H Enthalpie, U Potential, m Masse, n Brechungsindex

Tatsächlich besteht eine große Ähnlichkeit in den Grundprinzipien von Affinitätschromatographie und Affinitätssensoren. Die molekulare Erkennung des Analyten erfolgt durch einen immobilisierten, paßfähigen (komplementären) Stoff der „stationären Phase“, den Liganden. Nach dem Meßvorgang muß der Ausgangszustand durch Spaltung des Analyt-Ligand-Komplexes regeneriert werden, wobei der pH-Wert, die Ionenkonzentration oder die Dielektrizitätskonstante der „mobilen Phase“ definiert verändert werden. Irreversible Strukturänderungen im Auswaschprozeß führen zu einem Verlust an Spezifität.

Die bei der Komplexbildung eintretende physikochemische Veränderung, z. B. der Schichtdicke, des Brechungsindex, der Lichtabsorption oder der Ladungsverteilung, kann mit optoelektronischen Sensoren, potentiometrischen Elektroden oder Feldeffekttransistoren angezeigt werden (Tab. 1).

Bindet jedoch ein Substrat an das entsprechende Enzym, dann wird das Substrat im Kräftefeld der katalytischen Bindungsstelle des Enzyms chemisch verändert. Die entstehenden Umsetzungsprodukte (Metabolite) werden anschließend freigesetzt. Deshalb ist auch in Biosensoren die molekulare Erkennung von Substraten durch Enzyme mit der chemischen Umsetzung zu den entsprechenden Produkten verbunden. Dieser Typ erhielt die Bezeichnung *katalytischer Sensor*. Hier erfolgt die Regenerierung des Ausgangszustandes als Ergebnis der Umsetzung des Analyten. Die kontinuierliche Analytanzeige ist möglich, da im nutzbaren Meßbereich die Geschwindigkeit der Enzymreaktion (mit einer kurzen Zeitverzögerung) der Analytkonzentration folgt.

Wiederum in Analogie zu biologischen Systemen werden jedoch in katalytischen Sensoren nicht nur isolierte, aufgereinigte Enzyme als Rezeptorkomponente eingesetzt. Bereits ein Jahrzehnt nach der Erfindung der Enzymelektrode wurden intakte mikrobielle Zellen zur Erkennung und biochemischen Umsetzung des Analyten in einem der Enzymelektrode analogen Sensor verwendet. Damit begann eine intensive Suche nach weiteren in Biosensoren anwendbaren Materialien, in denen die biokatalytisch wirksamen Komponenten in ihre native Umgebung integriert sind. So sind heute neben mikrobiellen Sensoren auch solche mit subzellulären Organellen und mit Gewebeschnitten bekannt (Scheller & Schubert, 1992).

2. Fixierung der Biokomponente

Die Immobilisierung von Enzymen und Antikörpern erfolgt sowohl für Biosensoren, Immunoassays als auch für Teststreifen durch physikalische und chemische Methoden sowie ihre Kombination. Zu den physikalischen Methoden gehören die Adsorption an Trägern, z. B. von Antikörpern, und die Einbettung von Enzymen in wasserunlösliche Gele und organische Polymere. Die Immobilisierung der Eiweiße auf chemischem Wege erfolgt durch kovalente Kopplung auf der aktivierten Sensoroberfläche oder durch intermolekulare Vernetzung der Biomoleküle auf dem Sensor. Durch Einbettung in polymere Substanzen mit definierten Poren können die Enzyme daran gehindert werden, aus dem Reaktionsraum herauszudiffundieren, während die kleinen Substrat- und Produktmoleküle dagegen leicht permeieren. Da der Geleinschluß relativ schonend erfolgt, hat diese Methode eine breite Anwendung für Enzymsensoren gefunden. Häufig benutzte Matrices sind Alginat, Gelatine bzw. Kollagen, Zellulosetriacetat, Polyacrylamid, Silicone, Poly-

vinylalkohol, Polyvinylbutyrat und Präpolymere, die durch Lichteinwirkung vernetzt werden.

Um Enzyme oder Antikörper kovalent an Träger zu koppeln, wird das Protein über bifunktionelle Reagenzien an reaktive Gruppen auf der Sensoroberfläche „angeheftet“. Chemisch reaktive Angriffspunkte eines Proteins sind Aminogruppen, Carboxylgruppen, der Phenolrest des Thyrosins, Sulfhydrylgruppen und die Imidazolgruppe des Histidins. Direkt auf Sensoroberflächen können fest haftende Schichten mit funktionellen Anker- bzw. Kopfgruppen durch Elektropolymerisation, Abscheiden von Plasmapolymere, Adsorption von Thioaminosäure oder Thiolipiden oder vernetzenden Silanen erzeugt werden. Speziell bei amperometrischen oder konduktometrischen Enzymsensoren bietet der Enzymeinschluß durch Elektropolymerisation von Pyrrol oder Anilin eine elegante Möglichkeit für eine Fixierung auf dem gewünschten Elektrodengebiet (Hall, 1991).

