

Untersuchung biologischer Adsorbate mittels moderner Quarzmikrogravimetrie

A. Welle, IMB

Grundlagen

Die Quarzmikrogravimetrie (Quartz Crystal Microbalance, QCM) nutzt Änderungen des Schwingungsverhaltens eines Quarzplättchens, hervorgerufen durch Massenbelegung seiner Oberfläche, zu Wägung im Nanogramm-Bereich. Abb. 1 soll das Prinzip verdeutlichen: Tonhöhe (entsprechend der Frequenz, f) und Nachklingzeit (beziehungsweise die Dämpfung, D) einer Glocke, als Beispiel eines mechanischen Oszillators, sind von ihrer Größe und ihrem Material abhängig¹⁾. Setzt sich der Glöckner auf die Glocke, wird der Ton durch die zusätzliche Masse tiefer und klingt aufgrund der Viskoelastizität des Körpers, die für eine zusätzliche Dämpfung sorgt, schneller ab.

Bei der Quarzmikrogravimetrie wird durch Anlegen einer abgestimmten Wechselspannung im MHz-Bereich an die Elektroden auf Ober- und Unterseite eines Quarzes durch den piezoelektrischen Effekt eine Resonanzschwingung angeregt. Abhängig von der Dicke des Quarzscheibchens bildet sich eine transversale Scherschwingung der Kristalloberflächen aus.

Im einfachsten Fall, der Anlage einer starren Schicht auf der Oberfläche eines Quarzes der Dicke d_0 , der ohne nennenswerte Reibungsverluste mit der Frequenz f_0 schwingt, stellt das abgelagerte Material praktisch eine Vergrößerung der Kristalldicke, Δd , und somit der Wellenlänge der Scherschwingung, dar. Sau-



Abb. 1: Eine Glocke klingt mit charakteristischer Tonhöhe und Nachklingzeit. Die gezeigten Veränderungen der Masse und Materialeigenschaften verändern Tonhöhe und Nachklingzeit, sodass eine Wägung und Rückschlüsse auf die „Festigkeit“ des Glöckners möglich sind.

erbrey [1] zeigte, dass sich hier die Resonanzfrequenz wie folgt ändert:

$$\frac{\Delta f}{f_0} = -\frac{\Delta d}{d_0} = -\frac{1}{\rho_Q \cdot d} \cdot \frac{\Delta m}{A} \quad (1)$$

Sauerbrey-Gleichung:

ρ_Q Dichte des Quarzes
 A Fläche
 Δm Massenänderung

Da die genannten Randbedingungen beim Metallaufdampfen und anderen technischen Prozessen erfüllt sind, wird QCM zur Schichtdickenbestimmungen mit Sub-Nanometerpräzision genutzt. Bei dem am IMB eingesetzten Gerät (Abb. 2) entspricht nach (1) eine Massenbelegung von 18 ng/cm^2 einer Verschiebung der ersten Resonanzfrequenz (5 MHz) um 1 Hz.

Weiterentwicklungen

Vergleicht man die Viskositäten von Luft und Wasser, erscheint es unrealistisch, eine Quarzmikrowaage in Flüssigkeiten anzuwenden, da die wesentlich stärkere Dämpfung hier eine stabile Oszillation des Kristalls verhindert. Trotz der Attraktivität der Messmethode erschienen erst 2 Jahrzehnte nach Sauerbrey's Veröffentlichung



Abb. 2: QCM-D Messaufbau. Rechts Hochfrequenzelektronik, davor Messkammer für Durchflussmessungen, am Binokular zweite Messkammer mit Sichtfenster.

1) Daneben spielen das Umgebungsmedium und die Temperatur eine Rolle.

fentlichung weitere Berichte, die Quarzmikrogravimetrie in flüssigen Medien beschreiben [2]. Neben der großen Dämpfung bereiten die elektrische Kontaktierung des Kristalls und die Temperaturkontrolle²⁾ experimentelle Probleme. Parallel zu technischen Verbesserungen wurden auch die Modelle weiterentwickelt: Zunächst wurde von Kanazawa [3] die Kopplung der Scherwelle mit der Flüssigkeit, später von Martin [4] eine starre Adsorbatschicht zusammen mit einer viskosen Flüssigkeit berücksichtigt.

