Fraunhofer
IZM

Thilo Förster

Hydrogelwellenleiter als Basis eines Biosensors

Dissertation

berlin

TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Hydrogelwellenleiter als Basis eines Biosensors

vorgelegt von

Diplom-Physiker
Thilo Philipp Förster

aus München

von der Fakultät IV – Elektrotechnik und Informatik
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften
- Dr.-Ing. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:
Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Clemens Gühmann
Berichter: Prof. Dr.-Ing. Karlheinz Bock
Berichter: Prof. Dr. med. Dr.-Ing. habil. Erich Wintermantel

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 05. Juli 2010

Berlin 2010

D 83

Meinen Eltern

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird die Realisierung eines neuen optischen Transducer-Konzepts für einen implantierbaren Biosensor vorgestellt. Ziel ist es, dieses Konzept zukünftig in einem Implantat zur Blutzuckerbestimmung von Diabetespatienten einzusetzen.
Das Konzept besteht aus fluoreszierenden Sensorproteinen immobilisiert in einem Hydrogelwellenleiter, der die Basis des Sensors bildet. Zum ersten Mal wird so Hydrogel nicht nur als Immobilisierungsmatrix für Sensorproteine verwendet, sondern gleichzeitig auch als optischer Wellenleiter, um das für die Fluoreszenzerzeugung notwendige Anregungslicht direkt zu den Sensorproteinen zu führen. Auf diese Weise wird eine effiziente Energienutzung realisiert, die gerade für implantierbare Sensoren von hoher Bedeutung ist.
Das Konzept wird anhand kalziumsensitiver Proteine demonstriert, da sich zum jetzigen Zeitpunkt die Sensorproteine für Glukose noch in Entwicklung befinden. Das Sensorprotein reagiert auf die reversible Bindung mit Kalzium mit einer Konformationsänderung. Diese Konformationsänderung führt zu einer Änderung des Emissionsspektrums des Sensorproteins, basierend auf dem Försterenergietransfer, hier im speziellen dem Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET). Zur Messung des FRET-Verhaltens der Sensorproteine wurde der Hydrogelwellenleiter in einem miniaturisierten optischen Messaufbau integriert. Dieser Sensordemonstrator wurde charakterisiert und folgende Spezifikationen experimentell ermittelt. Der Sensor besitzt:

- einen linearen Messbereich von 0 – 1000 µM Ca^{2+} bei einem gesamten Messbereich von 0 - 5000 µM Ca^{2+},
- ein Auflösungsvermögen von 316 µM Ca^{2+},
- eine Antwortzeit von 7,33 Minuten,
- eine Signalstabilität der Fluoreszenzproteine von 1 Jahr im anvisierten Messregime.

Anschließend folgte auf den Sensordemonstrator aufbauend dessen Weiterentwicklung zu einem vollständigen Sensorimplantat unter Berücksichtigung des notwendigen biokompatiblen „Packagings“. Das Implantat besteht aus einer mit Silikon verkapselten Transducer-Einheit. In der Transducer-Einheit befindet sich der Hydrogelwellenleiter. Dort findet der diffusive Austausch der Kalziumionen mit der Körperflüssigkeit statt und wird das optische Sensorsignal gemessen. Die Funksteuerung und die Batterie zur Stromversorgung des Implantats finden in einer aufgeschraubten PEEK-Kapsel Platz. Alle Materialen wurden parallel zur Implantatentwicklung in Ratten implantiert, um die Biokompatibilität zu testen. Abschließend wurde ein Implantat realisiert mit:

- einem Durchmesser von 21 mm bei einer Länge von 69 mm.
- einer Betriebsdauer von 8 Monaten bei einer Messanzahl von 96 pro Tag, d.h. einer Messung alle 15 Minuten.

Ausblickend ist dargestellt, wie durch ein alternatives Implantatdesign die Fremdkörperreaktion der Ratten auf das Implantat verbessert werden kann und dass es möglich ist, das System zur Glukosemessung anzuwenden, wenn der Transfer eines neuen glukosesensitiven Proteins in den Hydrogelwellenleiter gelingt.

Abstract

In this work the realization of a new optical transducer concept for an implantable biosensor is shown. The long term objective of this work is to use this new concept in an implant for measuring the blood glucose level of diabetes patients.
The concept consists of fluorescent sensor proteins immobilized in an optical hydrogel waveguide which forms the basic element of the sensor. For the first time hydrogel is used not only as an immobilisation matrix for the sensor proteins but simultaneously as an optical waveguide. Inside this waveguide the excitation light is guided directly to the fluorescence sensor proteins. In this way an effective use of energy is realized which is especially important for implantable sensors.
The concept is demonstrated with calcium sensitive proteins, because currently glucose sensitive proteins are still under development. The sensor protein reacts with a conformational change due to the reversible binding of calcium to the protein. This conformational change of the sensor protein effects a change in its emission spectrum based on fluorescence resonance energy transfer (FRET). To measure the behaviour of the FRET sensor proteins immobilized in the hydrogel waveguide, the hydrogel waveguide was integrated in a miniaturized optical sensor setup. This sensor demonstrator was characterized and the following specifications were determined:

- a linear measurement range between 0 µM and 1000 µM Ca^{2+} and a total measurement range from 0 µM to approximately 5000 µM Ca^{2+},
- a resolution of 316 µM Ca^{2+},
- a response time of 7,33 minutes,
- a signal stability of the sensor proteins of approximately 1 year under the target measurement regime.

Subsequently the sensor demonstrator was developed further into a complete sensor implant, taking also the required biocompatible packaging in consideration. The implant consists of a silicone encapsulated transducer unit. In the transducer unit the hydrogel waveguide is located. There the diffusive exchange of the calcium ions with the body fluid takes place and the optical sensor signal is measured. The radio control electronics and the battery for the power supply of the implant are placed in a PEEK can which is screwed on the transducer unit. All materials were implanted in rats to test the biocompatibility in parallel with the implant development. Finally an implant was realized with the following properties:

- a diameter of 21mm and a length of 69 mm,
- an operating time of 8 months when performing 96 measurements per day, i.e. 1 measurement every 15 minutes.

The outlook indicates how the foreign body reaction of the rats to the implant may be reduced by an alternative implant design and that it will be possible to use the implant for glucose monitoring, if a new glucose sensitive protein is functional immobilized in the hydrogel waveguide.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung **7**

Abstract **8**

Inhaltsverzeichnis **9**

1 Einleitung **11**

2 Grundlagen **15**
2.1 Hydrogelwellenleiter 15
2.2 Sensorproteine und Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) 16
2.3 Detektionsprinzip 19

3 Hydrogele als optische Wellenleiter **23**
3.1 Herstellung der Hydrogelwellenleiter 23
3.1.1 Hydrogelchemie 23
3.1.2 Hydrogelwellenleiter 24
3.2 Optische Charakterisierung der Hydrogele 25
3.2.1 Transmissionsmessungen 25
3.2.2 Verlustmessungen 27
3.2.3 Brechungsindexbestimmung 30

4 Sensorproteine in Hydrogelwellenleitern **35**
4.1 Grundlegende Charakterisierung der Fluoreszenzproteine 35
4.1.1 Absorptionsquerschnitte der Proteine 35
4.1.2 Auswahl der Anregungslichtquelle 37
4.1.3 Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenz 39
4.2 Proteine im synthetischen Hydrogelwellenleiter 40
4.2.1 Messmethode und Aufbau 40
4.2.2 Abhängigkeit des FRET-Signals von der Kalziumkonzentration 42
4.2.3 Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D 44
4.2.4 Stabilität der Proteine im Hydrogelwellenleiter 46

5 Biosensor **49**
5.1 Konstruktion des Sensordemonstrators 49
5.2 Integration 50
5.2.1 Lichteinkopplung 50
5.2.2 Optisches Detektionssystem 54
5.2.3 Gesamtaufbau des Demonstrators 58
5.3 Charakterisierung 59
5.3.1 Sensitivität 59
5.3.2 Antwortzeit 64
5.3.3 Reproduzierbarkeit 64
5.4 Theoretische Betrachtung 65
5.4.1 Separation der Diffusionsgleichung 66

5.4.2 Massenwirkungsgesetz 68
5.4.3 FRET-Verhältnis und Sensorsignal 69

6 Implantat 71
6.1 Materialauswahl 71
6.1.1 Hydrogele 71
6.1.2 Silikon und PEEK 72
6.1.3 Fazit der Implantationsversuche der Materialien 73
6.2 Konstruktion und Aufbau 73
6.2.1 Optischer Transducer 74
6.2.2 Implantathülle 76
6.2.3 Implantation der Außenhülle 77
6.2.4 Hydrogelmembran 78
6.2.5 Implantation der Membran 79
6.2.6 Assemblierungsprozess 80
6.2.7 Dichtheitstest 83
6.3 Elektronik 84
6.3.1 Systemarchitektur 84
6.3.2 Messablauf 85
6.3.3 Anregungs- und Detektionselektronik 86
6.3.4 Steuerungseinheit 88
6.4 Funktionstest des Implantatprototypen in vitro 89
6.4.1 Antwortzeiten 89
6.4.2 Betriebsdauer 91

7 Ausblick 95
7.1 Technologiebetrachtung und Optimierungsansätze 95
7.2 Alternativer Sensoraufbau 96
7.3 Glukosesensitives Protein 98

Anhang 101
A.1 Berechnungen 101
A.2 Herstellung der Hydrogelwellenleiter 102
A.3 Messlösungen 104
A.4 Implantierversuche 104

Literaturverzeichnis 107

1 Einleitung

In dieser Arbeit wird ein neues Sensorkonzept für einen implantierbaren Sensor erforscht. Die wichtigsten Anforderungen, die an ein Sensorimplantat gestellt werden, sind Funktionalität und Verträglichkeit über einen Zeitraum von einem Monat bis zu mehreren Jahren. Das neue Konzept soll es ermöglichen einen Sensor für mindestens ein Jahr zu betreiben, der stabile und zuverlässige Werte ermittelt. Anwendung finden soll es später in einem implantierbaren Glukosesensor mit dem Diabetespatienten ihren Blutzuckerspiegel überwachen können, ohne sich wie bisher meist üblich zur Blutprobenentnahme in die Fingerkuppe stechen zu müssen.

Allgemein lässt sich die Funktionalität des Sensors als den Nachweis der Konzentration eines Analyten in einer Flüssigkeit definieren. Zur Messung von Analyten in biologischen Flüssigkeiten wie Blut, interstitielle Flüssigkeit oder Wasser eignen sich auf biologischen Rezeptormolekülen basierende optische Detektionsmethoden sehr gut [1]. Bei diesen Verfahren stellen Rezeptormoleküle die Sensitivität und die Selektivität der Detektion eines Analyten oder einer Analytkonzentration sicher, indem sie mit dem Analyten reagieren. Um diese Reaktion festzustellen, ist eine Umwandlung der chemischen Reaktion in ein verarbeitbares optisches und elektrisches Signal erforderlich. Das erfolgt mit Hilfe eines physikalischen Signalwandlers, eines „Transducers". Ein entsprechender Biosensor arbeitet somit nach dem Prinzip, dass zunächst eine biologische oder biochemische Reaktion erfolgt und anschließend diese Reaktion in ein messbares Signal umgewandelt wird.