Bei Enzymelektroden wird der Analyt von einem großen Ensemble von Enzymmolekülen umgesetzt und das Signal durch die Wanderung eines Reaktionspartners zur Grenzfläche des Transduktors übertragen. Dabei spielt die Orientierung der Enzymmoleküle keine wichtige Rolle, sondern eine hohe spezifische Aktivität und Permeabilität der Biokatalysatorschicht sichert die erforderliche Sensorcharakteristik.

Für Antikörper hingegen ist die Ausrichtung von Bedeutung. Da die Bindung des Antigens an der „variablen“ Region (am Fab-Teil) der Antikörper erfolgt, ist es für eine effektive Bindung günstig, wenn die Bindungsstellen frei zugänglich sind, d.h. die Moleküle am entgegengesetzten Ende fixiert werden. Trotzdem reicht die (spontane) physikalische Adsorption für die etablierten Immunoassays aus, da die mangelnde Orientierung durch eine große Zahl von Antikörpern ausgeglichen wird. Bei den in der Regel kleinen Sensorflächen sind allerdings die Verluste an Bindungskapazität bei adsorptiver Kopplung für sensitive Nachweise zu groß. Die gewünschte Orientierung der Antikörper kann durch eine „Zwischenschicht“ von Protein A oder Protein G erreicht werden, da diese Moleküle an den Fc-Teil der Antikörper binden (Eliason et al., 1988). Bei der Kopplung von intakten Zellen, z.B. Neuronen (Fromherz et al., 1991) oder Mikroorganismen (Owicki & Parce, 1990), mit potential- oder pH-sensitiven Bauelementen ist der direkte und reproduzierbare Kontakt zwischen Zelle und Sensoroberfläche für die Qualität des Meßsignals entscheidend.

Bei Rezeptoren ist die Orientierung der „biologischen Maschine“ für die Funktion erforderlich. Deshalb ist die Verwendung von Membranfragmenten die einfachste Möglichkeit. In der Literatur finden sich verschiedene methodische Ansätze, um Rezeptoren in orientierten Lipidschichten auf die Transduktoroberfläche aufzubringen. Hier ist die Messung einzelner molekularer Ereignisse, z.B. das Öffnen eines Ionenkanals, technisch möglich (Schmidt et al., 1992).

3. Gerichteter Ladungstransfer als Analogon zur Atmungskette

Redoxreaktionen spielen in der belebten Natur eine Schlüsselrolle. Sie bilden eine Voraussetzung für die Existenz von Leben. Durch die Spezifität der Wechselwirkung der Reaktionspartner wird es möglich, daß Verbindungen mit großem Unterschied in der Freien Enthalpie innerhalb eines Kompartiments nebeneinander existieren, ohne daß es zu einem chemischen „Kurzschluß“ kommt. Beispiele sind die Reduktionsmittel Glucose, NADH oder Cytochrom c in Gegenwart von Sauerstoff.

Während in biologischen Signalketten die Grenzen von Kompartimenten meist durch „membranüberspannende“ Rezeptoren in gerichteter Weise überwunden werden, erfolgt die Übertragung des chemischen Signals im Enzymsensor durch niedermolekulare diffusible Reaktionspartner, die entsprechend der Konzentrationsgradienten wandern. Dadurch geht der Hauptteil des chemischen Signals für die Anzeige verloren, und durch die Erfassung von unspezifischen Signalen am Transduktor wird die hohe Spezifität des Erkennungsschritts wieder teilweise ausgelöscht.

Deshalb gibt es verschiedene Ansätze, den direkten Signaltransfer vom Enzym, das den Analyten erkennt, zum Transduktor (die Redoxelektrode) zu realisieren.

Bei der Mehrzahl der substratumsetzenden Oxidoreduktasen befinden sich die redoxaktiven Gruppen im Innern des Moleküls (z. B. bei den Oxidasen für Glucose, Lactat u. a.). Daher ist die direkte Kommunikation mit der Redoxelektrode nicht möglich. Dagegen besitzen „extrinsische“ Redoxenzyme, z. B. die PQQ-enthaltenden Dehydrogenasen für Glycolat, Fructose und Methylamin, für den heterogenen Elektronentransfer zugängliche Gruppen, so daß „biokatalytische“ Ströme bei Zugabe des Substrates auftreten (Ikeda, 1991). Auch für Laccase und Peroxidase wurde der direkte Elektronentransfer postuliert, neuere Untersuchungen deuten aber auf die Beteiligung von „Mediatorgruppen“ auf der Elektrodenoberfläche hin (Gorton, 1992).

In den siebziger Jahren wurden in Berlin-Buch Pionierarbeiten auf dem Gebiet der Protein-Elektrochemie durchgeführt (Scheller & Schubert, 1992). Der heterogene Elektronentransfer an Quecksilberelektroden wurde bei Cytochrom c, aber auch bei Glucoseoxidase nachgewiesen und analysiert. Der damals vorgeschlagene Mechanismus des heterogenen Elektronentransfers wird auch heute noch zur Interpretation benutzt.