In der rasch ansteigenden Zahl untersuchter Adsorbate, die mehr und mehr biologischen Ursprungs waren, tauchten nun häufiger Proben auf, die so weit von einem starren und ohne Phasenverschiebung mitschwingenden System entfernt waren, dass bisherige Modelle unrealistische Massen lieferten. Daher wurden

neue Modelle für viskoelastische Adsorbate entwickelt [5, 6]. Diese Stoffe zeigen bei Scherung sowohl die Dämpfung einer Flüssigkeit als auch eine Rückstellkraft³⁾. Das heißt, dass zusätzlich zu den Eigenschaften der Flüssigkeit die Dicke, d_F , und Dichte, ρ_F , des Adsorbatsfilms sowie das komplexe Schermodul, G , die Messgrößen beeinflusst. G ist definiert als:

$$G = G' + iG'' = \mu_F + i2\pi f\eta_F \quad (2)$$

μ_F Elastizitätsmodul
 η_F Scherviskosität

Um die unbekanntenen Größen d_F , ρ_F , μ_F und η_F zu modellieren (siehe Anhang), werden Dämpfungs- und Frequenzänderungen der Grundschwingung und bei Ober-tönen bis 35 MHz registriert. Damit liefert die Quarzmikrogravimetrie mit Dämpfungsmessung (QCM-D) sowohl die Masse als auch viskoelastische Größen eines Adsorbates, die, wie im Fol-

genden gezeigt wird, für das Verständnis biologischer Prozesse an Oberflächen wichtig sind. Ein weiteres Charakteristikum der QCM ist, dass im Gegensatz zu anderen Verfahren (Tab. 1) der Wassergehalt eines Adsorbats miterfasst wird.

Aktuelle Anwendungen aus der Biologie

Die Wechselwirkung künstlicher Oberflächen, zum Beispiel Zellkulturträger oder medizinischer Implantate, mit Bakterien, höheren Zellen oder Geweben wird immer vom Proteinadsorbat bestimmt, das spontan beim Kontakt der Oberfläche mit Zellkulturmedium oder Blut gebildet wird. Somit erfordert die Entwicklung spezieller Biomaterialien neben klassischer Oberflächenanalytik die Charakterisierung dieses Adsorbates, zum Beispiel mit den in Tab. 1 genannten Verfahren.

	Kinetik	Massenbelegung	Weitere Parameter	Selektivität *
QCM-D	ja	ja	μ_F und η_F	nein
Surface Acoustic Wave [7]	ja	ja	–	nein
Ellipsometrie [8]	ja	ja, nach Kalibrierung	Brechungsindex	nein
Oberflächen Plasmonen Resonanz [9]	ja	ja, nach Kalibrierung	Brechungsindex	nein
Elektrophorese/immunologisch* [10]	nein	grob	–	ja
MALDI-TOF * [11]	nein	nein	–	ja

Tab. 1: Methoden zur Untersuchung von Proteinadsorbaten.

***) Nach Desorption kann die Zusammensetzung eines Multiproteinadsorbats bestimmt werden.**

2) Temperaturänderungen beeinflussen stark die Viskosität der Flüssigkeit.

3) Ein Gummiball zeigt Viscoelastizität. Fällt er auf den Boden wird ein Teil seiner kinetischen Energie durch Scherspannung konserviert und wieder in potentielle Energie umgewandelt. Der Rest geht durch die Viskosität verloren wodurch der Ball nicht wieder sein Ausgangsfallhöhe erreicht.