Eine große Herausforderung bei der Entwicklung von implantierbaren Biosensoren besteht darin, die biologischen Rezeptormoleküle und den physikalischen Signalwandler so zu koppeln, dass ein möglichst hoher und effizienter Signalübertrag zwischen beiden stattfindet, und so eine ausreichend lange Betriebsdauer ermöglicht wird.

Der Lösungsansatz in dieser Arbeit besteht darin, biokompatible Hydrogele in wässriger Umgebung gleichzeitig als Lichtwellenleiterkern und Immobilisierungsmatrix für Fluoreszenzsensormoleküle einzusetzen und damit die biologischen Rezeptormoleküle und den physikalischen Signalwandler zu koppeln [2].

Das Messprinzip des Biosensors basiert auf der optischen Detektion des Fluoreszenzspektrums der Sensorproteine, welches sich in Abhängigkeit der Analytkonzentration, basierend auf dem Förstertransfer, ändert. Die Messungen werden mit dem Analyten Kalzium durchgeführt und evaluiert [3]. Die untersuchte Methode bietet allerdings auch die Möglichkeit sie auf weitere Analyten wie zum Beispiel Glukose anzuwenden.

Das gesamte Sensorsystem ist wie folgt aufgebaut: Das zentrale Element des Sensorsystems zur optischen Fluoreszenzmessung bildet der Hydrogelwellenleiter in dem die fluoreszierenden Sensorproteine immobilisiert sind, siehe Abbildung 1.1. Der Hydrogelwellenleiter bildet ein freistehendes Element und ist im Messbereich der Detektoren vollständig von Flüssigkeit umgeben. Nur so ist die Funktion als Wellenleiter gewährleistet. Innerhalb des Wellenleiters findet dann eine reversible chemische

Bindung des Analyten mit den Sensorproteinen statt und deren Emissionsspektrum ändert sich entsprechend der Analytkonzentration.
Das zur Fluoreszenzerzeugung notwendige Anregungslicht wird mittels einer Laserlichtquelle stirnseitig in den Hydrogelwellenleiter eingekoppelt und regt so die Fluoreszenz der Proteine an.

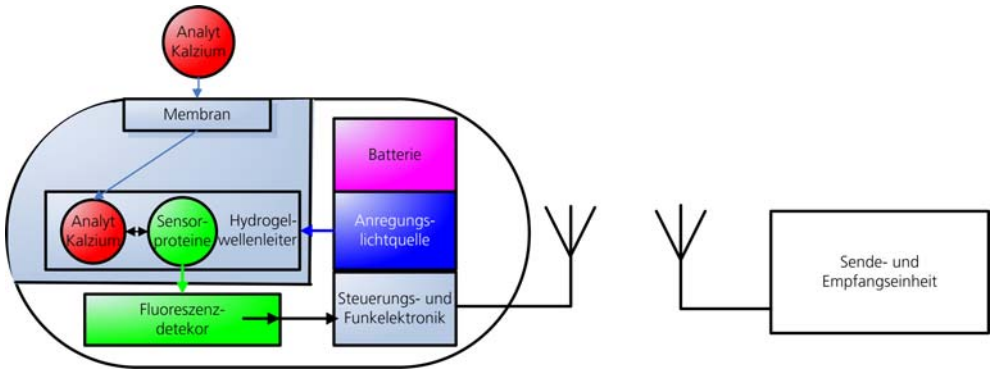


Abbildung 1.1: Schemazeichnung des Sensorkonzepts.
Der Hydrogelwellenleiter befindet sich in einer flüssigkeitsgefüllten Kammer, die über eine Membran mit der Umgebungsflüssigkeit in Kontakt steht. Im Hydrogelwellenleiter sind die Sensorproteine immobilisiert. Bei der Eindiffusion des Analyten in die Kammer und den Wellenleiter reagiert das Protein mit dem Analyten. Dies führt zu einer Änderung des Emissionsspektrums des Proteins, welches mit den Fluoreszenzdetektoren gemessen wird.
Die Detektoren befinden sich mit der Fluoreszenzanregungslichtquelle, der Funk- und Steuerelektronik und der Batterie in einem von der Messkammer getrennten Kompartiment.
Die gemessenen Daten werden per Funk an eine externe Sende- und Empfangseinheit übertragen.

Dadurch, dass das Licht in den Hydrogelwellenleiter eingekoppelt und geführt wird, gelangt das für die Fluoreszenz notwendige Anregungslicht innerhalb des Wellenleiters direkt zu den sensitiven Fluoreszenzmolekülen. So erfolgt die Fluoreszenzanregung mit hoher Effizienz, im Gegensatz zu anderen auf Wellenleitern basierten Verfahren, die beispielsweise mit Hilfe des Evaneszenzfeldes indirekt Fluoreszenz- oder Oberflächenplasmonenanregung erzeugen [4], [5], [6].
Ein weiterer Vorteil des geführten Lichts im Wellenleiter ist, dass es von den Signaldetektoren fern gehalten wird. Die Photodetektoren befinden sich entlang der Achse des Wellenleiters und sind senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des im Wellenleiter geführten Anregungslicht positioniert, welches daher aufgrund der Geometrie an den Detektoren vorbei geleitet wird. Das aus dem Wellenleiter isotrop ausgesendete Fluoreszenzlicht fällt dagegen ungehindert auf die Detektoren. So wird dort wird mit Hilfe von optischen Filtern nur das von den Proteinen ausgesendete Fluoreszenzlicht gemessen.
Zur Messung eines Analyten in einer Flüssigkeit muss der Wellenleiter mit der Flüssigkeit in Kontakt stehen. Dazu werden innerhalb des Sensors zwei Kompartimente realisiert. Ein Teil ist mit einer Membran versehen, so dass Flüssigkeit von außen in den Sensor zum Wellenleiter gelangt. Der andere Teil, in dem sich die gesamte Elektronik und die Stromversorgung befinden, ist vom sensitiven Bereich flüssigkeitsdicht getrennt.

Dieses Konzept eines kompakten, effizienten, optischen, implantierbaren Biosensors lässt sich demnach in vier wesentliche Komponenten einteilen:

- in die Hydrogele, die die Fluoreszenzproteine tragen sowie das Anregungslicht führen und so die Hydrogelwellenleiter bilden,
- in die biologische Rezeptorsubstanz, hier kalziumsensitive Fluoreszenzproteine, die in Abhängigkeit der Kalziumkonzentration ihre optischen Eigenschaften ändern,
- in das auf erstgenannte Komponenten abgestimmte optoelektronische Messsystem, das dann in funktioneller Einheit mit den Sensorproteinen im Hydrogelwellenleiter den Biosensor bildet,
- in das Implantat, das unter Berücksichtigung einer biokompatiblen, implantierbaren Aufbau- und Verbindungstechnologie des Biosensors inklusive einer Funksteuerung durch eine externe Sende- und Empfangseinheit realisiert wird.

Die Untersuchungen dieser vier wesentlichen Komponenten werden nun nach einer kurzen Darstellung der physikalisch relevanten Grundlagen eingehend erläutert.

2 Grundlagen

Wie aus einem Hydrogel ein Wellenleiter wird, wie die Proteine im Wellenleiter Auskunft über die Analytkonzentration geben und anschließend das Signal im Sensor erfasst und umgesetzt wird, sind die Kernfragen dieses Kapitels.

2.1 Hydrogelwellenleiter

Ein Wellenleiter basiert allgemein auf dem Prinzip der Totalreflexion. Breitet sich ein Lichtbündel in einem Medium mit hohem Brechungsindex n_1 aus und trifft auf ein Material mit kleinerem Brechungsindex n_2, so tritt an der Grenzfläche in einem bestimmten Winkelbereich $\theta_1 \geq \theta_{1Total}$ Totalreflexion ein. D.h. der Strahl tritt nicht in das Medium mit dem Brechungsindex n_2 ein sondern wird vollständig reflektiert. Im Grenzfall, dem Totalreflexionswinkel, ergibt sich ein parallel zur Grenzfläche verlaufender Strahl mit $\theta_2 = \pi/2$, siehe Abbildung 2.1.

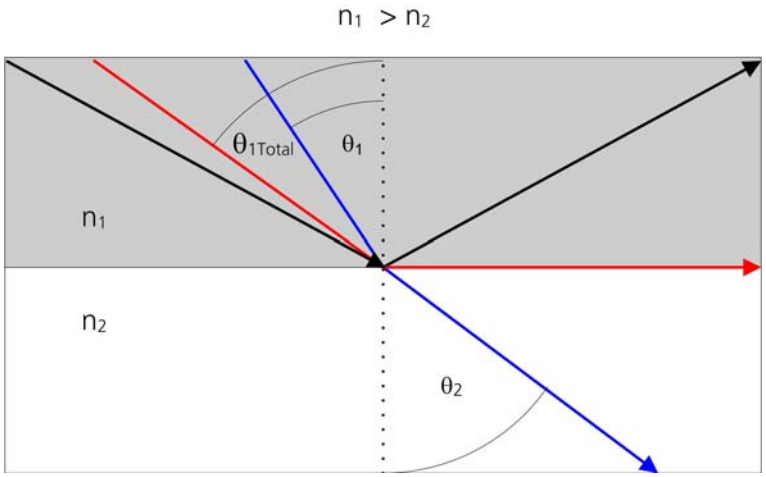


Abbildung 2.1: Schemazeichnung der Lichtbrechung und Reflexion an einer Grenzfläche.
Die eingezeichneten Lichtstrahlen werden an der Grenzfläche der Materialien mit den Brechungsindizes n_1 und n_2 reflektiert. Im Bereich $\theta_1 > \theta_{1Total}$ tritt Totalreflexion ein. Der einfallende Lichtstrahl wird vollständig reflektiert und tritt nicht in das Medium mit dem Brechungsindex n_2 ein. Im Grenzfall des Totalreflexionswinkels ergibt sich ein reflektierter Lichtstrahl entlang der Grenzfläche.

Aus dem Snelliusschen Brechungsgesetzt [7], siehe Gleichung 2.1 ergibt sich für den Winkel der Totalreflektion θ_{1Total} in Gleichung 2.2:

$$\frac{\sin(\theta_1)}{\sin(\theta_2)} = \frac{n_2}{n_1} \quad mit \quad \theta_2 = \pi/2 \qquad \textbf{2.1}$$

$$\theta_{1Total} = \arcsin\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \qquad \textbf{2.2}$$

Dieser Effekt wird in Wellenleitern benutzt, indem der Kern des Wellenleiters mit n_1 den höheren Brechungsindex gegenüber der Ummantelung des Wellenleiters mit Brechungsindex n_2 besitzt und so das Licht im Kern geführt wird [8], siehe Abbildung 2.2 (a).