Um die Redoxäquivalente auch bei elektrodeninaktiven Oxidoreduktasen ohne die Beteiligung löslicher Reaktionspartner gerichtet auf die Elektroden zu übertragen, wurden die üblichen Mediatoren entweder als „*electron transfer relays*“ kovalent an das Enzymprotein (Degani & Heller, 1987) oder über bewegliche Spacer von „Redoxpolymeren“ an der Sensoroberfläche fixiert (molekulare Dräh-

te). Mit diesen Prinzipien gelang es, eine hohe Effektivität der Elektronenübertragung (2 mA/cm^2) zu erzielen, aber die spontane (Neben-)Reaktion der fixierten Mediatormoleküle mit anderen Probestandteilen führt zu Störsignalen.

Für verschiedene Oxidoreduktasen, z. B. die Oxidasen von Sulfit, Sulfat, Nitrat, Lactat, aber auch die Elektronentransportketten in der Atmungskette und der Photosynthese, kann die Elektronenübertragung zur Redoxelektrode durch lösliches Cytochrom c erfolgen. Dabei zeichnet sich die Redoxreaktion durch eine hohe Selektivität aus (*vectorial mediator*) (Armstrong, 1990).

Kürzlich ist es gelungen, durch orientierte Fixierung von Cytochrom c bzw. Ferredoxin an Goldelektroden einen effektiven heterogenen Elektronentransfer in Abwesenheit von Mediatoren zu erzielen (McNeil et al., 1992). Ob durch leitfähige Polymere, z. B. Polypyrrol, Polythiophen oder Polyanilin, der heterogene Elektronentransfer bei Enzymen mit hinreichender Effizienz realisiert werden kann, ist noch offen. Möglicherweise ist eine „Dotierung“ mit Mediatormolekülen erforderlich.

4. *Gekoppelte Enzymreaktionen in Sensoren – Prinzipien des Stoffwechsels*

Die Kopplung unterschiedlicher Aktivitäten nach verschiedenen Grundmustern bildet die Basis für Sensoren mit interner Signalverarbeitung (Wollenberger et al., 1993).

Sequenz und Konkurrenz

Die Cosubstrate und Produkte vieler enzymatischer Reaktionen sind mit den vorhandenen Transduktoren nicht nachweisbar, da sie z. B. nicht elektrochemisch aktiv sind. Dadurch wird die Zahl der mit Monoenzymensensoren bestimmbar Substanzen erheblich eingeschränkt. Zur Bildung elektrochemisch aktiver Verbindungen müssen zusätzliche Enzyme nacheinander (sequentiell) an die Umsetzung des Analyten gekoppelt werden.

Enzymsequenzelektroden sind für Cholesterolester, Fettsäuren, Amide sowie Mehrfachzucker bekannt. Ein allgemeines Problem von Enzymsequenzen in Biosensoren ist die unterschiedliche Empfindlichkeit für die Substrate der einzelnen Enzyme, wie z. B. für Lactose und Glucose, die beide mit einer Sequenzelektrode bestimmbar sind. Dies ist von Nachteil, wenn die Summe der Substrate bestimmt werden soll. Bei vollständigem Umsatz in der Enzymmembran und übereinstimmenden Diffusionsgeschwindigkeiten aller Substrate ist jedoch eine derartige Summation möglich. Auf diese Weise wurde das für die Diagnostik bedeutsame Verhältnis der Metaboliten Lactat und Pyruvat mit einer Bienzymelektrode

quantifizierbar. Betrachtet man diesen Sequenzsensor, so wird deutlich, daß das Signal eine additive Verknüpfung von zwei Substratkonzentrationen darstellt (Abb. 2).

