Nanopartikel-Enzym-Konjugate für die Entwicklung von Biosensoren

Eine neue Methode zur Herstellung von polymeren Nanopartikeln mit oberflächenaktiven funktionellen Ankerstellen ermöglicht die gezielte Anbindung von Enzymen in nur einem Prozessschritt. Für die Entwicklung von Biosensoren werden so maßgeschneiderte Hybridsysteme bereitgestellt, die unter Erhalt ihrer Enzymaktivität als Redox-Katalysatoren wirken.

Daniela Pufky-Heinrich* und Achim Weber*

DIE AUTOREN

Dr. Daniela Pufky-Heinrich: 1996 bis 2002 Studium der Chemie an der Uni Jena und der University of Northumbria at Newcastle/UK; 2005 Promotion im Fachbereich Technische Chemie an der Uni Heidelberg; 2006 bis 2008 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Technische Chemie der Uni Stuttgart; seit 2008 Projektleiterin Biomimetische Grenzflächen am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik.

Dr. Achim Weber: 1989 bis 1995 Studium der Chemie an der Uni Stuttgart, dort 1999 Promotion in Physikalischer Chemie; 1999 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Uni Tübingen; 2000 bis 2001 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Uni Stuttgart, Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik; seit 2002 Projektleiter am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik; dort 2006 bis 2009 Gruppenleiter Biomimetische Funktionsschichten und seit 2010 Gruppenleiter Partikuläre Systeme und Formulierungen.

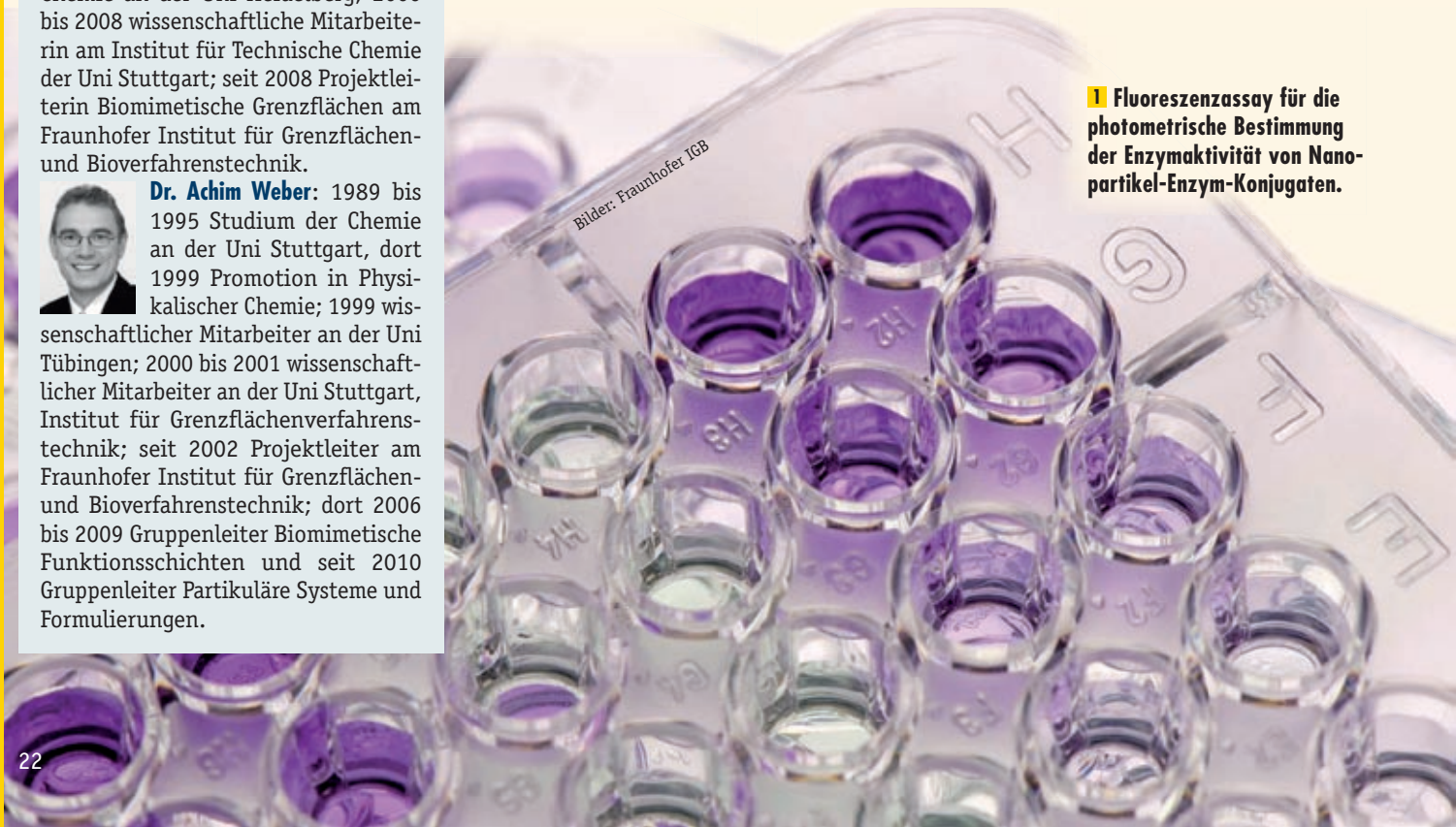
Enzyme sind vielseitige Biokatalysatoren, die zunehmend Einsatz in industriellen Bereichen finden. Allerdings ist die technische Anwendung eines Enzyms oft durch mangelnde Langzeitstabilität unter realen Verfahrensbedingungen und Schwierigkeiten beim Recycling eingeschränkt. Aktuelle Forschungsbemühungen beinhalten deshalb die Entwicklungen biofunktionalisierter Hybridmaterialien zur Immobilisierung aktiver Enzymeinheiten, die wiederum interessante und relevante Tools für die Entwicklung von Biosensoren sind [1, 2]. Gerade Nanopartikel eignen sich hervorragend für die Darstellung derartiger Hybridsysteme, da es die vergleichbaren Dimensionen von Enzym und Partikel ermöglichen, Materialien zu erzeugen, die synergistische Eigenschaften aufweisen. So bringt die Systemverkleinerung in nanoskopische Dimensionen einen enormen Zuwachs an spezifischer Oberfläche. Mit kleinster Masse an Nanopartikeln lassen sich große Oberflächen für die Handhabung von Biomolekülen bereitstellen.