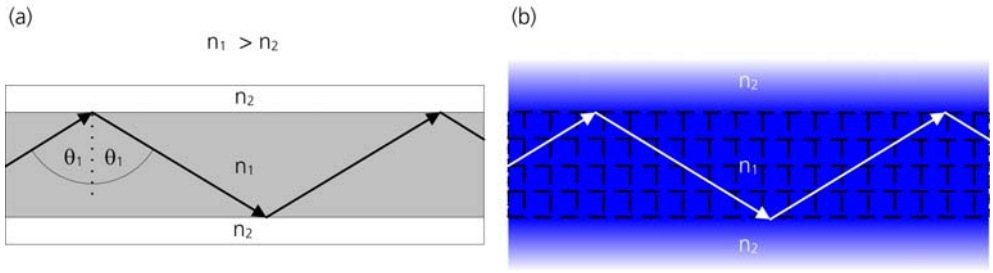


Abbildung 2.2 : (a) Schemazeichnung eines Lichtwellenleiters. Das Material mit dem Brechungsindex n_1 bildet den Kern des Wellenleiters, das Material mit dem Brechungsindex n_2 dessen Ummantelung. Es gilt $n_1 > n_2$. Die eingezeichneten Lichtstrahlen werden an der Grenzfläche unter dem Winkel θ_1 total reflektiert.
(b) Hydrogelwellenleiter. Das mit Umgebungsflüssigkeit gefüllte Polymernetzwerk bildet den Kern des Wellenleiters und führt das Licht. Die Umgebungsflüssigkeit bildet die Ummantelung des Hydrogelwellenleiters. Die Lichtstrahlen werden daher an der Grenzfläche des Hydrogels mit dem Brechungsindex n_1 und der Umgebungsflüssigkeit mit dem Brechungsindex n_2 total reflektiert.

Im Falle des Hydrogelwellenleiters gilt folgender Sachverhalt: Hydrogele bestehen aus einem Polymernetzwerk dessen Poren mit einer wässrigen Flüssigkeit gefüllt sind. Die Flüssigkeit innerhalb der Poren entspricht der Umgebungsflüssigkeit in der sich das Hydrogel befindet [9]. Das Polymernetzwerk entsteht durch die Vernetzung von wasserunlöslichen Polymerketten beispielsweise durch ionische oder kovalente Bindungen oder indem sich die Polymerketten verschlaufen. Besitzt das Polymernetzwerk einen höheren Brechungsindex als die Umgebungsflüssigkeit [10], [11], [12], ergibt sich im Hydrogel bestehend aus Polymernetzwerk und mit Umgebungsflüssigkeit gefüllten Poren ein effektiver Brechungsindex, der höher ist als der Brechungsindex der reinen Umgebungsflüssigkeit. Der Wert des Brechungsindexes verhält sich linear mit dem Flüssigkeitsgehalt des Hydrogels [13]. D.h. geht der Flüssigkeitsgehalt des Hydrogels zurück, steigt der Brechungsindex mit dem Polymergehalt linear an. Das Hydrogel hat unter der genannten Voraussetzung also einen höheren Brechungsindex n_1 als die Umgebungsflüssigkeit mit n_2 und stellt gegenüber dieser einen Wellenleiterkern dar, wie in Abbildung 2.2 (b) gezeigt. So entsteht ein Hydrogelwellenleiter, der sehr gut für eine Biosensoranwendung geeignet ist, da der Hydrogelwellenleiter das Anregungslicht über kurze Distanzen führen und gleichzeitig als dreidimensionale Immobilisierungsmatrix für optisch aktive Sensorproteine verwendet werden kann.

2.2 Sensorproteine und Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)

Die Sensorproteine bilden das sensitive Element des Sensors. Sie binden den Analyten Kalzium und zeigen in Abhängigkeit der Analytkonzentration ein sich änderndes Fluoreszenzspektrum. Entwickelt und hergestellt werden diese speziellen

Sensorproteine mittels gentechnischen Verfahren am Institut für Molekularbiologie und Biochemie Heraklion (IMBB). Nach der Herstellung werden sie im Hydrogel immobilisiert, dies wird am Polymerinstitut der slowakischen Akademie der Wissenschaften durchgeführt (PISAS). Dazu werden sie vor der Vernetzung der Polymerlösung zugegeben. Dann wird die Vernetzung der Polymere durch Zugabe einer Initiatorsubstanz gestartet. Im jetzt synthetisierten Hydrogel befinden sich die Proteine in den mit Flüssigkeit gefüllten Poren des Hydrogels, die sie aufgrund ihrer Größe nicht mehr verlassen können und auf diese Weise immobilisiert sind.
Die Sensorproteine bestehen aus drei für das Sensorprinzip wesentlichen, funktionellen Einheiten. Erstens aus zwei Fluoreszenzproteinen, dem CFP„cyan fluorescent protein" und dem YFP „yellow fluorescent protein", sowie einer dritten Struktur GBP „glucose binding protein", die die Bindungsstelle für den Analyten enthält. Ein ähnliches Konstrukt wurde auch von Khan et al. entwickelt [14].
Diese drei Einheiten bilden zusammen den Sensorproteinkomplex GBPfluo1. Bei der Bindung des Analyten Kalzium reagiert die GBP-Einheit mit einer Konformationsänderung. Sie führt dazu, dass die Fluoreszenzproteine, die kovalent an die GBP-Einheit gebunden sind, durch die Konformationsänderung mit bewegt werden, räumlich ihren Abstand zueinander ändern und sich annähern. [1]Diese Abstandsänderung ist wesentlich für den Detektionsmechanismus, siehe Abbildung 2.3.

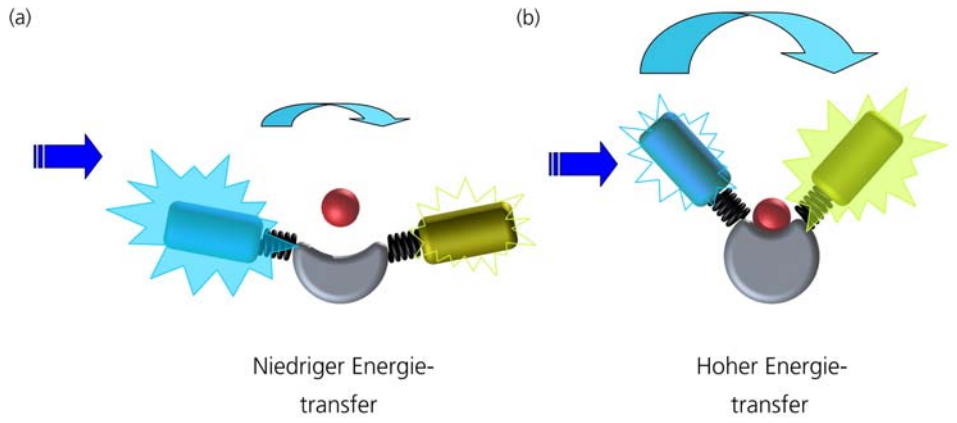


Abbildung 2.3: Schemazeichnung der Funktion des Fluoreszenzproteins. Die Fluoreszenz des Proteins wird mit blauem Laserlicht angeregt.
(a) In geöffenetem Zustand, der Analyt hat nicht an das Protein gebunden, findet ein nur geringer Energietransfer statt. Hauptsächlich CFP sendet Fluoreszenzlicht aus.
(b) Bindet der Analyt an das Protein, findet eine Konformationsumwandlung statt, das Protein schließt sich und ermöglicht jetzt einen hohen Energietransfer zwischen CFP und YFP. So wird YFP durch den Energietransfer strahlungslos zur Fluoreszenzemission angeregt, wobei die Fluoreszenzemission von CFP zurückgeht.

Der Detektionsmechanismus basiert auf dem Förstertransfer [15]. In diesem Fall findet der Förstertransfer zwischen zwei Fluoreszenzproteinen statt, deshalb wird der Effekt auch als Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET) bezeichnet. Bei diesem Vorgang

[1] An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass nicht eine Bindung von Glukose sondern von Kalzium an die GBP-Einheit die beschriebene Abstandsänderung des Sensorproteins GBPfluo1 bewirkt.

wird die Energie eines angeregten Fluoreszenzproteins strahlungslos auf ein zweites Protein übertragen und durch diesen Energietransfer zur Fluoreszenz angeregt. Man bezeichnet das ursprünglich angeregte Protein als Donor und das zweite Protein, das durch den Transfer angeregt wird, als Akzeptor. Physikalisch betrachtet findet der strahlungslose Energietransfer durch eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung von Donor und Akzeptor statt.
Die Bedingung für das Stattfinden des Energietransfers ist, neben einer günstigen Orientierung der Fluoreszenzproteine zueinander, ein Überlapp des Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors. Das FRET-Paar bestehend aus dem Donor CFP und dem Akzeptor YFP erfüllt diese spektrale Bedingung [16]. Die Effizienz des Energietransfers E ist dann von dem Abstand zwischen CFP und YFP abhängig [17]. Für sie gilt nach Förster:

$$E = \frac{R_0^{\,6}}{R_0^{\,6} + r^6} \qquad \textbf{2.3}$$

wobei R_0 dem Försterradius entspricht und r dem Abstand der beiden Fluoreszenzproteine, CFP und YFP. Der Försterradius für CFP und YFP liegt bei 4,92nm ±0,01 nm [18]. Bei diesem Abstand beträgt die Transfereffizienz 50%. Bei einem räumlichen Abstand von CFP und YFP über 15 nm geht die Transfereffizienz nach Gleichung 2.3 auf weniger als 0,1% zurück. Da die Proteine nicht frei beweglich sind, sondern direkt über die zwischenliegende GBP-Einheit mit einander verbunden sind und diese eine maximale Länge von ca. 7 nm aufweist [19] tritt bei diesem Abstand rechnerisch eine Transfereffizienz von ca. 10% auf.[2] Im Proteinkomplex findet demzufolge immer ein Energietransfer statt. Bewegen sich nun CFP und YFP durch die Bindung des Analyten an GBP auf einander zu, steigt die Effizienz des Energietransfers an. Spektral betrachtet bedeutet das, dass die Emission des Donors CFP zurück geht, wohingegen die Emission des Akzeptors YFP zunimmt.
Das Energieschema des idealisierten Energietransfers ist in Abbildung 2.4 gezeigt. Das Fluoreszenzprotein CFP wird mit einer schmalbandigen blauen Laserlichtquelle angeregt und in einen höheren Energiezustand übergeführt. Ist YFP weit von CFP entfernt, wird keine Energie auf diesen Farbstoff übertragen. Deshalb wird die Energie des CFPs durch die Emission von Fluoreszenzlicht wieder frei. Die Wellenlänge des ausgesendeten Fluoreszenzlichts ist länger als die eingestrahlte Wellenlänge, da die aufgenommene Energie nicht vollständig verlustfrei wieder in Licht freigesetzt wird. Dieser Effekt wird als „Stokes Shift" bezeichnet [20]. Weiter findet eine geringfügige, direkte Anregung des YFPs statt, da es in dem Wellenlängenbereich der Anregungswellenlänge sehr schwach absorbiert, siehe Abbildung 2.4 (a).
Befindet sich das YFP in der Nähe von CFP, wird die eingestrahlte Energie vom Donor CFP auf den Akzeptor YFP strahlungslos übertragen. Dies hat zur Folge, dass jetzt das

[2] Der Abstand von CFP und YFP wurde experimentell nicht ermittelt. Die Angabe der Größe der GBP-Einheit dient zur groben Abschätzung eines maximal möglichen Abstands.

angeregte CFP weniger Fluoreszenzlicht selbst aussendet und dafür die Intensität des YFP-Fluoreszenzlichts ansteigt, gezeigt in Abbildung 2.4 (b).