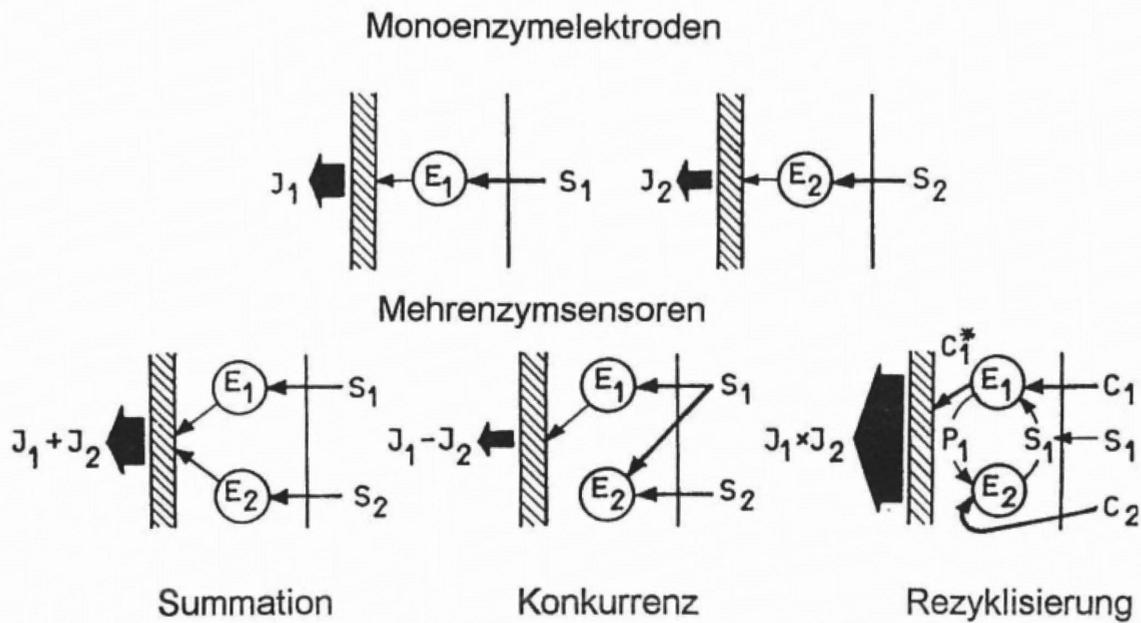


Abb. 2

Die cofaktorabhängige Konkurrenz zweier Enzyme um ein und dasselbe Substrat in Enzymkonkurrenzsensoren wird für die Cofaktoren Adenosintriphosphat (ATP) und Nicotinamidadenindinucleotid (NAD^+) genutzt. Hierbei wird Glucoseoxidase mit Enzymen coimmobilisiert, welche die Umsetzung dieser Cofaktoren unter Glucoseverbrauch katalysieren. Liegt nur Glucose in der Meßlösung vor, so wird sie allein durch Glucoseoxidase unter Bildung eines entsprechenden Meßsignals oxidiert. Der Zusatz von ATP bzw. NAD^+ startet die jeweilige Konkurrenzreaktion, in der nunmehr ein Teil der Glucose verbraucht wird. Die Folge ist eine von der Cofaktorkonzentration abhängige Veränderung des Signals. Das Signal einer solchen Konkurrenzelektrode entspricht der Differenz der Signale eines Enzymsensors für das gemeinsame Substrat und eines Sensors für den Cofaktor.

Das Antiinterferenzprinzip

Mit steigender Komplexität leiden Biosensoren zunehmend unter einer Verringerung ihrer Selektivität, weil die Substrate jeder einzelnen Reaktion Signale hervorrufen. Weiterhin unterliegen Biosensoren ganz allgemein Störungen durch Probenbestandteile, die entweder bereits auf der Ebene der molekularen Erkennung und chemischen Umsetzung oder am Transduktor selbst angreifen. Um solche interferierenden Substanzen noch vor der Anzeige auszuschalten, wurden enzymatische Antiinterferenzmembranen entwickelt, die in den Sensor integriert werden.

Während bei der Bestimmung der Blutglucose der Einfluß von Störsubstanzen nur innerhalb der Streubreite der Meßwerte liegt, treten bei Messungen im Urin und in zahlreichen Fermentationsmedien erhebliche Verfälschungen auf. Ursache dafür ist die hohe Konzentration von Substanzen, z. B. Harnsäure oder Vitamin C, die durch die Membran gelangen und an der Elektrode nicht vom Reaktionsprodukt der Glucoseoxidation unterschieden werden können. Durch Einbringen von zwei Enzymen in eine Membran gelang es, sowohl die Glucose spezifisch durch Glucoseoxidase umzuwandeln und damit meßbar zu machen, als auch die Störsubstanzen mit Hilfe von Laccase zu nichtstörenden Produkten umzusetzen.

Enzymatische Analytzyklen

Die untere Bestimmungsgrenze der konventionellen Enzymelektroden liegt bei etwa 10^{-6} mol/l. In Anbetracht der Notwendigkeit, die Probe zu verdünnen und eventuell präanalytisch zu behandeln, bedeutet dies, daß für Hormone, Pharmaka, Spurenwirkstoffe und einige Metabolite die Empfindlichkeit der Sensoren nicht ausreicht. Hier hilft ein weiteres Kopplungsprinzip, mit dem es gelingt, die Empfindlichkeit um ein Vielfaches zu steigern. Dabei werden zwei Enzyme eingesetzt, die eine Rezyklisierung des Analyten bewirken (Abb. 2). Der Analyt wird durch das erste Enzym E_1 in ein Produkt P umgewandelt, das seinerseits Substrat für das zweite Enzym E_2 ist. Dieses katalysiert die Neubildung des zu bestimmenden Substrats S, welches wiederum für das erste Enzym verfügbar ist, usw. Auf diese Weise wird die durch die Diffusion gesetzte Empfindlichkeitsschranke des Biosensors durchbrochen. An mindestens einer der beiden Reaktionen des Zyklus muß eine transduktoraktive Substanz beteiligt sein. Ihre Änderung wird infolge der enzymatischen Amplifikation viel größer als im Fall der einfachen Umsetzung des Analyten. Mit solchen Sensoren werden Bestimmungsgrenzen von 10^{-10} mol/l unterschritten.