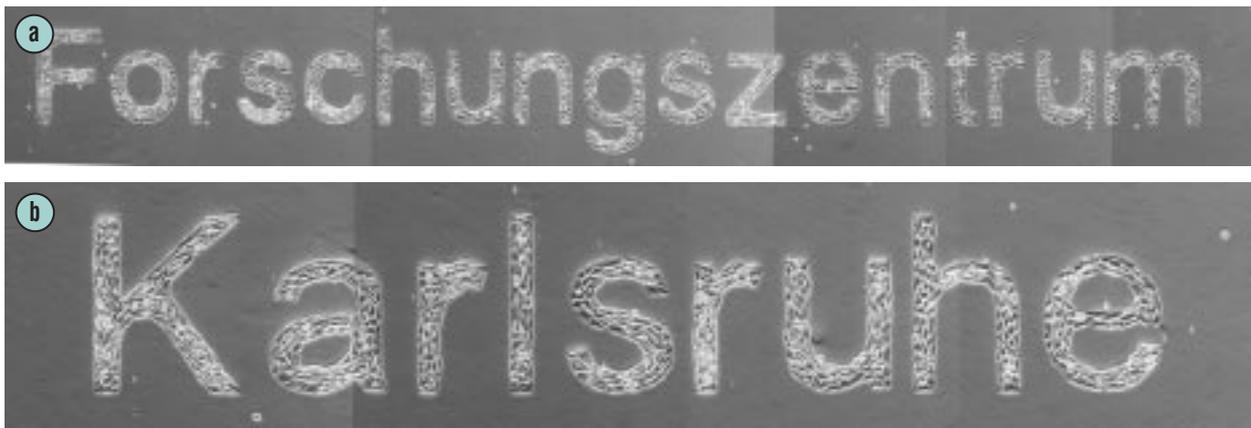


Abb. 3 a) und b): Lebende Zellen (L929 Fibroblasten), die in UV-modifizierten Bereichen einer Polystyroloberfläche haften und von unmodifiziertem PS abgestoßen werden [12, 13]. Höhe der Initialien jeweils 475 μm .

Am IMB wurde ein Verfahren zur Steuerung von Zelladhäsion auf Kunststoffen entwickelt [12, 13]. Das Schreiben chemischer Muster auf Polymeroberflächen, die von lebenden Zellen „gelesen“ werden können (Abb. 3), erlaubt den Aufbau komplexer, organähnlicher Strukturen in Bioreaktoren. Im QCM-D Experiment nach Abb. 4 werden zwei unterschiedlich modifizierte Polystyrol-(PS-)Oberflächen⁴⁾ zunächst einer Pufferlösung (PBS) und nach 15 Minuten einer Albuminlösung⁵⁾ (BSA) ausgesetzt. Nach Gleichung (1) zeigt die Frequenzabnahme die Adsorption des Proteins. Wird nach 1 Stunde mit PBS gespült, bleibt Albumin in unterschiedlicher Menge auf den Oberflächen zurück. Bei der folgenden Inkubation mit verdünntem Serum (FCS), das eine komplexe Proteinmischung enthält, werden auf dem UV-modifizierten PS im Vergleich zum Unbehandelten mehr Proteine gebunden.