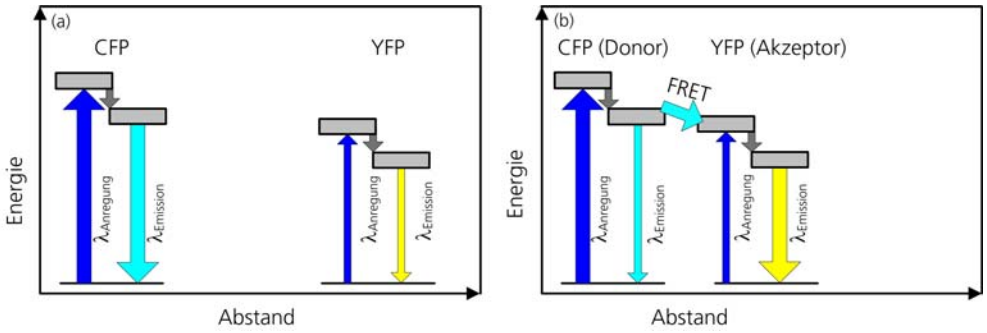


Abbildung 2.4: Energieschema des idealisierten Energietransfers.
(a) Durch die eingestrahlte Energie wird ein höheres Energieniveau des Donors CFP angeregt. CFP kehrt durch Aussendung von Fluoreszenzlicht wieder in den Grundzustand zurück. Dies passiert bei einem großen räumlichen Abstand von CFP und YFP, wobei das YFP geringfügig direkt mit angeregt wird.
(b) Liegt der Abstand der beiden Fluoreszenzproteine CFP und YFP in der Größenordung des Försterradius, wird eingestrahlte Energie strahlungslos durch FRET vom Donor CFP auf den Akzeptor YFP übertragen. Der Energietransfer auf den Akzeptorfarbstoff führt zu dessen Anregung, der durch Fluoreszenzemission in den Grundzustand zurückkehrt. Bei diesem Vorgang geht gleichzeitig die Fluoreszenzemission des Donors gegenüber Fall (a) zurück.
Die Emission des Fluoreszenzlichts erfolgt in jedem Fall mit einer längeren Wellenlänge, da durch den „Stokes Shift" nicht die vollständige eingestrahlte Energie wieder in Fluoreszenzlicht umgesetzt wird, sondern die Energie etwas herabgesetzt ist.

2.3 Detektionsprinzip

Das Messprinzip des Biosensors basiert auf der optischen Detektion des Fluoreszenzspektrums der Sensorproteine.

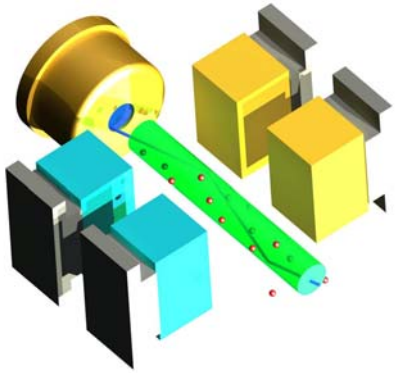


Abbildung 2.5: Schemazeichnung der Messanordnung des Hydrogelwellenleiters mit Fluoreszenzproteinen und eindiffundierenden Analytmolekülen. Die Fluoreszenzproteine im Hydrogelwellenleiter senden, im Gegensatz zu dem stirnseitig eingekoppelten, geführten Anregungslicht einer blauen Laserlichtquelle, isotrop Fluoreszenzlicht aus, welches mit den Photodetektoren durch vorgesetzte optische Filter für CFP und YFP, entlang der Achse des Wellenleiters positioniert, gemessen wird.

Gemessen werden die Intensitäten der beiden Farbstoffe CFP und YFP und es wird aus deren Verhältnis die Konzentration des Analyten bestimmt. Hierfür nötig sind Photodetektoren mit vorgesetzten optischen Filtern für das jeweilige Emissionsspektrum der Proteine CFP und YFP. Diese befinden sich entlang der Achse des Wellenleiters senkrecht zum geführten Anregungslicht, das stirnseitig in den Wellenleiter eingekoppelt wird, siehe Abbildung 2.5.
Das Spektrum des Sensorproteins setzt sich additiv aus den Einzelspektren der Fluoreszenzproteine CFP und YFP zusammen, wie in Abbildung 2.6 ersichtlich.

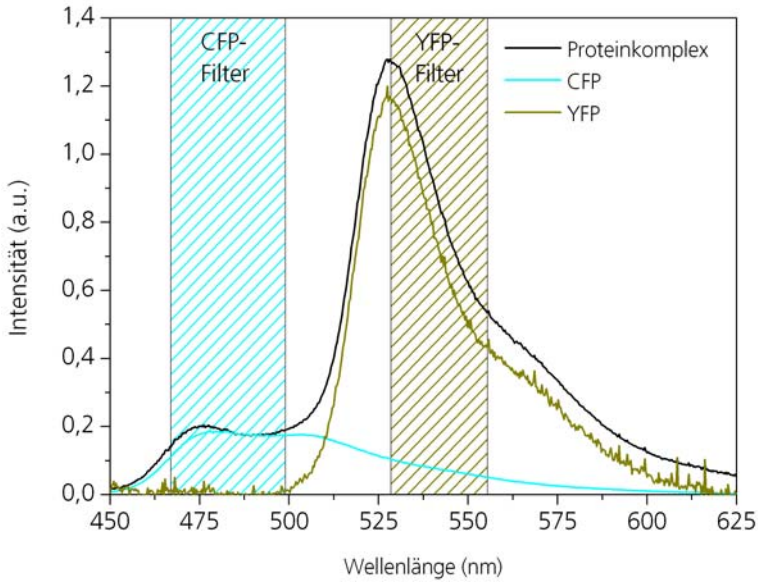


Abbildung 2.6: Spektrum des Sensorproteinskomplexes mit den Anteilen der Einzelspektren der Proteine CFP und YFP, die in ihrer Summe das Gesamtspektrum des Proteinkomplexes wiedergeben, sowie den Durchlassbereichen der Filter für CFP und YFP.

Mit Hilfe entsprechender optischer Filter wird das Gesamtspektrum in die charakteristischen Anteile von CFP und YFP aufgeteilt, den Photodetektoren zugeführt und in Spannungssignale gewandelt. Der spektrale Anteil des Emissionsspektrums des Proteinkomplexes, der den YFP-Filter passiert, besteht auch zu einem Teil aus CFP-Fluoreszenz. Der integrale Anteil des CFP-Signals im YFP Bereich steht in einem festen Verhältnis zum CFP-Signal im CFP-Filterbereich. Es beträgt 0,381 und wird in die Berechnung des Sensorsignals mit einbezogen. Es handelt sich hierbei um eine kleine Korrektur, da $V_{YFP} > V_{CFP}$.
Das Sensorsignal, d.h. das FRET-Verhältnis $R_{YFP/CFP}$, ergibt sich wie folgt aus den Detektorspannungssignalen V_{CFP} und V_{YFP}:

$$R_{YFP/CFP} = \frac{V_{YFP} - 0{,}381 \cdot V_{CFP}}{V_{CFP}}$$

Werden die Experimente im Folgenden mit dem Spektrometer durchgeführt, wird das FRET-Verhältnis näherungsweise aus den Maximalwerten des Spektrums für YFP und CFP gebildet.
Das Emissionsspektrum ist, wie bereits dargestellt, abhängig vom Bindungszustand der Proteine und damit abhängig von der Konzentration des Analyten in der Umgebungsflüssigkeit. Da sich die Proteine im Hydrogelwellenleiter befinden und die Analytkonzentration in der Umgebungsflüssigkeit gemessen werden soll, bedingt das Messprinzip einen diffusiven Austausch des Analyten zwischen Hydrogelwellenleiter und Umgebung.
Das Funktionsprinzip des Sensors wird beispielhaft anhand des Analyten Kalzium demonstriert, da hierfür die Proteine in Vorexperimenten eine gute Funktionalität gezeigt haben. Das Prinzip kann durch die gentechnische Modifikation oder den Austausch der Sensorproteine auf andere Analyten wie Glukose angewendet werden.
Eine gentechnische Modifikation stellt beispielsweise eine Veränderung der Bindungsstellen der Proteine CFP und YFP am GBP, durch eine Änderung der Gensequenz, dar, so dass CFP und YFP nun bei der Bindung von Glukose an GBP und der resultierenden Konformationsänderung mitbewegt werden. So könnte die Detektion von Glukose mit jenen Sensorproteinen realisiert, und mit dem Sensor der Glukosespiegel von Diabetespatienten überwacht werden.

3 Hydrogele als optische Wellenleiter

Welche optischen Eigenschaften muss ein Hydrogel erfüllen, um als Wellenleiter in einer Biosensoranwendung eingesetzt werden zu können?

- Das Hydrogel muss im Wellenlängenbereich des Anregungs- und Fluoreszenzlichts transparent sein.
- Der Brechungsindex des Hydrogels muss über dem seiner Umgebungsflüssigkeit liegen, damit ein Hydrogelwellenleiter entsteht.
- Die Lichtleitung durch das Hydrogel darf innerhalb des Sensors über eine Distanz von einigen Millimetern nur mit geringen Intensitätsverlusten, verursacht durch Lichtstreuung, erfolgen.

Diese drei Punkte bilden die Grundlage zur Realisierung von optischen Hydrogelwellenleitern und werden in diesem Kapitel untersucht. Dazu werden drei unterschiedliche biokompatible Hydrogeltypen charakterisiert und der am besten für die Sensoranwendung geeignete Hydrogeltyp ausgewählt.

3.1 Herstellung der Hydrogelwellenleiter

Die Herstellung von Hydrogelwellenleitern untergliedert sich in zwei von einander abhängende technologische Bereiche. Erster ist die chemische Herstellung der Hydrogele, zweiter die Herstellung der Wellenleiterstrukturen. Es werden sowohl verschiedene Hydrogelchemien untersucht, als auch unterschiedlich dicke Wellenleiter hergestellt. Wichtig dabei ist die möglichst dünnste aber auch mechanisch stabilste Form zu finden, die optisch die geringsten Streuverluste zeigt.

3.1.1 Hydrogelchemie

Am PISAS werden drei Hydrogeltypen hergestellt, die wegen ihrer biokompatiblen Eigenschaften für die Anwendung im Sensorimplantat in Frage kommen [21], [22], [23].