5. Anwendung von Biosensoren in Forschung und Routine

In den letzten 10 Jahren hat sich die Biosensorik zu einem prominenten Forschungsgebiet entwickelt mit jährlich mehr als 800 Publikationen und 200 Patentanmeldungen. Der Marktumfang beträgt gegenwärtig etwa 1 Mrd. US-\$, wobei zweistellige Steigerungsraten das starke Wachstum belegen.

Im Gesundheitswesen beziehen sich die meisten Bestimmungen auf Stoffwechselprodukte im Blut oder im Urin, die im mikro- oder millimolaren Konzentrationsbereich vorliegen. Für ein besseres Verständnis von vielen Krankheitszuständen ist die Bestimmung von Steroiden, Pharmaka und deren Produkten, Hormonen sowie Proteinfaktoren erforderlich. Sofortbestimmungen oder kontinuierliche *in*

vivo-Nachweise solcher Substanzen sind besonders wichtig, wenn kurzfristig Entscheidungen über die Arzneimitteldosierung zu treffen sind, z. B. in lebensbedrohlichen Situationen und bei Operationen.

Meßplätze und Laboranalytoren

In der Anfangsphase wurden die Biosensoren ausschließlich in Labor-Meßplätzen eingesetzt. Diese Epoche begann Ende der siebziger Jahre mit der Kommerzialisierung des Glucose-Analysators der US-Firma Yellow Springs, die L. C. Clarks Patent nutzte. Kurz danach brachten die Akademie der Wissenschaften, Berlin, und Fuji Electric Corp. Japan Laboranalytoren für die Bestimmung von Glucose auf den Markt. Bei dieser Gerätegeneration befindet sich das Enzym innerhalb einer Doppelmembran. Die Messung erfolgt nach interner Probenverdünnung und erfordert etwa 60 bis 90 sec. Mit einer Enzymmembran können typischerweise 800 Messungen durchgeführt werden. Durch Verwendung der entsprechenden Enzyme – Lactatoxidase bzw. Uricase – konnten diese Analytoren auf die Analyse von Lactat und Harnsäure erweitert werden. Diese Meßplätze sind wegen der manuellen Probenzuführung vor allem für kleine Laboratorien geeignet.

Durch die Integration der Enzymelektrode in eine Durchflußzelle gelang es der Prüfgeräte Werk Medingen GmbH und der Firma Eppendorf/Hamburg, die Meßfrequenz auf 180/h zu steigern. Durch die optimierte Präanalytik sind diese Analytoren auf mittlere bis große Laboratorien zugeschnitten.

Patientenselbstkontrolle

Mit dem Exac Tech ist der Firma MediSense/USA ein Einbruch in die Phalanx der Glucose-Teststreifen gelungen. Das Füllfederhalter- und neuerdings das Scheckkarten-Format des Meßgerätes mit einer großflächigen Meßwertanzeige haben zu einer hohen Akzeptanz bei den Nutzern geführt. Das aus Japan stammende Glucometer ELITE benutzt ebenfalls die elektrochemische Anzeige der enzymkatalysierten Glucoseumsetzung. Hier erfolgt aber das „Dosieren“ durch die Kapillarkapillare Wirkung der 4 µl großen Reaktionskammer, wodurch die Handhabung einfacher und sicherer wird.

„On-line“ Messung mit implantierbaren Biosensoren

Die Miniaturisierung des Sensorkörpers ist vor allem für den „*in vivo*“-Einsatz implantierbarer Biosensoren eine Voraussetzung. Mit Kohlefasern können Enzymsensoren mit einem Durchmesser von wenigen µm präpariert werden. Diese ultradünnen Nadeln werden durch Katheter in die Unterhaut, die Muskulatur, aber auch in das Gehirn von Versuchstieren und Menschen ohne wesentliche Beeinflussung eingeführt. Sie erlauben dann eine Echtzeitmessung solcher Schlüsselsubstanzen wie Glucose, Milchsäure (Lactat), von Hormonen (z. B. Adrenalin) oder Signalüberträger von Nervenzellen (z. B. Glutamat).

Zugang zu neuen Dimensionen durch neue Technologien

Während für die Bestimmung niedermolekularer Analyte, z. B. von Zuckern, Aminosäuren, Fetten, Vitaminen, organischen Säuren und auch von verschiedenen Metallionen, die elektrochemischen Enzymsensoren (Enzymelektroden) dominieren, wurde für die Messung hochmolekularer Substanzen mit der Entwicklung optischer Immunosensoren ein technologischer Durchbruch erreicht. Insbesondere biochemische und molekularbiologisch interessante Wechselwirkungen hochmolekularer Reaktionspartner, aber auch von Viren und Mikroorganismen können so in Echtzeit untersucht werden. Auf dem Markt sind heute drei Geräte dieser Art. Lichtwellenleitertechnik nutzen das GKS 1 der Firma Artificial Sensing Instruments (ASI, Zürich, Schweiz), das mit Gitterkopplern arbeitet, und das IAsys der Firma Fisons Applied Sensor Technology (Cambridge, Großbritannien). Am weitesten fortgeschritten sind Untersuchungen zur Oberflächenplasmonenresonanz, was auch seinen Niederschlag in den verschiedenen Gerätetypen der Firma Pharmacia (Uppsala, Schweden) findet (BIAcore, BIAcore2000, BIAlite).

