

QCM-D Technologie als neue Plattform in der Bioanalytik

Dr. Paula Braun, Dr. Hartmut Drechsel, Dr. Albert Sterck, Jin Zhang, Gudrun Prepens, Thomas Reiner, Dr. Frank Gehring
3T-analytik, GmbH & Co.KG

Die QCM-D-Technologie ist eine Oberflächen-empfindliche Echtzeit-Technik zur Überwachung und Charakterisierung von (Bio-)Schichten auf einer Oberfläche im Hinblick auf Adsorptions- und Desorptionsereignisse, molekulare Wechselwirkungen und strukturelle Eigenschaften. QCM-D gewinnt zunehmend an Bedeutung für die Untersuchung biologischer Vorgänge [1-4], beispielsweise in der Nano- oder Zellbiologie. Interaktionen zwischen Molekülen sowie Zellen sind an der Zell- und Sensoroberfläche *in situ* im natürlichen belassenen Zustand beobachtbar und gewähren damit einen einmaligen Einblick in die komplexe Welt der Biologie.

Das Messprinzip

Das Herzstück der QCM-D Technologie bildet der Sensor, der aus einem Schwingquarz besteht. Dieser Schwingquarz wird durch eine elektrische Wechselspannung zu mechanischen Schwingungen angeregt. Die Ablagerung von kleinsten Partikeln, Proteinen, Bakterien, Viren oder Zellen an der Oberfläche verändert diese Schwingung in ihrer Frequenz und/oder Amplitude bzw. Dissipation. Dadurch kann die Anlagerung von einem Milliardstel Gramm [5] sowie die Änderung der Materialeigenschaft von angelagerten Schichten registriert werden [6]. Die Applikationen erstrecken sich von der Charakterisierung von Polymerschichten bis hin zu medizinischen Fragestellungen wie z.B. Detektion von Erregern, Autoimmunerkrankungen, Proteinwechselwirkungen, Zellkulturen und des Gerinnungsstatus. Auf besondere Weise wird die Entstehungsdynamik von Zellnetzwerken oder makromolekularer 3D Strukturen sichtbar gemacht. Änderungen des Frequenz- und Dissipationsparameter korrelieren mit den Bindungs-, Interaktions- und strukturellen Eigenschaften der angelagerten Schichten. In Abb.1 sind schematisch die Frequenz- und Dissipations-(bzw. Dämpfung-)Änderung für drei charakteristische Fälle aufgeführt. Im ersten Fall führt die dünne starre homogene Schichte durch Bindung und Anordnung kleiner globulärer Moleküle zu einer Frequenzänderung bei

unveränderter Dissipation (gleichbleibende Viskoelastizität) (Abb.1A). Eine reine Viskositätsänderung (Newton'sche Flüssigkeiten) durch Benetzung mit Wasser im Vergleich zu Glycerin resultiert dagegen charakteristischerweise in einer betragsgleichen Änderung der Frequenz und Dissipation (Abb.1B). Die Anlagerung großer, „weicher“ Moleküle, wie z.B. Immunzellen und die Bildung bakterieller Biofilme, führt ebenfalls zu einer Frequenz- und Dissipationsverschiebung in entgegengesetzter Richtung, jedoch mit unterschiedlichen Amplituden (Abb.1C). Die getrennte Aufzeichnung von Frequenz und Dissipation erlaubt die genauere Analyse der Vorgänge am Sensor. Insbesondere die zusätzliche Erfassung des Dissipationsparameters ermöglicht die Beschreibung von Vorgängen in „weichen“ Schichten (Abb.1,2) [7-9].