- Das erste ist ein Silikagel basierend auf einem Solgelprozess. Die Basis des Hydrogels bildet Siliziumdioxid, das nach der Methode von I. Gill [24] in ein Hydrogel überführt wird.
- Das Zweite ist ein Alginatgel. Alginat wird aus Braunalgen gewonnen und vielfach industriell eingesetzt [25]. Es polymerisiert unter Zugabe von Kalzium oder Barium aus und bildet so das Alginatgel [26].
- Als drittes wird ein synthetisches, zwitterionisches Hydrogel auf der Basis von Polymethacrylat untersucht. Es entsteht durch die Vernetzung und Polymerisation von Poly(SMADB) [27].

Die detaillierte Zusammensetzungen aller Hydrogeltypen und deren Herstellungsverfahren sind im Anhang A.2 zu finden.

3.1.2 Hydrogelwellenleiter

Die Grundidee besteht darin einen Wellenleiterkern aus Hydrogel herzustellen, der formstabil ist und als freistehendes Element in eine Sensoranwendung integriert werden kann. Erst durch die freistehende Anordnung des Hydrogels in Flüssigkeit kann es als Wellenleiterkern fungieren, da die Umgebungsflüssigkeit die Ummantelung des Wellenleiterkerns bildet und so ein Wellenleiter realisiert wird. Zudem ist für die Verwendung von Hydrogelen als Wellenleiter bei der Herstellung zu beachten, dass die Oberfläche der Hydrogele möglichst glatt ist, und der Wellenleiter möglichst homogen, ohne Fremdkörper oder Blasen hergestellt wird, da sich Oberflächendefekte und Inhomogenitäten als Streuzentren für das geführte Anregungslicht nachteilig auf die Lichtleitung auswirken. Ebenso muss die Größe der Poren des Hydrogels klein gegenüber der Anregungswellenlänge sein, um Streueffekte gering zu halten.
Alle drei Hydrogeltypen entstehen aus einer flüssigen Phase durch Polymerisation und werden deshalb in einer Vergussform hergestellt. In diese wird die Polymerlösung gefüllt und polymerisiert darin aus. Als Formen werden Combitips von Eppendorf und Venenverweilkanülen Vasofix von Braun verwendet. Sie weisen eine glatte und beschichtete Oberfläche im Inneren auf, da sie für die Medikamentenapplikation hergestellt werden und die Medikamente möglichst nicht an der Innenfläche der Spritze anhaften sollen. Diese Eigenschaft bietet eine gute Vorraussetzung dafür, dass sich das Hydrogel wieder aus der Form herauslösen lässt, ohne Schaden zu nehmen. Sie bieten weiter die Möglichkeit mit Hilfe des mitgelieferten Stempels bzw. Mandrins die Polymerlösung aufzusaugen und ein Ende abzudichten, aber auch das Gel wieder zu entformen, so dass freistehende Wellenleiter in Zylinderform aus Hydrogel entstehen. Die Zylinderform stellt für optische Wellenleiter die optimale Form dar. Durch die Verfügbarkeit einer Vielzahl an Durchmessern und Größen dieser Vergussformen können Hydrogelzylinder in verschiedenen Durchmessern und Längen hergestellt werden.
Ziel ist es, möglichst dünne Hydrogelwellenleiter herzustellen, mit denen es möglich ist, eine Länge von 10 mm ohne wesentliche Durchbiegung der Wellenleiter zu überspannen. Diese Länge wird im Sensor benötigt. Hierbei ist zu beachtet, dass die Hydrogele in wässriger Umgebung eingesetzt werden und sich entsprechend auch die relevanten mechanischen Eigenschaften auf die in Wasser montierten Hydrogelwellenleiter beziehen. Eine möglichst geringe Dicke wird angestrebt, um die Diffusionszeit des Analyten aus der Umgebungsflüssigkeit in den Wellenleiter so kurz wie möglich zu halten.
Die Entwicklung der Hydrogelwellenleiter wird mit allen drei Hydrogeltypen, Silikagel, Alginatgel und synthetischem Hydrogel, durchgeführt und der am besten geeignete Hydrogeltyp ausgewählt.
Das synthetische Hydrogel weist die höchste Stabilität auf, gefolgt von dem Silikagel und dem Alginatgel. Trotzdem können mit allen drei Hydrogeltypen Wellenleiter mit einem Durchmesser von 1,1 mm hergestellt werden, die eine Länge von 10 mm überspannen. Eine weitere Reduktion des Durchmessers ist nur mit dem synthetischen Hydrogel möglich. Es wird ein minimaler Durchmesser der synthetischen Hydrogelwellenleiter von 0,76 mm erreicht. In Abbildung 3.1 sind Entwicklungsschritte

von 2,2 mm, 1,1 mm und 0,76 mm Durchmesser dargestellt. Ab einem Durchmesser von 0,6 mm konnte kein formstabiler Hydrogelzylinder mehr hergestellt werden. Die Durchmesserangaben beziehen sich auf den Hydrogeldurchmesser in ungequollenem Zustand und entsprechen den Innendurchmessern der Vergussformen.

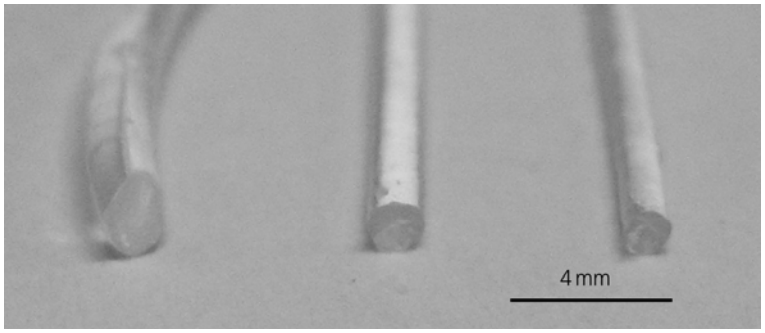


Abbildung 3.1: Hydrogelwellenleiter hergestellt in verschiedenen Formen mit den Durchmessern, von links nach rechts: 2,2 mm, 1,1 mm und 0,76 mm.

3.2 Optische Charakterisierung der Hydrogele

Die optische Charakterisierung der Hydrogele wird unter den eingangs genannten Gesichtspunkten der Eignung als Wellenleiter in einer Biosensoranwendung durchgeführt.

- Durch Transmissionsmessungen wird der Wellenlängenbereich bestimmt, in dem die Hydrogele transparent sind. Nur dieser Wellenlängenbereich kann für den optischen Sensor genutzt werden.
- Mittels einer eigens entwickelten Methode zur Verlustmessung an Hydrogelwellenleitern, wird die Fähigkeit des Hydrogelwellenleiters, Licht über eine Länge im Millimeterbereich zu transportieren, bestimmt.
- Anhand der Ergebnisse wird ein Hydrogeltyp ausgewählt und dessen Brechungsindex ermittelt.

3.2.1 Transmissionsmessungen

Die Transmission der Hydrogelproben wird mit einem Spektralphotometer, Varian Cary 300, im Wellenlängenbereich von 350 – 800 nm bestimmt. Die Hydrogele werden für diese Experimente in optischen Küvetten hergestellt und mit einen 50 mM TRIS-Puffer pH 8 (TRIS, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) bedeckt, siehe Anhang A.2 und A.3. Die gefüllten Küvetten werden dann in das Spektrometer eingesetzt. Als Referenzprobe dient eine mit TRIS-Puffer gefüllte Küvette. Die durchstrahlte Länge der Proben beträgt 1 cm.
In Abbildung 3.2 dargestellt sind die Messkurven der drei verschiedenen Hydrogeltypen und der Pufferlösung. Es wird die Transmission über der Wellenlänge aufgetragen.
Alle Gelproben zeigen gegenüber der Pufferlösung eine geringere Transmission. Der Transmissionsrückgang ist bei der Silikagelprobe am stärksten, bei Alginat am

geringsten. Sie nimmt stetig mit der Wellenlänge ab. Bei 400 nm beträgt die Transmission der Silikagelprobe nur noch 47% wohingegen das synthetische Hydrogel und das Alginatgel eine geringere Abnahme auf 77% bzw. 83% zeigen. Dieser Transmissionsrückgang ist auf eine Zunahme des Streuquerschnitts mit abnehmender Wellenlänge durch Rayleighstreuung der Poren zurückzuführen, da diese mit einer Größe kleiner einem Zehntel der Wellenlänge dafür in Betracht zu ziehen sind [28].
Kleiner 400 nm wird bei allen Proben ein deutlicher Rückgang der Intensität festgestellt. Dieser liegt in der Absorption der Polymerketten in den Hydrogelen im UV-Bereich beispielsweise durch das π-Elektronensytem begründet [29]. Der Polymeranteil unterscheidet sich in den Hydrogelen: Alginat besitzt 4 Gew.-%, Silka ca. 12 Gew.-% und das synthetische Hydrogel ca. 60 Gew.-%. Dementsprechend fällt auch die Absorption beim synthetischen Hydrogel am deutlichsten aus.
Entsprechend der Transmissionsmessungen sind die Hydrogele in dem betrachteten Wellenlängenbereich größer 400 nm für die Verwendung als Wellenleiter geeignet. Der kontinuierliche Abfall der Transmission der Hydrogele stellt allerdings eine Einschränkung dar, da das Licht im sichtbaren Bereich durch das Transmissionsverhalten wellenlängenabhängig abgeschwächt wird.

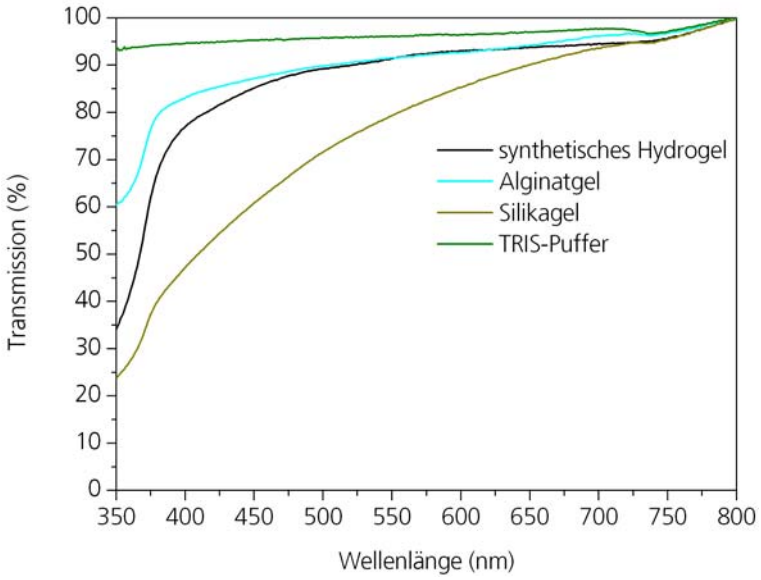


Abbildung 3.2: Transmissionsmessungen der verschiedenen Hydrogele in einer Küvette. Das synthetische Hydrogel und das Alginatgel zeigen im sichtbaren Bereich einen Rückgang der Transmission auf bis zu 77% bei 400 nm. Beim Übergang in den UV-Bereich sinkt die Transmission auf bis zu 34% ab. Das Silikagel zeigt einen deutlichen Rückgang der Transmission über den kompletten Wellenlängenbereich und erreicht minimal hier nur 24% im kurzwelligen Bereich. Trotz des Rückgangs der Transmission sind alle Hydrogeltypen in einem Wellenlängenbereich > 400 nm für den Biosensor geeignet.