Prozeßkontrolle in der Biotechnologie und im Umweltschutz

Für eine effektive Rohstoffverwertung in der Fermentation sowie rationelle Raum-Zeit-Ausbeute durch Prozeßsteuerung ist die *on-line*-Erfassung einer Vielzahl von Prozeßparametern erforderlich. Die Konzentrationsbestimmung von Nährstoffen, vor allem Kohlenhydraten, Aminosäuren, Phosphaten und Ammoniumsalzen, aber auch von Hormonen ist eine Grundvoraussetzung für die Optimierung der Produktausbeute. So muß bei verschiedenen Fermentationsprozessen, z. B. in der Antibiotikaproduktion, der zeitliche Verlauf der Nährstoffkonzentration in einem engen Bereich eingehalten werden. Natürlich gibt die Messung der Produktkonzentration die unmittelbarste Aussage über den Zustand des Bioprozesses.

Die Prozeßkontrolle besitzt vor allem bei Zellkulturreaktoren menschlicher oder tierischer Zellen erhebliche Bedeutung, weil die Nährmedien und die Fermentationsprodukte außerordentlich teuer sind. Für die Mehrzahl der Nährstoffe, z. B. Kohlenhydrate und Aminosäuren, und niedermolekularen Produkte, z. B. Penicillin, Citronensäure und Gluconsäure, existieren Enzymelektroden. Dagegen erfordert die Bestimmung hochmolekularer Substanzen den Einsatz von Antikörpern. Aber auch bei der Substratmessung im Fermenter mit Enzymelektroden treten erhebliche Schwierigkeiten auf, weil eine Sterilisierung des Sensors nicht direkt möglich ist. Deshalb gibt es nur wenige Arbeiten zum direkten Einsatz von Biosensoren in Fermentern.

Für die *in situ*-Messung des Antibiotikums Penicillin haben Enfors und Nilsson (1979) folgendes Prinzip entwickelt, das sowohl eine Sterilisation des Sensors im Fermenter als auch die Erhöhung der Funktionsstabilität erlaubt: Zwischen einer äußeren Dialysemembran und der Indikatorelektrode befindet sich eine Kammer,

in der eine Enzymlösung erst nach der Sterilisation des Sensorgehäuses eingefüllt wird. Diese Sensoranordnung erlaubt auch den Austausch der Enzymlösung während der Fermentation, so daß der Fermentationsprozeß über die gesamte Dauer verfolgt werden kann.

Die zunehmende Belastung der Biosphäre mit den Abfallprodukten unserer Zivilisation und das wachsende Bewußtsein der Menschen für die Erhaltung der Umwelt erfordern neben der Entwicklung umweltfreundlicher Technologien auch schnelle und genaue Analysemethoden für Luft, Gewässer und Boden. Von besonderer Bedeutung ist hierbei der Nachweis einer Vielzahl organischer Chemikalien und Schwermetalle.

Mikrobielle Sensoren befinden sich bereits im Routineeinsatz bei der Abwasserüberwachung. Hier erfolgt die Anzeige der durch die Mikroorganismen assimilierbaren Bestandteile des Abwassers, d. h., es wird eine Meßgröße analog zum Biochemischen Sauerstoffbedarf (BSB) ermittelt. Der konventionelle BSB-Test erfordert 5 Tage, während der Sensor-BSB innerhalb weniger Minuten vorliegt.

6. Nanobiotechnologie

Biologische Systeme funktionieren ebenso wie die im Nanometerbereich arbeitende Technik auf dem Niveau der Moleküle. Deshalb werden auf diesem Level vergleichbare Grundprinzipien technischer und biologischer Systeme sichtbar. Die biologische Zelle ist ein hochintegriertes System molekularer Maschinen, wobei die vielfältigen Leistungen auf der Basis von nur vier Stoffklassen realisiert werden, den Nucleinsäuren, Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden (Alberts et al., 1986). Durch die Evolution wurde die Struktur dieser Funktionsträger auf die jeweilige Funktion optimal angepaßt, wobei wenige Grundprinzipien zugrunde liegen:

- Die Spezifität der Wechselwirkungen, die spezifische Reaktionsabläufe in den komplex zusammengesetzten Medien erlaubt, basiert auf der *Komplementarität* der Strukturen.
- Durch die Anpassung an die Struktur des Reaktionspartners (*induzierte Paßfähigkeit*) können die Selektivität weiter verbessert und abgeschlossene (wasserfreie) Reaktionsräume geschaffen werden.
- Der modulare Aufbau der Funktionssysteme gestattet die Diversifikation von Funktionen bei allgemeiner Konstanz der Einzelbausteine (*Domänenstruktur*, z. B. bei Rezeptoren).
- Durch *Substitution* von Komponenten wird die Spezialisierung erweitert (z. B. prothetische Gruppen von Enzymen).