Die Surfmer-basierte Technologie (s. Abb. 2) ermöglicht die einstufige Herstellung von Nanopartikeln mit maßgeschneiderten Ankerstellen für die Anbindung von Biomolekülen wie Peptide, Antikörper oder auch Enzyme [3, 4, 5]. Dadurch lassen sich herkömmliche Herstellungsverfahren, die mehrere unterschiedliche Prozessschritte erfordern, ersetzen.

Herstellung oberflächenaktiver funktioneller Partikelsysteme

Surfmere – eine Wortschöpfung aus den Begriffen Surfactant und Monomer – sind polymerisierbare Tenside, die in einer Emulsionspolymerisation zur Herstellung von Polymernanopartikeln mit oberflächenaktiven funktionellen Ankerstellen verwendet werden (s. Abb. 2). Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass die eingesetzten polymerisierbaren Tenside bei der Co-Polymerisation mit einem Co-Monomer im Polymergerüst eingebaut werden. Bei einer weiteren Verwendung der so hergestellten Polymerpartikel kommt es deshalb nicht

Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, 70569 Stuttgart, Tel. +49 (0) 711 / 970-4022

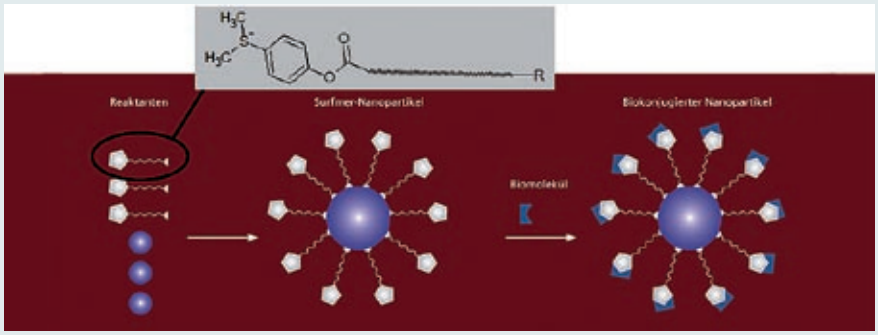


Bilder: Fraunhofer IGB

1 Fluoreszenzassay für die photometrische Bestimmung der Enzymaktivität von Nanopartikel-Enzym-Konjugaten.

zur Abspaltung des Tensids und einer damit einhergehenden Agglomeration.