Die Anwendung

Biofilme: Ankopplungs- und Wachstumsdynamik lebender Bakterienzellen

Bakterienzellen besitzen die Fähigkeit über komplexe interzelluläre Kommunikationsnetze, über Artgrenzen hinaus zu interagieren [10]. Diese Fähigkeit fördert die Koexistenz verschiedenster Mikroorganismen in Konsortien (Bakterien, Pilze, Hefen, Protozoen, etc.). Die Einbettung dieser Zellen in eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) führt zur Bildung sogenannter Biofilme. Die

enge unbewegliche Aggregation der Zellen miteinander und gleichzeitige Bindung an die Substrat-Grenzflächen [10] ermöglicht u.a. optimale Anpassung an eine breite Palette von Umweltreizen. Hohe Widerstandsfähigkeit gegen extreme Bedingungen und zunehmend auch gegen antimikrobielle Wirkstoffe im medizinischen Umfeld wird dadurch bedingt. Im menschlichen Körper sind das

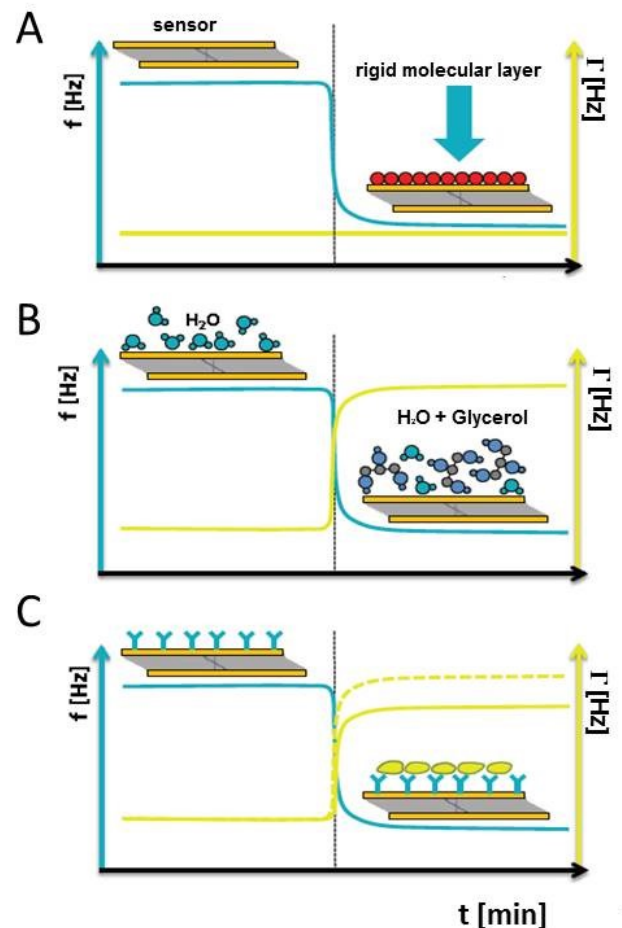


Abb. 1: QCM-D-Technologie an biologischen Proben. Idealisierter Signalverlauf der wichtigsten Parameter der QCM-D Technologie: Resonanzfrequenz, f , (blaue Linie) und Dämpfung, Γ , (bzw. Dissipation) (gelbe Linie). Die Beziehung zwischen Dämpfung und Dissipation, D , ist gegeben durch $D = 2\Gamma/fr$ (siehe www.3t-analytik.de/technologies/qcm-d/what-qcm-d). Verlauf bei Bildung einer dünnen, starren Schicht aus kleinen globulären Molekülen (rote Kreise) (A), bei Viskositätsänderung einer rein-Newton'schen Lösung (B) und einer viskoelastischen Schicht aus z.B. Bakterien- oder Immunzellen (gelbe Ovale) (C).

Auftreten von Biofilmen häufig Vorläufer von lebensbedrohlichen Infektionen [11]. Nicht zuletzt wegen der Assoziation mit einem hohen Anteil an nosokomialen Infektionen mit potentiell tödlichem Ausgang, sind Biofilme zentraler Gegenstand aktueller Forschungsschwerpunkte.