3.2.2 Verlustmessungen

Für die Sensoranwendung ist ein möglichst geringer Verlust der Hydrogelwellenleiter aus mehreren Gründen wichtig:

- Es muss eine bestimmte Länge des Hydrogels mit hoher Intensität des Anregungslichts durchstrahlt werden, um die Fluoreszenz auf der gesamten Länge des Wellenleiters anzuregen.
- Je geringer die Wellenleiterverluste sind, umso mehr Anregungslicht steht über die Länge des Wellenleiters zur Anregung der Fluoreszenz zur Verfügung und wird zur Signalerzeugung genutzt. D.h. je geringer die Verluste sind, umso effizienter wird die optische Ausgangsleistung der Lichtquelle in ein Fluoreszenzsignal umgesetzt.
- Weiterhin führen Streuverluste des Anregungslichts zu einem Störsignal innerhalb der Messkammer. Damit das gestreute Anregungslicht nicht zu den Photodetektoren gelangt, wird es mit optischen Filtern blockiert. Je geringer die Streuverluste des Wellenleiters sind, desto geringer sind die Anforderungen an das „blocking" der optischen Filter.

Die Intensitätsverluste des geführten Lichts innerhalb des Wellenleiters werden mit einer eigens hierfür entwickelten Methode zur Verlustmessung an Hydrogelwellenleitern bestimmt. Mit dieser Methode wird das Streulicht, das den Wellenleiter verlässt, über die Länge des Wellenleiters gemessen. Dafür wird die Länge des Hydrogelwellenleiters mit einem Mikroskopobjektiv auf eine CCD-Kamera abgebildet und die Intensität des Streulichts längenaufgelöst gemessen. Nur bei Wellenleitern mit hohem Verlust, größer 2 dB/cm, ist dies mit dem verwendeten Aufbau möglich. Eine Glasfaser beispielsweise, mit einer typischen Dämpfung von 10 dB/km, kann nicht vermessen werden.
Die Messung gibt direkt Aufschluss über das im Wellenleiter verbliebene geführte Licht, ein homogenes Wellenleitermaterial vorausgesetzt, da es sich proportional zu den Verlusten des Wellenleiters zusammengesetzt aus Streuung und Absorption, verhält.
Zur Durchführung dieser Messungen wurde eine Messzelle konstruiert und aufgebaut, siehe Abbildung 3.3, mit der es möglich ist Hydrogelwellenleiter in wässriger Umgebung zu halten und ihre Verluste zu messen.
Die Messzelle besteht aus einem rechteckigen, transparenten PMMA-Hohlkörper der mit einem schwarz eloxierten Aluminiumboden versehen und einem Glasfaseranschluss gedeckelt wird. Sie hat eine Größe von 7,4 mm x 7,4 mm x 15,0 mm. Innerhalb der Zelle befindet sich eine bewegliche Führung, die die Zentrierung des Wellenleiters garantiert. Dieser wird nach dem Befüllen der Messzelle mit TRIS-Puffer über eine Öffnung im Deckel, welche auch der Glasfaser Zugang zu der Zelle gibt, in die Zelle eingeschoben. In der Messzelle ist der Hydrogelwellenleiter ausschließlich an den Enden in der Führung und im Glasfaseranschluss fixiert. Über die Länge des Hydrogelzylinders ist er vollständig von der Pufferlösung umgeben. Das ist notwendig, da die Lösung die Ummantelung des Wellenleiters darstellt und die Funktionalität des Wellenleiters gewährleistet.
Zur Messung wird die Messzelle mit dem Hydrogelwellenleiter unter einem Mikroskop platziert. Das Licht wird stirnseitig mit einem 125 µm dicken Multimodelichtleiter in den Wellenleiter eingekoppelt. Die Länge des Hydrogelwellenleiters wird dann mit einem

2,5-fach Objektiv und dem Mikroskop im Hellfeldbetrieb auf die CCD-Kamera abgebildet und ein Graustufenbild aufgezeichnet.

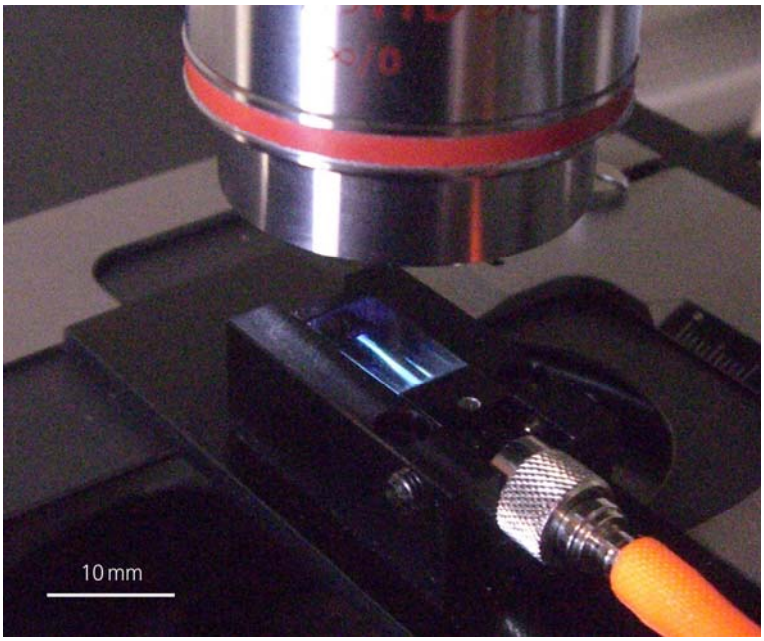


Abbildung 3.3: PMMA-Messzelle zur Verlustmessung an Hydrogelwellenleitern unter einem Fluoreszenzmikroskop mit Glasfaserlichteinkopplung und in Flüssigkeit gehaltenem Hydrogelwellenleiter.

Für diese Experimente werden Hydrogelwellenleiterproben mit einem Durchmesser von 1,1 mm hergestellt, wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben. Proben aus allen drei Hydrogeltypen, Silikagel, Alginatgel, und synthetischem Hydrogel werden vermessen.
Eine typische Messaufnahme des Streulichts eines synthetischen Hydrogelwellenleiters ist in Abbildung 3.4 gezeigt.

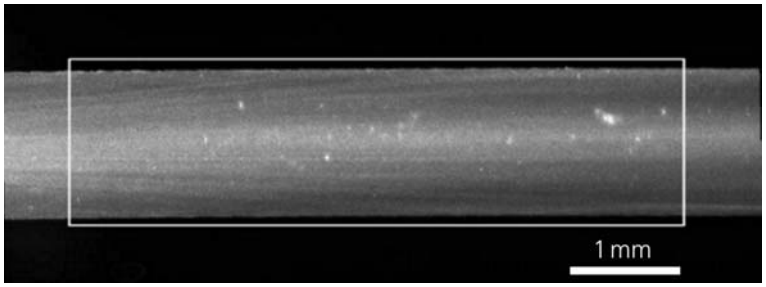


Abbildung 3.4: Mikroskopbild eines synthetischen Hydrogelwellenleiters zur Bestimmung der Verluste. Ausgewertet wird der im weißen Rahmen befindliche Bereich. Die weißen Punkte innerhalb des Wellenleiters sind Inhomogenitäten, die aber in diesem geringen Ausmaß die Messung nicht maßgeblich beeinträchtigen.

Das Licht wird links im Bild in den Wellenleiter eingekoppelt. Die Intensität des gestreuten Lichts schwächt sich deutlich von links nach rechts ab und deutet damit auf die Streuverluste hin. Inhomogenitäten des Hydrogels treten als Streuzentren mit hoher

Streuintensität in Erscheinung und sind als weiße Punkte zu erkennen. In der vorliegenden geringen Anzahl beeinflussen die Inhomogenitäten das Ergebnis der Messungen jedoch nicht. Die Mikroskopaufnahmen werden in der Art ausgewertet, dass die Grauwerte der Pixel im markierten Rahmen über den Querschnitt des Wellenleiters integriert und entlang der Achse aufgetragen werden.
Die Ergebnisse der ausgewerteten Mikroskopaufnahmen sind exponentiell abfallende Kurven, da nach dem Lambert Beerschen Gesetz [30], siehe Gleichung 3.1 - 3.3, für den Durchgang eines Lichtstrahlenbündels durch ein dämpfendes Material der Länge l für die Intensität I gilt:

$$\frac{dI}{I(x)} = -\alpha dx \qquad \textbf{3.1}$$

$$I(x) = e^{-\alpha x} \qquad \textbf{3.2}$$

$$I(l) = I_1 = I_0 e^{-\alpha l} \qquad \textbf{3.3}$$

Der Exponent α der Intensitätsfunktion 3.2 entspricht dem charakteristischen Dämpfungskoeffizienten des betrachteten Hydrogelwellenleiters. Er setzt sich zusammen aus den Absorptions- und Streuquerschnitten der entsprechenden Absorber und Streuzentren σ_{abs} und σ_{streu} sowie deren Konzentrationen N_{abs} und N_{streu} in den Hydrogelen, siehe Gleichung 3.4, wobei die Konzentration N in Teilchenzahl pro Volumen angeben wird.

$$\alpha = \sigma_{abs} N_{abs} + \sigma_{streu} N_{streu} \qquad \textbf{3.4}$$

Je höher der Dämpfungskoeffizient ist, umso größer ist der Intensitätsrückgang je Längeneinheit des Wellenleiters, siehe Gleichung 3.3.
In Abbildung 3.5 sind die Ergebnisse der Messungen der verschiedenen Hydrogeltypen exemplarisch dargestellt. Der Dämpfungskoeffizient wird in dB/cm umgerechnet angegeben. Die Werte sind von der Hydrogelherstellung und der Zusammensetzung abhängig, deshalb variieren die gemessenen Verlustwerte in dem jeweils angegebenen Bereich. Das Silikagel zeigt den größten Verlust mit 25 - 30 dB/cm, gefolgt von Alginat mit 5 - 10 dB/cm. Das beste Hydrogel ist das synthetische Hydrogel mit einem Verlust von 3 - 7 dB/cm.
Aufgrund dieser Ergebnisse und der hohen Bedeutung der Wellenleiterverluste sowie der guten mechanischen Stabilität für die Sensoranwendung wird das synthetische Hydrogel für den Sensor ausgewählt.