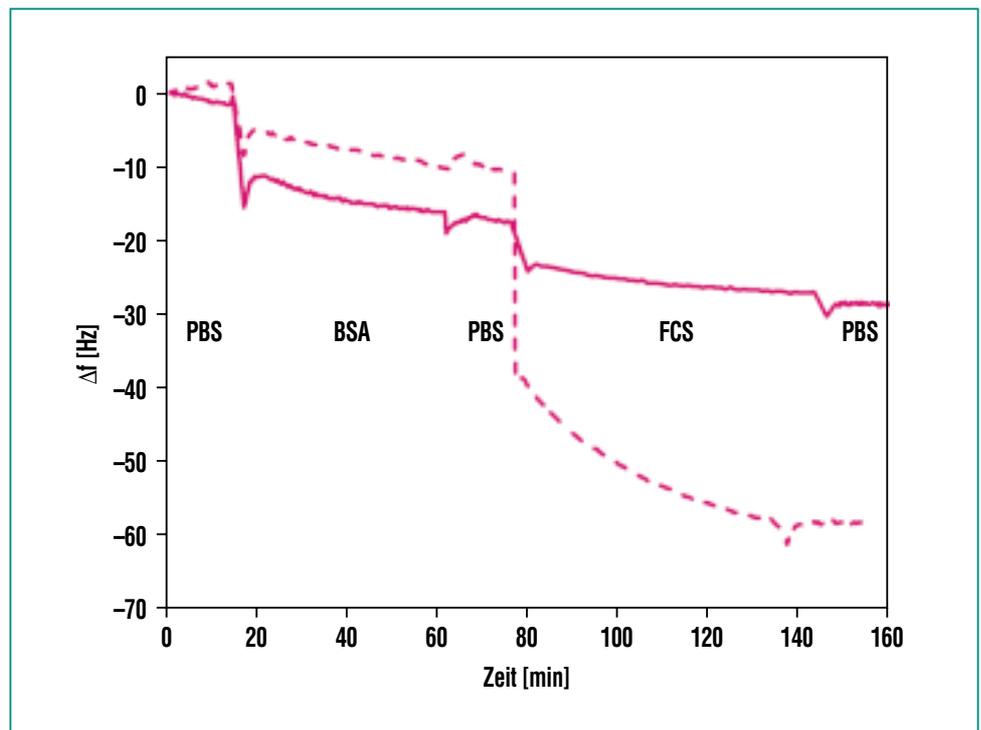


Abb. 4: Frequenzänderung bei Proteinadsorption auf unbehandeltem (durchgezogen) und UV-modifiziertem Polystyrol (gestrichelt). Zu Beginn Pufferlösung (PBS), nach 15 Minuten Albuminlösung (BSA). Frequenzabnahme entspricht Adsorption des Proteins. Nach 1 Stunde Spülen mit PBS und folgend Inkubation mit Serum (FCS), dabei werden je nach Oberfläche weitere Proteine deponiert.

4) Durch Spincoating auf den Quarzkristall aufgebracht.

5) Kleinstes und häufigstes Protein im Blutplasma bzw. Serum. Ohne Peptidsequenzen die von den Rezeptoren der Zelle als Adhäsionspunkte erkannt werden.

Material	η_{BSA} [$\times 10^{-3}$ Pa s]	G_{BSA} [kPa]	$d_{\text{BSA max}}$ [nm]
Gold	$4,3 \pm 0,5$	670 ± 150	$0,8 \pm 0,1$
PS	$7,6 \pm 1,3$	1100 ± 140	$2,2 \pm 0,2$
PS, UV-modifiziert	$4,5 \pm 0,4$	1100 ± 120	$1,6 \pm 0,2$

Tab. 2: Viskosität η_f , Schermodul G , und Sättigungsschichtdicke des Albuminadsorbats auf unterschiedlichen Oberflächen.

Das bedeutet, dass zellabweisendes PS eine passivierende, albuminreiche Proteinschicht adsorbiert, während UV-modifiziertes PS die Albuminadsorption unterdrückt und statt dessen zelladhäsionsfördernde Serumproteine bindet. Die QCM-D zeigt zusätzlich Unterschiede der Viskoelastizität des Albumins (Tab. 2). Es wurde beobachtet, dass

Oberflächen mit hochviskosen Albuminschichten besonders schlecht von Leber- und anderen Zellen besiedelt werden.

Auch folgende Schritte beim Kontakt lebender Zellen mit konditionierten Oberflächen können mit QCM-D verfolgt werden. Abb. 5 zeigt Δf und ΔD bei Proteinadsorption und Zelladhäsion auf

UV-bestrahltem PS. Zunächst enthielt die Messkammer eine Pufferlösung, die bei $t = 30$ min gegen serumhaltiges Zellkulturmedium ausgetauscht wurde. Die Proteinadsorption bewirkte hier die deutlichen Signaländerungen. Nachdem bei $t = 65$ min eine Leberzellsuspension in die Kammer gespült wurde und die Zellen auf die Polystyrolbeschichtung des Quarzes sedimentieren und anhaften, reagiert praktisch nur die Dämpfung, ΔD , da der größte Teil der Masse haftender Zellen nicht mehr von der Scherschwingung erfasst wird⁶⁾ und die Dichteunterschiede zwischen Zellen und Lösung gering sind. Nur die Zellmembran, die direkten Kontakt zum Sensor hat, beeinflusst die Dämpfung des Systems. Nachdem bei $t = 105$ min die Kammer wieder mit Medium gespült wurde, stieg ΔD durch die Vergrößerung der Kontaktfläche (Zellspreitung) sowie Veränderungen der Membran und des Cytoskeletts weiter an. Derartige Messungen werden am IMB zur Entwicklung neuer Polymere als Trägermaterialien für Bioreaktoren genutzt.

Zusammenfassung und Ausblick

Die QCM und verwandte Techniken dienen zur Untersuchungen der Vorgänge an der Grenzschicht zwischen synthetischen Materialien und lebenden Systemen (Zellkulturen, Gewebe, Bakterienfilme) und schließen die ge-

6) Die Schwingung reicht von der Sensoroberfläche nur wenige 100nm in das Medium. Der einige Mikrometer darüber hinausreichende Zellkörper wird nicht „mitgewogen“.