Die mit Prävalenz in Krankenhäusern anzutreffenden Biofilm-bildenden *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) sind nur mit großen Schwierigkeiten zu behandeln und wurden daher als Zielorganismus für diese Studie gewählt [12]. Ein Portfolio effektiver Maßnahmen zur Eindämmung der medizinisch bedeutsamen Biofilme ist gefordert. Dazu ist ein grundlegendes Verständnis der schleimigen Zellverbände notwendig. Die QCM-D Technologie ist ein ausgezeichnete Ansatz für diese Studien. Die Biofilm-Morphologie sagt Wesentliches aus über den Funktionszustand, die Organismen-Vielfalt, Wachstumsdynamik und Abbau, sowie die Beständigkeit gegenüber Bioziden, wie Desinfektionsmitteln.

Es wurde bereits demonstriert, dass per QCM-D kleinste Masseänderungen ($\geq 5\text{ng}$) verbunden mit der Bakterienbesiedlung, aber auch Änderungen in dem physikalischen Zustand der zellulären Schichten, in einer hochempfindlichen, lokalisierten Umgebung in Echtzeit detektiert werden können [13-15].

In Abb.2 spiegeln die Änderungen des Sensorsignals die Prozesse an der Grenzfläche zur Bakterienlösung und der Zellzustände wieder [16]: In Phase I beginnt die initiale Bakterienadhesion / Besiedelung und in Phase II kommt es zur Entstehung des Biofilms und damit verbundene Viskositätszunahme durch Hydratation aufgrund der Ausbildung der EPS-Matrix. In Phase III wird die Detergenz-induzierte Ablösung des Films von der Sensoroberfläche aufgezeichnet. Die beobachtete Verschiebung der Resonanzfrequenz ermöglicht eine genaue Abschätzung der Zu- bzw. Abnahme der angehefteten Bakterien, die mit Zugabe des Mediums kontinuierlich ansteigt, (Abb.2, Phase II). Die simultane Verschiebung des Dissipationssignals in entgegengesetzter Richtung ist signifikant erhöht gegenüber der Frequenzverschiebung und indiziert die Zunahme der Viskoelastizität der Schicht, typisch für die fortschreitende Ausbildung der wasserhaltigen EPS (Phase II). Der dominante vorübergehende Anstieg in der Dissipation in den ersten Minuten der Adhesion deutet auf eine transiente, hoch-elastische Bakterienanordnung hin (Phase I). Es ist bekannt, dass *P. aeruginosa* in der Zelladhäsionsphase bei dem sogenannten „surface-walk“ zunächst mit dem Zell-Pol transient an der Oberfläche entlang wandert, während der Zellkörper im Medium verbleibt [17, 18]. Wie in Abb.2 (Inset) gezeigt, geht diese Phase innerhalb von

ca. 30-40 min in eine stabile Phase mit deutlich reduzierter, stabiler Hydrodynamik über. Dies deutet darauf hin, dass der Besiedlungsprozess in die konstante Anheftung übergegangen ist. Die Ablösung der Bakterien von der Oberfläche per SDS Detergenz wird durch die Rückkehr zur Ausgangsgrundlinie der Resonanzfrequenz und der Dissipation widergespiegelt (Abb. 2, Phase III). Die QCM-D Technologie stellt eine gänzlich neue Plattform zur Untersuchung der Mechanismen von Biofilmbildung und Funktion und insbesondere für das Screening von Substanzen zur effektiven Entfernung des Biofilms zur Verfügung.