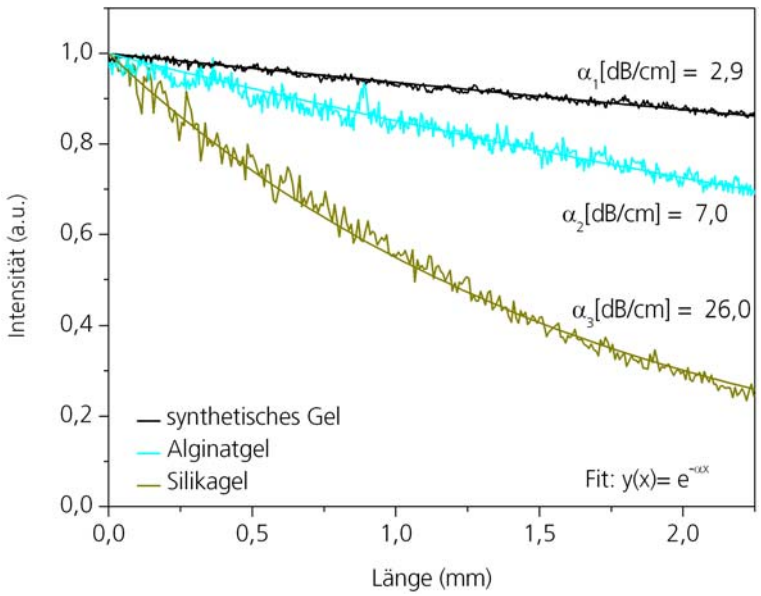


Abbildung 3.5: Vergleich der Abnahme der Streulichtintensität mit der Länge des Hydrogelwellenleiters. Dargestellt sind die Messkurven mit den zugehörigen exponentiellen Fitkurven. Der Dämpfungskoeffizient α der Fitkurve ist charakteristisch für den Verlust des Hydrogelwellenleiters. Das synthetische Hydrogel zeigt mit 2,9 dB/cm die geringsten Verluste.

3.2.3 Brechungsindexbestimmung

Ein erhöhter Brechungsindex des Hydrogels gegenüber der Umgebungsflüssigkeit bildet die Grundlage für die Totalreflexion des Lichts innerhalb eines Hydrogels in Flüssigkeit und so auch für Verwendung des Hydrogels als Wellenleiter. Aus diesem Grund wird der Brechungsindex des synthetischen Hydrogels ermittelt und mit dem Brechungsindex der TRIS-Pufferlösung beziehungsweise Wasser verglichen.
Zur Bestimmung des Brechungsindexes des synthetischen Hydrogels werden zwei Methoden herangezogen. Zum einen wird die Refraktometrie zur Abschätzung des Brechungsindex bei einer Wellenlänge von 589 nm benutzt.
Zum anderen werden Reflektions- und Transmissionsspektren von Hydrogelstreifen aufgenommen und daraus der Brechungsindex über den gesamten Wellenlängenbereich von 350 nm bis 800 nm berechnet.

Herstellung der Gelproben

Zwei synthetische Hydrogelproben werden als 20 mm x 15 mm x 1 mm großer Streifen in einer Glasform gefertigt. Nach der Fertigung wird das Hydrogel von dem Träger gelöst und in TRIS-Puffer gelagert. Durch die zusätzliche Flüssigkeitsaufnahme erhöht sich die Dicke der einzelnen Proben um bis zu 15%. Die Dicken werden mit einer Schieblehre nachgemessen. Dazu wird die Schieblehre an die Kante des Hydrogelstreifens angelegt und die Messschieber mit der Kante fluchtend eingestellt ohne sie an das Hydrogel anzudrücken. Dies wird an allen vier Kanten der Hydrogelproben durchgeführt. Es ergibt sich ein Mittelwert mit Standardabweichung

für die Dicke der Hydrogelstreifen von 1,11 mm ±0,02 mm. Die Dicke wird bei der Bestimmung des Brechungsindexes durch die Reflektions- und Transmissionsmessungen berücksichtigt.

Refraktometrie

Zur Bestimmung des Brechungsindexes des Hydrogels wird in diesem Experiment das Refraktometer Krüss ER 6012 verwendet. Als Lichtquelle wird eine Halogenlampe und der mitgelieferte optische Anregungslichtfilter für die Natrium D Linie (589 nm) benutzt. Für weitere Wellenlängen liegt keine Kalibrierung des Gerätes vor. So wird der Brechungsindex nur für die Wellenlänge von 589 nm bestimmt.
Zur Messung wird der Hydrogelstreifen aus dem Puffer genommen und kurzzeitig auf einem staub- und fusselfreien Papier (Kimwipe) einseitig aufgelegt, um den Wasserfilm von der Oberfläche zu entfernen. Anschließend wird das Hydrogel auf die Messfläche, den Saphirkristall des Refraktometers, aufgelegt, siehe Abbildung 3.6.

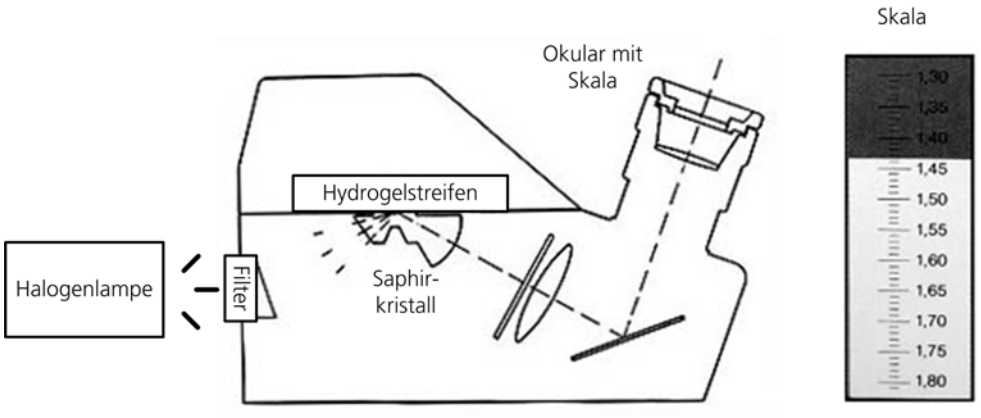


Abbildung 3.6: Refraktometrische Brechungsindexbestimmung des synthetischen Hydrogels. Der Hydrogelstreifen wird auf der Saphirmessfläche aufgelegt. In das Refraktometer wird das Licht einer Halogenlampe eingestrahlt und gefiltert. Im Okular mit einer Skala gibt die Schattenlinie den Brechungsindex der Probe an.

Bei der Messung ist es wichtig, dass das Hydrogel ohne Flüssigkeitsfilm direkt auf dem Kristall aufliegt, da sonst nur der Brechungsindex des Flüssigkeitsfilms gemessen wird. Aufgrund der Totalreflexion an der Saphir-Hydrogel-Grenzfläche bildet sich im Okular ein heller und ein abgeschatteter Bereich aus. Anhand der Schattenlinie, die sich in der Skala im Okular abzeichnet, wird der Brechungsindex n abgelesen. Es werden 2 Proben der synthetischen Hydrogele an vier Stellen vermessen. Für Mittelwert und Standardabweichung des Brechungsindex n der synthetischen Hydrogele ergeben sich n = 1,391 ±0,001. Zusätzlich wird der Brechungsindex der TRIS-Pufferlösung bestimmt. Mit n = 1,333 ±0,001 entspricht der Wert dem Brechungsindex von Wasser bei Normalbedingungen.
Anhand dieser Ergebnisse weisen die Hydrogele demnach bei der Wellenlänge 589 nm gegenüber der Pufferflüssigkeit einen um 4,4% ±0,2% erhöhten Brechungsindex auf.

Reflektions- und Transmissionsmessung

Zur Bestimmung der Wellenlängenabhängigkeit des Brechungsindex obiger Hydrogelproben muss eine spektroskopische Methode herangezogen werden. Dazu werden Reflexions- und Transmissionsspektren der Hydrogelproben gemessen. Die Spektren werden im Bereich von 350 - 800 nm bei senkrechtem Lichteinfall aufgenommen, da in diesem Fall die Reflektions- und Transmissionsfaktoren, R und T, polarisationsunabhängig sind. Die gewonnen Daten werden mit einem Programm zur Bestimmung des Brechungsindex auf Basis der Fresnelschen Beziehungen für die Reflexions- und Transmissionsfaktoren ausgewertet. Für R und T gilt bei senkrechtem Einfall des Lichts aus Luft (n_{Luft} =1) in das Hydrogel [31]:

$$R = \left(\frac{N_{Hydrogel} - 1}{N_{Hydrogel} + 1} \right)^2 \qquad \textbf{3.5}$$

$$T = \frac{4N_{Hydrogel}}{\left(N_{Hydrogel} + 1\right)^2}; \quad mit\ N_{Hydrogel} = n + i\kappa \qquad \textbf{3.6}$$

Aus den Gleichungen 3.5 und 3.6 wird der Realteil n und Imaginärteil κ des komplexen Brechungsindexes N der Hydrogele bestimmt. Berücksichtig werden dabei Reflektionen an der Ober- und Unterseite des Materials sowie die Dicke des Hydrogelstreifens.

Zur Messung werden die Proben direkt aus der Pufferlösung auf der Messvorrichtung platziert und schnellstmöglich gemessen, um einen Trocknungseffekt während der Messung auszuschließen, da eine Austrocknung der Hydrogele durch eine Verdunstung der Pufferlösung zu einer Reduktion des Flüssigkeitsanteils innerhalb des Hydrogels führt und so den Brechungsindex erhöht.

Beispielhaft für die ermittelten Messkurven ist in Abbildung 3.7 eine Messreihe des Brechungsindex n der synthetischen Hydrogele gezeigt. Zum Vergleich ist eine Kurve des Brechungsindexes von Wasser basierend auf Literaturwerten [32] dargestellt. Der Imaginärteil κ des Brechungsindex ist aufgrund geringer Absorption der Hydrogele im relevanten Wellenlängenbereich über 400 nm kleiner als 10^{-6}, und wird daher nicht betrachtet.

Mit diesem Ergebnis wird die Refraktometermessung bestätig und gezeigt, dass im sichtbaren Wellenlängenbereich die Wellenleiterbedingung eines höheren Brechungsindex des Hydrogels gegenüber der Umgebungsflüssigkeit erfüllt ist. Die Erhöhung liegt im betrachteten Wellenlängenbereich zwischen 3,5% und 4,5% gegenüber dem Brechungsindex von Wasser und weist ein Δn zwischen 0,037 und 0,059 auf. Dieser Bereich entspricht in etwa dem von multimoden Standardlichtwellenleitern mit $0{,}015 < \Delta n < 0{,}045$ [33].