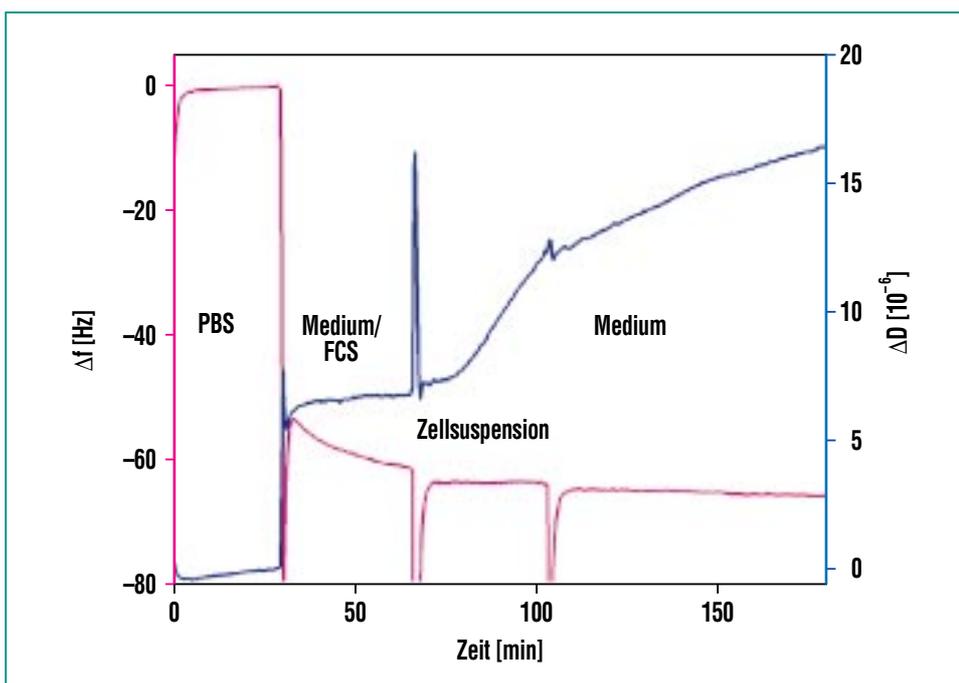


Abb. 5: Frequenz- (rot) und Dämpfungsänderungen (blau) bei Zelladhäsion auf UV-bestrahltem Polystyrol. Erste Signaländerungen bei $t = 30$ min durch Proteinadsorption aus serumhaltigen Medium. Dämpfungszunahme ab $t = 65$ min durch Leberzellen, die auf die Oberfläche sedimentieren und dort haften. Nach Spülen mit Medium bei $t = 105$ min weitere Dämpfungsänderung durch Spreiten der Zellen.

genwärtig auf dem Forschungsgebiet der Biohybridsysteme bestehenden Lücken zwischen Biologie, Chemie und Materialwissenschaften. Nach bisherigen Erfahrungen ist das oberflächengebundene Proteinensemble wichtiger Auslöser biologischer Vorgänge (Zellvitalität und Funktion). Mit QCM-D können in situ und in Echtzeit die Schichtdicke und viskoelastische Parameter biologischer Adsorbate (Adhäsionsproteine, Antikörper, Extrazellulärmatrix), sowie die Wechselwirkungen lebender Zellen mit diesen Schichten verfolgt werden. So zeigten die bisherigen Arbeiten am IMB, dass durch UV-Modifikation von Zellkulturträgern das Plasmaproteinadsorbat beeinflusst werden kann und so die Adhäsion von Zellen lokal gesteuert wird.

Biologische Adsorbate sind jedoch oft so komplex, dass eine einzelne Analyseverfahren nicht in der Lage ist genügend Information zu liefern. Daher soll im Rah-

men von Kooperationen die Quarzmikrogravimetrie durch weitere Verfahren, wie Zirkulardichroismus-Messungen zur Strukturaufklärung adsorbierter Proteine, ergänzt werden.

Auch die Quarzmikrogravimetrie selbst besitzt ein großes Entwicklungspotential. Ziele der technischen Verbesserungen sind unter anderem robuste und günstige Sensoren, um neue Anwendungsfelder zu realisieren, sowie noch schnellere Systeme zur Datenaufnahme. Neue Anwendungsfelder für die QCM-D und die Surface Acoustic Wave Technik in der angewandten Sensorik dürften sich, ähnlich wie bei Organersatzsystemen in der Medizin, ausgehend von rein künstlichen Geräten hin zu biohybriden Systemen entwickeln. Das heißt, auch in der Sensorik werden Kopplungen eines Transducers wie QCM-D mit biologischen Komponenten entwickelt. Beispiele hierfür sind Sensoren, die auf Antigen/Antikörper-Wechsel-

wirkungen beruhen [16], oder lebende Zellen als aktive Elemente mit besonders hoher Selektivität und Sensitivität enthalten [17, 18].