Tissue Engineering: Funktionalisierung biomimetischer Nanomaterialien

Biomimetische Zell-Matrix-Konstrukte angelehnt an die komplizierte nanofibrilläre Architektur der natürlichen extrazellulären Matrix (ECM) haben bereits bemerkenswerte Erfolge bei dem Wiederaufbau von Geweben in Tiermodellen per Tissue-Engineering erzielt. Eine beständige Gewebereparatur erfordert im Idealfall Matrix-Konstrukte, die mit bioaktiven Molekülen, einschließlich Wachstumsfaktoren wie knochenmorphogenetischen Proteinen, ausgestattet sind, um die notwendige spezifische ECM-Produktion zu beschleunigen und die Gewebeategration zu fördern. Große Fortschritte sind aus der Kombination der jüngsten Errungenschaften in der Konstruktion von Nano-konstruierten EMC-Analogen und der Anreicherung der Oberfläche dieser Nanomaterialien mit bioaktiven Verbindungen zu erwarten [19, 20]. Hier wird die QCM-D als Echtzeit-Monitor für die Anlagerung von funktionalen Aminosäuren und Wachstums-hormonen auf nanofaserige, poly- ϵ -Kaprolacton (PCL) beschichtete Partikel eingesetzt [21].

Die Resonanzfrequenzverschiebung spiegelt die stufenweise verlaufende Beschichtung mit den Linker-Aminosäuren, polyLysin und polyGlutamat, an das PCL-Nanofasergestüt und die Auffüllung der Nanozisternen mit Fibroblasten FGF2-Wachstumsfaktoren für die abschließende Bioaktivierung wider (Abb. 4A) [21, 22].

Fazit

Die QCM-D Technologie stellt durch die universelle Einsetzbarkeit und hohe Flexibilität eine sehr aktuelle, extrem interessante Analysemethode dar. Sie bietet eine herausragende Empfindlichkeit bei hoher Zuverlässigkeit für die Echtzeit Detektion von Bindungsreaktionen und Zustandsänderungen biologischer, gänzlich im natürlichen Zustand belassener zellulärer Proben. QCM-D findet heute bei synthetischen, funktionellen Mate-