Während die erhebliche Fehlerrate in der üblichen Nanotechnologie ein wichtiges

Problem darstellt – z. B. bei Sensoren, Ventilen, Motoren und Informationsverarbeitungssystemen –, beherrscht die Natur diese Probleme bei der Erzeugung noch wesentlich kleinerer Funktionssysteme.

Für eine mögliche technische Nutzung der Leistungen der biologischen Zelle auf molekularem Niveau ist eine Reduktion der strukturellen Komplexität und eine Stabilisierung des Biomoleküls in der technischen Umgebung erforderlich. Dabei kommt dem *Interphasendesign* eine Schlüsselrolle zu, da die Verknüpfung beider Teilsysteme an der Phasengrenze erfolgt. Deshalb stellt die Immobilisierung von Biomolekülen auf einem technischen Träger ein wesentliches Problem dar (siehe 2.). Beim Übergang zu molekularen Dimensionen erlangt die Orientierung der immobilisierten Biomoleküle auf dem Substrat eine wichtige Bedeutung. Über den Aufbau geordneter monomolekularer Schichten durch *self assembly* und LB-Methoden wird es möglich, dreidimensionale Überstrukturen aufzubauen und damit die Funktionsdichte zu erhöhen (Fuchs et al., 1991).

Auf der anderen Seite liefert die Biomineralisation und Biopolymerisation interessante Strukturwerkstoffe mit hoher struktureller und morphologischer Regelmäßigkeit. Die hohe Keimbildungsselektivität und Wachstumskontrolle durch das Proteinimplantat im Submikrometer-Bioreaktor führt zu nanokristallinen Festkörpern, z. B. bei Eisensulfid oder Braunstein sowie bei bisher 60 anderen Mineralien (Mann et al., 1992). Weiterhin bieten sich geordnete Schichten aus Biopolymeren, z. B. die S-Layers von Bakterien, als „molekulare Masken“ für die Schicht-erzeugung an. Funktionelle Biopolymere können auch in Gebieten eingesetzt werden, bei denen die ursprüngliche Funktion nicht genutzt wird. Das photochrome Retinalprotein Bakteriorhodopsin funktioniert in der Photosynthese von Halobakterien als lichtgetriebene Protonenpumpe. Seine photochemischen Eigenschaften bieten für die optische Informationsverarbeitung interessante Anwendungen. Durch gentechnische Modifikation des Proteins wurden Mutanten erzeugt, die z. B. für die optische Datenspeicherung oder Mustererkennung geeignet sind (Bräuchle et al., 1991). Diese technischen Anwendungen sind bereits kurzfristig realisierbar, eine breite Anwendung in der optischen Informationsverarbeitung ist aber noch nicht absehbar.

Auch für die Aktorik auf molekularem Niveau besitzt die Zelle interessante Beispiele. So benutzen viele Bakterien für die Fortbewegung Flagellen, die mit Hilfe „molekularer“ Motoren in eine Drehbewegung versetzt werden. Jede der 6 bis 8 Geißeln rotiert mit bis zu 1.500 Umdrehungen pro Minute, wobei die Rotationsrichtung umgeschaltet werden kann (Macnab & Parkinson, 1991). Als Energiequelle dient das Einströmen von Protonen, die den Proteinmotor zum Rotieren bringen. Diese Maschine besteht aus 5 bis 20 verschiedenen Proteinen. Lineare Bewegungen werden durch die ATP-getriebenen Konformationsveränderungen im Paar Myosin-Aktin erzeugt.

Die evolutive (Nano-)Biotechnologie strebt an, optimierte Zielstrukturen zu ermitteln, ohne aus Struktur-Funktionsbeziehungen gezielte Veränderungen abzuleiten. Da andererseits die Suche nach verbesserten Biopolymeren in den (schier unerfaßbaren) randomisiert generierten Varianten nur selten zum Erfolg führt, wird eine gerichtete Evolution angestrebt (Eigen, 1986). Für diese kombinatorischen Bibliotheken ist eine hohe Technisierung und Instrumentalisierung biologischer Prozesse erforderlich. Eine große Anzahl (10^6 bis 10^8) individueller Reaktionsansätze muß parallel durchgeführt, und die minimalen Stoffmengen (10.000 Moleküle) müssen analytisch charakterisiert werden. Diese Anforderungen werden durch Multireaktionskammern auf Si-Chips in Verbindung mit der Analyse durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) erfüllt. Bei der PCR können weniger als 10 Moleküle der DNA-Vorlage mit einigen Tausend Nukleotiden in temperaturinduzierten Zyklen bis zu 10^{10} -fach in ihrer Konzentration amplifiziert werden (Mullis & Faloona, 1987). Damit wird das Auffinden bestimmter Genabschnitte, z. B. von somatischen Mutationen und Onkogenen aber auch die Titerbestimmung von Viren (z. B. HIV) oder von DNA-Verunreinigungen in Gentechnikprodukten möglich. Der Nachweis von Einzelmolekülen ohne Amplifizierung wird auch bei der FCS bei einer Detektionsgrenze von 10^{-14} bis 10^{-18} Mol/l und einem Meßvolumen von 10^{-14} l erreicht. Voraussetzung für diese Methode ist die Markierung der zu detektierenden Moleküle (Rigler et al., 1993).