Die modular aufgebauten Surfmere beinhalten unterschiedliche Struktureinheiten, die es erlauben maßgeschneiderte Derivate für die gezielte Anbindung bereitzustellen. Spacerlänge, polymerisierbare Gruppe, Anteil an Surfmer sowie Art des Co-Monomers wurden variiert, um eine breite Palette an unterschiedlichen Surfmer-Nanopartikeln herzustellen. Sowohl Polystyrol- (s. Abb. 3) als auch Polymethylmethacrylat-(pMMA)-basierte Partikel sind in sehr guten Ausbeuten erhältlich. Typische Partikeldurchmesser liegen im Bereich von 80 bis 200 nm. Hierbei haben Art und Menge an Surfmer einen entscheidenden Einfluss auf den Teilchenbildungsprozess während der Emulsionspolymerisation und somit auf Durchmesser und Anzahl der gebildeten Polymerpartikel. Eine Erhöhung der Konzentration an Surfmer führt zur Bildung kleinerer, höher geladener Partikel, da sich im Vergleich zu einer geringeren Surfmerkonzentration mehr Micellen bilden, die kleiner sind und damit größere positive Partialladungen aufweisen.



2 Die NANOCYTES-Technologie: Surfmer-Nanopartikel für die direkte Kopplung von Biomolekülen werden via Emulsionspolymerisationen in einem Prozessschritt unter Verwendung polymerisierbarer Tenside (Surfmere) hergestellt. Schematischer Aufbau sulfonium-basierter Surfmere bestehend aus einer Aktivestereinheit, einem Spacer und einer polymerisierbaren Gruppe (R). (NANOCYTES ist eine eingetragene Marke der Fraunhofer Gesellschaft)

Kopplung von Oxidoreductasen unter Erhalt ihrer Enzymaktivität

Oxidoreductasen sind Enzyme, die Redoxreaktionen katalysieren und prädestiniert sind als Baustein für Erkennungsreaktionen in Biosensoren. Als Redoxsysteme katalysieren sie Oxidations- oder Dehydrogenierungsreaktionen. In klinisch-relevanten Anwendungen finden sich hierbei vornehmlich Glucose-Oxidase basierte Systeme, deren Wirkungsweise auf der Bildung von Wasserstoffperoxid aus Sauerstoff katalysiert durch die entsprechenden Enzyme beruht.

Die Aktivestereinheit der am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik entwickelten Surfmer-Nanopartikel bietet als Ankergruppe optimale Reaktivität mit empfindlichen Biomolekülen und gewährleistet gleichzeitig maximale Stabilität während Herstellung, Lagerung und Transport. Beispielsweise können so unter physiologischen Bedingungen Stickstoff-Nukleophile wie Proteine mit Surfmer-Nanopartikeln umgesetzt werden. Dass auch redoxaktive Enzyme unter Erhalt ihrer Aktivität an Surfmer-Nanopartikel gekoppelt werden können, zeigen Ergebnisse aktueller Forschungsaktivitäten. Die Enzyme Katalase, Laccase sowie Glucose-Oxidase wurden an eine Reihe verschiedener Surfmer-Partikel immobilisiert und deren Enzymaktivität nach der Kopplung bestimmt. Als Nachweisreaktionen dienen hierbei der Verbrauch (bei Katalase) bzw. die Freisetzung (bei Laccase und Glucose-Oxidase) von Wasserstoffperoxid katalysiert durch die immobilisierten Enzyme und nachgewiesen anhand entsprechender auf das Enzymsystem abgestimmter Fluoreszenzassays (s. Abb. 1). In Abbildung 4 ist beispielhaft die Aktivität von Glucose-Oxidase immobilisiert auf p(MMA-co-AUPDS-3%)-Par-