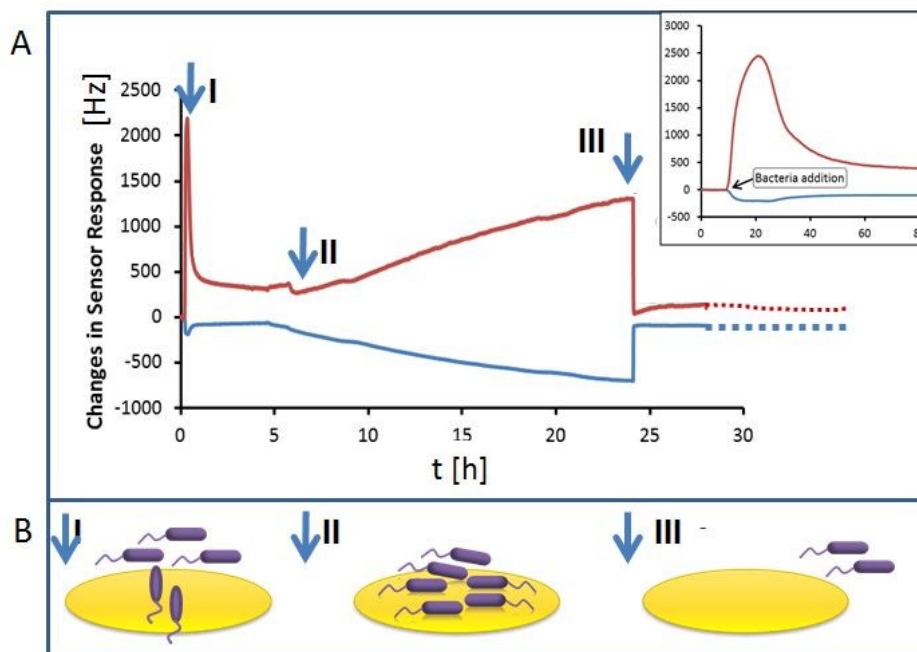


Abb. 2: Biofilm Ankopplungs- und Wachstumsdynamik per QCM-D-Technologie. (A) Verlauf des Frequenz- (blau) und Dämpfungssignals (rot) während *P. aeruginosa* Einleitung (I), Bakterien-Wachstum und Biofilm-Entstehung (II) und Biofilm-Ablösung (III). Das Inset zeigt den Verlauf der Ankopplung unmittelbar nach Bakterienzugabe (schwarzer Pfeil; $t=0-60$ min). Die Pfeile markieren die Zugabe der Bakterien, des Wachstums-Mediums und des Detergenz (SDS). (B) Schematische Darstellung der Bakteriendynamik an der Sensoroberfläche: I: Bakterien-Einleitung: Adhesion, II: Kontinuierliche Medium-Zugabe: zunehmende Bakterienmasse und Aufbau der extrazellulären polymeren Substanzen, III: Detergenz-Zugabe: Ablösung des Bakterienfilms [16].

riale, wie Polyelektrolyten oder Nanomaterialien ein ebenso breites Anwendungsgebiet. Das patentierte spezielle 3T-analytik Design des Sensors sorgt für eine einfache Handhabung mit stressfreien Bedingungen auf dem Quarzkristall. Mit einem einzigartigen Portfolio an unterschiedlichen Quarzbeschichtungen, beispielsweise mit elementaren Metallen (Ti, Ag, Cu, Pt, etc.), Oxiden (SiO₂, Al₂O₃, etc.), Hydroxyapatiten oder Polymeren, sind die 3T qCell Instrumente optimal ausgerüstet jeder noch so speziellen Anforderung zu genügen. Durch die einfache, leistungsstarke Software per vollautomatischer Gerätesteuerung, Signalerfassung und -verarbeitung, handhaben Sie die Messungen und erhalten schnelle Antworten. Die zahlreichen Vorteile und die bisher unerreichte Optimierung der Geräte tragen dazu bei, dass die QCM-D-Technologie auch in Zukunft einen immer größeren Stellenwert unter den analytischen Methoden zur Untersuchungen molekularer Interaktionen und Oberflächenphänomen einnimmt. Die Applikationen reichen heute von der komplexen Welt der Biologie und Umweltdiagnostik, über fundamentale Fragen der Zell-Zellinteraktionen, bis zur pharmazeutischen Entwicklung sowie medizinischen Diagnostik und Prognose.

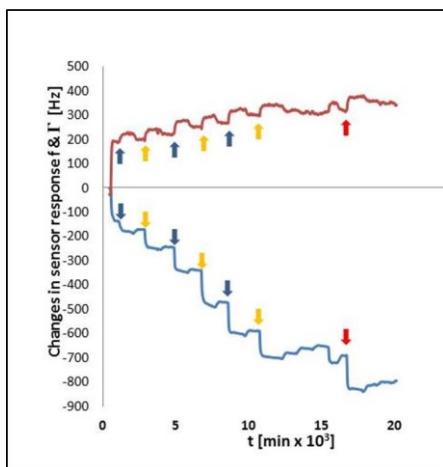


Abb. 3: Bioaktivierung der PCL Nanofasern in Richtung biomimetischer Zell-Matrix-Konstrukte. Resonanzfrequenzverschiebung (blau) und Dämpfungs- (bzw. Dissipations-)änderung (rot) während der stufenweisen Beschichtung des Nanofasengerüsts mit poly-Aminosäuren, pLys (blaue Pfeile), pGlu (gelbe Pfeile) und abschließender Bioaktivierung per Fibroblasten FGF2-Wachstumsfaktoren (roter Pfeil) [22].