So sind biohybride Systeme nicht nur selbst Gegenstand der Untersuchungen sondern stellen ihrerseits neue analytische Verfahren dar, denen großes wissenschaftliches Interesse entgegengebracht und von denen ein hohes Anwendungspotential erwartet wird [19-21].

Danksagung

Mein Dank gilt Simone Weigel, Leo Hörner, Stefan Walheim, Thomas Koch und Kerstin Länge aus dem Forschungszentrum, sowie Mattias Rudh (Q-Sense AB, Göteborg) und Fredrik Höök (Chalmers University of Technology, Göteborg) für ihre freundschaftliche und engagierte Unterstützung.

Anhang

Die Frequenz- und Dämpfungsänderung Δf bzw. ΔD ergeben sich wie folgt:

$$\Delta f = \frac{\text{Im}(\beta)}{2\pi t_Q \rho_Q} \quad \Delta D = -\frac{\text{Re}(\beta)}{\pi f t_Q \rho_Q}$$

$$\beta = \xi_1 \cdot \frac{2\pi f \eta_F - i\mu_F}{2\pi f} \cdot \frac{1 - \alpha \cdot \exp(2\xi_1 d_F)}{1 + \alpha \cdot \exp(2\xi_1 d_F)} \quad \alpha = \frac{\xi_1 \cdot \frac{2\pi f \eta_F - i\mu_F}{2\pi f \eta_L} + 1}{\xi_2 \cdot \frac{2\pi f \eta_F - i\mu_F}{2\pi f \eta_L} - 1}$$

$$\xi_2 = \sqrt{-\frac{(2\pi f)^2 \rho_F}{\mu_F + i2\pi \eta_F}} \quad \xi_1 = \sqrt{i \frac{2\pi f \rho_L}{\eta_L}}$$

Subscripte Q, F und L bezeichnen Quarz, Film (Adsorbat) und Flüssigkeit.

Literatur

- [1] G. Sauerbrey,
Z. Phys. 155, 206, (1959)
- [2] P.L. Konash, et al.,
Anal. Chem. 52, 1929, (1980)
- [3] K.K. Kanazawa, et al.,
Anal. Chim. Acta. 175, 99, (1985)
- [4] S.J. Martin, et al.,
Anal. Chem. 63, 2272, (1991)
- [5] F. Höök, et al.,
Anal. Chem. 73, 5796, (2001)
- [6] M.V. Voinova, et al.,
Physica Scripta 59, 391, (1999)
- [7] K. Länge, et al.,
Anal. Chem. in press, (10/2003)
- [8] M. Källtorp, et al.,
Biomaterials 20, 2123, (1999)
- [9] T.P. Vikinge, et al.,
Biosens. Bioelectron. 15, 605, (2000)
- [10] M. Santin, et al.,
Biomaterials 20, 1245, (1999)
- [11] R.D. Oleschuk, et al.,
Biomaterials 21, 1701, (2000)
- [12] A. Welle, et al.,
Biomed. Microdev. 4, 33, (2002)
- [13] A. Welle,
*Nachrichten - Forschungszentrum
Karlsruhe* 33, 295, (2001)
- [14] G. Nimeri, et al.,
*Colloids and Surfaces B:
Biointerfaces* 11, 155, (1998)
- [15] J. Wegener, et al.,
Eur. Biophys. J. 28, 26, (1998)
- [16] J. Piehler, et al.,
Biosens. Bioelectron. 11, 579,
(1996)
- [17] K.A. Marx, et al.,
Biosens. Bioelectron. 16, 773,
(2001)
- [18] T. Zhou, et al.,
Biotechnol. Prog. 16, 268, (2000)
- [19] A. Folch, et al.,
Annu. Rev. Biomed. Eng., 227,
(2000)
- [20] A.L. Plant, et al.,
Langmuir 19, 1449, (2003)
- [21] M. Tirrell, et al.,
Surf. Sci. 500, 61, (2002)