tikeln gezeigt. Die Enzymaktivität ist doppelt so hoch wie auf den entsprechenden hydrolisierten Partikeln. Letztere wurden durch hydrolytische Spaltung der Aktivesterfunktion in Borat-Puffer erzeugt, um die spezifischen Bindungsstellen zu entfernen. Auf den Surfmer-Nanopartikeln koppelt das Enzym gezielt kovalent durch Reaktion der Stickstoff-Nukleophile der Glucose-Oxidase an der dafür vorgesehenen Aktivestereinheit. Wohingegen auf den hydrolisierten Surfmer-Partikeln das Enzym ausschließlich unspezifisch über physikalische Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen oder Van-der-Waals-Wechselwirkungen bindet.

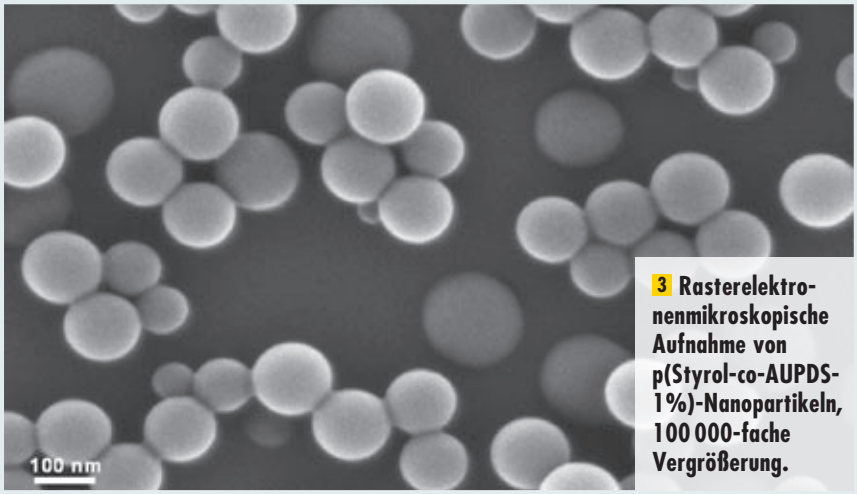
Unhydrolisierte Konjugate besitzen höhere Aktivitäten

Untersuchungen der Kopplung der drei Enzyme Katalase, Laccase und Glucose-Oxidase an verschiedenen Surfmer-Nanopartikeln bestätigten den Ansatz, dass unhydrolisierte Partikel-Enzym-Konjugate aus Derivaten mit hohem Surfmeranteil im Reaktionsansatz wesentlich höhere Aktivitäten zeigen als solche, die mit weniger Surfmer relativ zur Co-Monomerkonzentration hergestellt wurden. Betrachtet werden muss hierbei die Ladungsmenge auf der Partikeloberfläche, die die Menge der oberflächengebundenen Surfmermoleküle widerspiegelt. Vergleichbare Derivate mit drei Prozent Surfmer im Partikel erbrachten die besten Ergebnisse. Doch nicht nur der Anteil an Surfmer, sondern auch Spacerlänge, polymerisierbare Gruppe und Art des Co-Monomers haben einen maßgeblichen Einfluss auf die Kopplungseigenschaften der Partikel. In Tabelle 1 ist die systematische Untersuchung verschiedener Partikel mit einem Prozent Surfmeranteil dargestellt. Hierbei zeigen sich eindeutige Trends. Nicht nur die Zahl an oberflächengebundenen Surfmermolekülen sind relevant sondern auch unterschiedliche Oberflächenmorphologien oder -ladungen hervorgerufen durch die Verwendung verschiedener polymerisierbarer Gruppen im Surfmermolekül. Zudem hat sich herausgestellt, dass Surfmer-Nanopartikel copolymerisiert mit pMMA und längeren Spacereinheiten die besten Kopplungseigenschaften gegenüber den untersuchten Oxidoreductasen aufweisen: eine hohe spezifische Kopplung mit geringem Anteil an unspezifischen Wechselwirkungen.