Literatur

- [1] Hussain M. 2016 'Molecular Imprinting' as Multidisciplinary Material Science: Today and Tomorrow. *UK J Pharmaceut Biosci*, 4: 121-132.
- [2] Campos J, Jiménez C, Trigo C, Ibarra P, Rana, Deepthi, Thiruganesh R, Ramalingam Murugan, Haidar Z S. 2015 Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring: A Powerful Tool for BioNanoScience and Drug Discovery. *J Bionanosci*, 9: 249-260.
- [3] Hussain M, Northoff H, Gehring FK. 2015 QCM-D providing new horizon in the domain of sensitivity range and information for haemostasis of human plasma. *Biosens Bioelectron*, 66: 579-84. doi: 10.1016/j.bios.2014.12.003.
- [4] Dixon CM. 2008 Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring: Enabling Real-Time Characterization of Biological Materials and Their Interactions. *J Biomol Tech*, 19: 151-158.
- [5] Sauerbrey G. 1959 Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Z Phys*, 155: 206-222.
- [6] Kanazawa K, Gordon JG. 1985 The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with a liquid. *Anal Chim Acta*, 175: 99-105.
- [7] Pomorska A, Shchukin D, Hammond R, Cooper MA, Grundmeier G, Johannsmann D. 2010 Positive frequency shifts observed upon adsorbing micron-sized solid objects to a quartz crystal microbalance from the liquid phase. *Anal Chem*, 82: 2237-2242.
- [8] Dybwad GL. 1985 A sensitive new method for the determination of adhesive bonding between a particle and a substrate. *J Appl Phys*, 58: 2789-2790.
- [9] Gehring, FK. 2006 Schwingquarzensensorik in Flüssigkeiten -Entwicklung eines Blutanalysegerätes, Cuvillier Verlag, Göttingen, ISBN 9783865378729.
- [10] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999 Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284: 1318-1322.
- [11] Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP. 2000 Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*, 407: 762-764.
- [12] Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. 2009 Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Diseases*, 48: 1-12.
- [13] Olsson AL, Mitzel MR, Tufenkji N. 2015 QCM-D for non-destructive real-time assessment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm attachment to the substratum during biofilm growth. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 136: 928-934. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.10.032.
- [14] Olofsson AC, Hermansson M, Elwing H. 2005 Use of a quartz crystal microbalance to investigate the antiadhesive potential of Nacetyl-L-cysteine. *Appl Environ Microbiol*, 71: 2705-2712.
- [15] Olsson ALJ, van der Mei, HC, Busscher HJ, Sharma PK. 2008 Influence of cell surface appendages on the bacterium-substratum interface measured real-time using QCM-D. *Langmuir* 25: 1627-1632.
- [16] Sismaet HJ, Abadian PN, Goluch ED. 2014 Monitoring Bacterial Biofilm Growth and Removal. Department of Chemical Engineering, Northeastern University, Boston, MA, USA. *Appl. Note*.
- [17] Castelain M, Koutris, E, Andersson M, Wiklund, K, Björnham O, Schedin, S, Axner O. 2009 Characterization of the Biomechanical Properties of T4 Pili Expressed by *Streptococcus pneumoniae* – A Comparison between Helix-like and Open Coil-like Pili. *Chem Phys Chem*, 10: 1533-1540, DOI: 10.1002/cphc.200900195.
- [18] Belas R, 2014 Biofilms, flagella, and mechano-sensing of surfaces by bacteria. *Trends Microbiol* 22: 517-527.
- [19] Zhang S, 2003 Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nat. Biotechnol*, 21, 1171-1178.
- [20] Jessel N, Oulad-Abdelghani M, Meyer F, Lavalle P, Haykel Y, Schaaf P, Voegel JC. 2006, *Proc Natl Acad Sci US A*, 103, 8618-8621.
- [21] Waslathanthri DP, Kuhn L, Rusling JF. 2013 Multilayer Bio-Films for bone tissue regeneration. *University of Connecticut Health Center*, Storrs CT. *Appl. Note*.
- [22] Eap S, Richert L, Lemoine S, Kalaskar D, Demoustier-Champagne S, Atmani H, Mély Y, Fioretti F, Schlatter G, Kuhn L, Ladam G, Benkirane-Jessel N. 2014 Osteogenetic properties of electrospun nanofibrous PCL scaffolds equipped with chitosan-based nanoreservoirs of growth factors. *Macromol Biosci*. 14: 45-55. doi: 10.1002/mabi.201300283.