Die Biosensorik bewegt sich gegenwärtig auf zwei Wegen zur Nanobiotechnologie. Auf der einen Seite werden die Technologien der Mikroelektronik mit der Mikrosensorik und Mikroaktorik zur *Mikrosystem-Technologie* vereinigt. Dadurch wird die Herstellung von autonom arbeitenden Mikrosystemen erreicht, die über (Bio-)Sensoren den Zustand ihrer Umgebung analysieren. Die Sensorsignale werden durch die integrierte Elektronik verarbeitet und durch sie die Funktion von Aktoren (z. B. Pumpen, Ventile) geregelt. Solche analytischen Mikrosysteme stellen „on chip“-Analysatoren dar, die zukünftig in „künstlichen Organen“ eingesetzt werden sollen. Das bekannteste Konzept ist die künstliche Bauchspeicheldrüse, wo ein Blutzuckersensor die Signale für die Steuerung einer Insulinpumpe liefert. Andererseits bewegt sich die Biochemie/Molekularbiologie auf die Bioelektronik zu.

- Die Signalverarbeitung in Nerven liefert Ansatzpunkte für das Konzipieren neuer Computer. Dazu werden Nervenzellen auf Arrays von Mikroelektroden oder Transistoren kultiviert und die Signalverarbeitung elektronisch ausgewertet (Fromherz et al., 1991).
- Mit der *scanning tunneling microscopy* und *atomic force microscopy* gelingt es, einzelne Biomoleküle im Nanometermaßstab anzuordnen, bzw. die Moleküle zu zählen.

Literatur

- Alberts, B., 1986: Molekularbiologie der Zelle. Weinheim (VCH)
- Armstrong, F. A., 1990: Probing metalloproteins by voltammetry. In: Structure and Bonding 72, 137–221
- Bräuchle, C., 1991: Optical application of bacteriorhodopsin and its mutated variants. In: Advanced Materials 3, 420–428
- Clark, L. C. & C. Lyons, 1962: Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. In: Ann. N.Y. Acad. Sci. 102, 29–45
- Degani, Y. & A. Heller, 1987: Direct electrochemical communication between chemically modified enzymes and metal electrodes. In: J. Phys. Chem. 91, 1285–1289
- Eigen, M., 1986: The physics of molecular evolution. In: Chemica Scripta 268, 13–26
- Eliason, M. et al., 1988: Chimeric IgG-binding receptors engineered from staphylococcal protein A and streptococcal protein G. In: Journal of Biological Chemistry 263, 4323–4327
- Enfors, S.O. & H. Nilsson, 1979: Enzyme electrodes for measurement of penicillium in fermentation broth. In: Enzyme Microb. Technol. 1, 260–265
- Fromherz, P. et al., 1991: A neuron-silicon junction: A Retzius cell leech on an insulated-gate field-effect transistor. In: Science 252, 1290–1293
- Fuchs, H. et al., 1991: Molecular architectures for advanced optical, electronic, and bio-related systems. In: Adv. Mat. 3, 10–18
- Gorton, L. et al., 1992: Amperometric biosensors based on an apparent direct electron transfer between electrodes and immobilized peroxidases. In: Analyst 117, 1235–1241
- Hall, E., 1991: Biosensors. London (Prentice-Hall International (UK) Limited)
- Ikeda, T. et al., 1991: Amperometric fructose sensor based on direct bioelectrocatalysis. In: Biosensors Bioelectronics 6, 299–304
- Macnab, R.N. & J.S. Parkinson, 1991: Genetic analysis of the bacterial flagellum. In: Trends in Genetics 7, 196–200
- Mann, S., 1992: Biomineralization: Biomimetik potential at the inorganic-organic interface. In: MRS Bulletin 10, 32–36
- McNeil, C.J. et al., 1992: Application of the electrochemistry of cytochrome c to the measurement of superoxide radical production. In: Free Rad. Res. Commun. 7, 399
- Mullis, K.B. & F.A. Falooma, 1987: Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: Methods in Enzymology 155, 335–350
- Owicki, J.C. & J.W. Parce, 1990: Bioassays with a microphysiometer. In: Nature 344, 271–272
- Rigler, R. et al., 1993: Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. In: Eur. Biophys. J. 22, 169–175
- Scheller, F. W. & F. Schubert, 1992: Biosensors. Amsterdam (Elsevier)
- Schmidt, H.L. et al., 1992: Specific features of biosensors. In: Göpel, W. (Hg.), Sensors, Weinheim (VCH), 719–817
- Wollenberger, U. et al., 1993: Enhancing biosensor performance using multienzyme systems. In: TIBTECH, Juni/11, 255–262