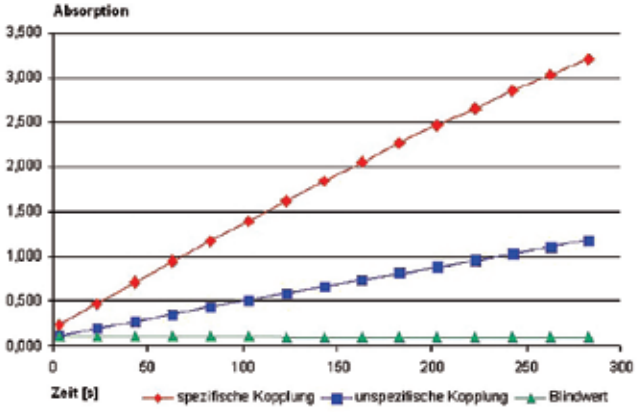
Tabelle 1: Vergleich der Enzymaktivitäten hydrolisierter (a unspezifisch) und nicht-hydrolisierter (a spezifisch) Surfmer-Nanopartikel an Katalase (nach 4 h Inkubation von 2 mg Partikel in Katalase-Lösung (0,25 mg/mL), Mittelwerte aus drei Bestimmungen)

Surfmer-Partikel*	$a_{unspezifisch}$ [U/ml]	$a_{spezifisch}$ [U/ml]
p(MMA-co-AUPDS-1%)	2,2±0,6	17,7±2,1
p(MMA-co-MUPDS-1%)	1,5±0,3	11,9±3,0
p(MMA-co-AHPDS-1%)	0,9±0,2	4,3±0,4
p(MMA-co-MIHPDS-1%)	0,8±0,1	3,6±0,6
p(Styrol-co-AUPDS-1%)	4,5±1,1	8,0±0,8

*AUPDS: p-(11-(Acrylamido)-undecanoyloxy)phenyl-dimethylsulfoniummethylsulfat; MUPDS: p-(11-(Methacrylamido)-undecanoyloxy)phenyl-dimethylsulfoniummethylsulfat; AHPDS: p-(6-(Acrylamido)- hexanoyloxy)phenyl-dimethylsulfoniummethylsulfat; MIHPDS: p-(6-(Maleinimido)-hexanoyloxy)phenyl-dimethylsulfoniummethylsulfat



3 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von p(Styrol-co-AUPDS-1%)-Nanopartikeln, 100 000-fache Vergrößerung.



4 Enzymaktivität von Glucose-Oxidase bei spezifischer (rot) oder unspezifischer (blau) Kopplung an p(MMA-co-AUPDS-3%)-Surfmer-Nanopartikel.

Zusammenfassung, Ausblick und zukünftige Projekte

Die Surfmer-Technologie bietet eine Möglichkeit sehr einfach und in einem Prozessschritt, Enzyme zu immobilisieren. Der Aufbau der Aktivester-funktionalisierten Nanopartikel erlaubt es zudem, diese Kopplungsstrategie auf eine breite Palette an verschiedenen Biomolekülen anzuwenden und durch Wahl der entsprechenden Surfmereinheit die Kopplungschemie optimal einzustellen. Die derzeitigen Entwicklungsansätze verfolgen das Ziel, die Immobilisierungsverfahren zu optimieren, um die Enzyme nahezu quantitativ an die polymere Matrix anbinden zu können. Zudem arbeiten wir daran, neuartige Surfmerstrukturen zu entwickeln, um z.B. unspezifische Kopplungsphänomene zu minimieren oder gezielt an bestimmten Bindungsstellen der Enzyme anzubinden. Ein Entwicklungsziel, das mit diesen Arbeiten verfolgt wird, ist die Etablierung redoxaktiver Barriereschichten für den Nachweis von Fäulnisgasen in Lebensmitteln zur Herstellung aktiver und intelligenter Verpackungsmaterialien. Hierbei besteht besonderer Bedarf in der Entwicklung bioverträglicher Partikel-Systeme. LP

laborpraxis.de
• Die Literatur zum Artikel finden Sie hier
Zusätzliche Informationen unter www.laborpraxis.de
InfoClick 339546