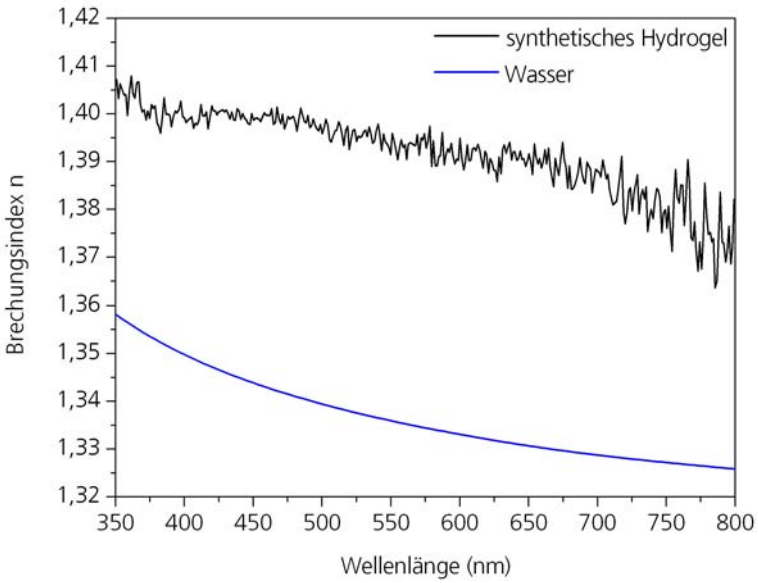


Abbildung 3.7: Vergleich des spektrometrisch bestimmten Brechungsindexes des synthetischen Hydrogels mit Wasser. Der Brechungsindex des synthetischen Hydrogels liegt im gesamten betrachteten Wellenlängenbereich 3,5 - 4,5% über dem von Wasser. Die Kurve von Wasser entspricht den Literaturwerten von Wasser bei Normalbedingungen.

4 Sensorproteine in Hydrogelwellenleitern

Das Verhalten der Sensorproteine in einem Hydrogelwellenleiter wird in diesem Kapitel untersucht. Dabei werden Parameter in den Vordergrund gestellt, die für eine spätere Sensoranwendung aussagekräftig sind. Nötig sind hierfür Aussagen über:

- die Absorptions- und Emissionsspektren der Proteine zur Abstimmung des optischen Systems,
- die mögliche Maximalkonzentration der Sensorproteine im Hydrogelwellenleiter zur Erzeugung eines hohen Fluoreszenzsignals,
- die Sensitivität der Proteine gegenüber dem Analyten Kalzium,
- die Stabilität der Sensorproteine.

4.1 Grundlegende Charakterisierung der Fluoreszenzproteine

Zur Charakterisierung der optischen Eigenschaften der Fluoreszenzproteine werden die Proteine immobilisiert im synthetischen Hydrogel vermessen. Experimente in Pufferlösung bilden hierfür die Referenz. Aufeinander aufbauend werden Transmissions- und Emissionsspektren gemessen, um die optischen Eigenschaften der Sensorproteine zu bestimmen und die geeignete Anregungslichtquelle auszuwählen. Abschließend wird die Maximalkonzentration der Proteine bestimmt und damit das System zur weiteren Charakterisierung der Sensitivität und Stabilität der Proteine im synthetischen Hydrogelwellenleiter festgelegt.

4.1.1 Absorptionsquerschnitte der Proteine

Es werden Transmissionsspektren der Proteine mit dem kommerziellen Spektralphotometer Varian Cary 300 aufgenommen, um deren Absorptionsquerschnitte zu bestimmen. Dieser gibt Aufschluss, wie groß die Energieaufnahme des Proteins bei einer bestimmten Wellenlänge ist. Dies ist eine wichtige Determinante für die Auswahl der Anregungslichtquelle.
Die Proben werden nacheinander in optischen Küvetten in den Strahlengang des Messgeräts eingebracht und die transmittierte Intensität des Lichts nach dem Durchgang durch die Probe im Wellenlängenbereich von 350 – 800 nm detektiert.
Es werden die Transmissionsspektren der Proteine CFP, YFP und GBPfluo1 in Konzentrationen von 2 µM gemessen. Für diese Experimente werden Proben, bestehend aus Proteinen sowohl gelöst in TRIS-Puffer als auch immobilisiert im synthetischen Hydrogel, in optischen Küvetten hergestellt. Je eine Referenzprobe ohne Protein wird ebenfalls vermessen und fließt in die Berechnung der Absorptionsquerschnitte als Nulllinie ein. Die Absorptionsquerschnitte werden aus den Transmissionsspektren mit der Lambert Beer Relation wie folgt berechnet [34]:

$$\sigma_{abs} = -\frac{1}{cl} \ln \frac{T}{T_{ref}} \qquad \textbf{4.1}$$

c steht für die Konzentration der Proteine in Lösung bzw. im Hydrogel, l ist durchstrahlte optische Weglänge, sie entspricht in diesen Experimenten 1 cm, T die Transmission der Probe und T_{ref} die Transmission der Referenzprobe ohne Protein.
In Abbildung 4.1 sind die Absorptionsquerschnitte der Fluoreszenzproteine CFP und YFP sowie des Sensorproteins GBPfluo1 in Lösung und im Hydrogel dargestellt. Zur quantitativen Analyse muss allerdings berücksichtig werden, dass die Messkurven gerätetechnisch bedingt im Wellenlängenbereich von 350 - 450 nm Schwankungen um ±10 % unterliegen.

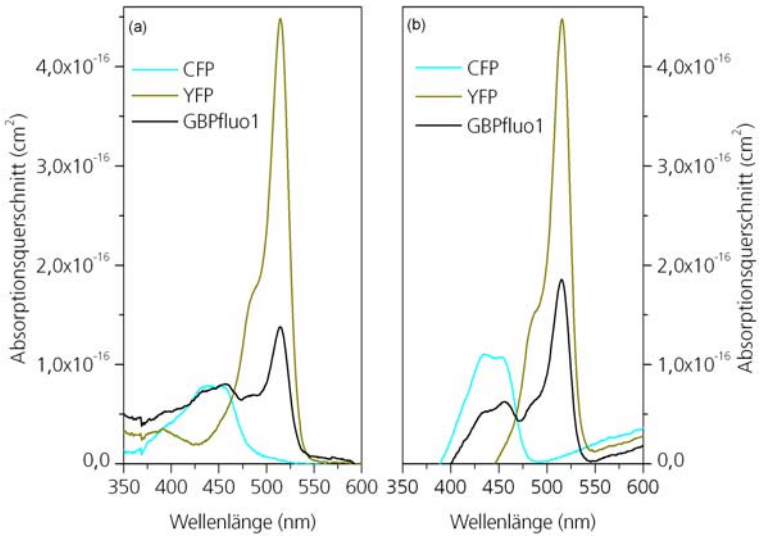


Abbildung 4.1: Absorptionsquerschnitte der Fluoreszenzproteine CFP, YFP, des FRET-Konstrukts GBPfluo1 (a) in Lösung, (b) im synthetischen Hydrogel. GBPfluo1 weist die gleichen Absorptionsregionen auf wie die skalierte Summe aus den Einzelspektren von CFP und YFP. Die Immobilisierung des Proteins im Hydrogel beeinflusst die spektrale Form der Absorptionslinien einzelnen der Fluoreszenzproteine nicht. Für den Wellenlängenbereich zur optimalen Fluoreszenzanregung von GBPfluo1 ergibt sich aus den Spektren ein Bereich zwischen 400 und 450 nm.

Es können in Lösung wie auch im Hydrogel zwei Absorptionsregionen des Proteinkonstrukts GBPfluo1 ausgemacht werden. Die Absorption im Wellenlängenbereich von 375 – 475 nm kann dem Fluoreszenzprotein CFP zugeordnet werden. Der zweite Bereich von 450 – 550 nm gehört zu YFP. Dies geht aus den Einzelspektren der Proteine CFP und YFP hervor. Das Spektrum des Proteinkonstrukts lässt sich durch Skalierung der beiden Einzelspektren von CFP und YFP mittels zweier Faktoren und deren Summation vollständig rekonstruieren. Daraus ist zu folgern, dass die GBP-Einheit keine wesentliche Absorption aufweist.
Vergleicht man die Spektren zwischen Lösung und Hydrogel, so ist zu erkennen, dass das Einzelspektrum von YFP unverändert bleibt, die Absorption von CFP im Hydrogel zunimmt und die Absorption von YFP gebunden an den Proteinkomplex GBPfluo1

ebenfalls ansteigt. Die spektralen Formen bleiben aber bei allen erhalten, so dass die Immobilisierung im Hydrogel keinen Einfluss nimmt auf die Abstimmung des optischen Anregungs- und Detektionssystems des Sensors.
Aus den Spektren geht ebenso hervor, dass eine optimale Anregung von CFP im Bereich von 400 nm bis 450 nm erfolgt. Im Bereich längerer Wellenlängen ab 430 nm muss berücksichtig werden, dass bereits eine gleichzeitige, direkte Anregung des zweiten Fluoreszenzproteins YFP erfolgt. Dies hat eine Einschränkung des Energietransferbereichs zur Folge, da durch die direkte Anregung von YFP ein Fluoreszenzsignal des YFP-Anteils generiert wird, das nicht auf FRET basiert und somit nicht mit einer Reaktion des Proteins GBPfluo1 und dem Analyten korrespondiert. Dieser Anteil stellt ein unerwünschtes Hintergrundsignal dar und sollte vermieden werden.

4.1.2 Auswahl der Anregungslichtquelle

Die Auswahl der Anregungslichtquelle basiert auf dem mit ihr erzeugten Fluoreszenzsignal. Das Ziel ist es, ein möglichst hohes Fluoreszenzsignal des Proteinkomplexes GBPfluo1 zu erhalten, bei einer möglichst geringen Direktanregung des YFPs. Da das CFP gebunden an GBPfluo1 im Bereich von 400 – 450 nm die größte Energieaufnahme zeigt, wie aus den Absorptionsspektren hervorgeht, muss das Anregungslicht diesem Wellenlängenbereich angehören. Eine möglichst spezifische Anregung von CFP muss zudem mit einer schmalbandigen Laserlichtquelle erfolgen, da auf zusätzliche Filter für den Anregungsstrahlengang aus Effizienz- und Platzgründen im Implantat verzichtet werden.
In Frage kommen aus diesen Gründen zur Anregung der Fluoreszenzemission die beiden momentan auf dem Markt erhältlichen Laserdioden von Sanyo bzw. Nichia mit den Anregungswellenlängen von 405 nm und 438 nm. Beide werden für die Fluoreszenzanregung getestet.
Diese werden eingesetzt in der Form des kommerziellen Laserdiodenmoduls Koheras LGT 440-220 mit der Anregungswellenlänge von 438 nm und eines selbst aufgebauten Moduls, bestehend aus der Sanyo Laserdiode DL 4146-101S mit der Anregungswellenlänge von 405 nm sowie dem Lasertreiberbaustein von iC-Haus, iC-WJB.
Zur Bewertung der Fluoreszenzanregung durch die beiden verschiedenen Lichtquellen, wird das emittierte Fluoreszenzspektrum der Proteine in Lösung mit dem Glasfaserspektrometer, Ocean Optics SD 2000, rechwinklig zur Anregungslichtquelle aufgenommen. Die Proben befinden sich in optischen Küvetten, platziert im Fokus des Laserstrahls. Der Aufbau ist in der Abbildung 4.2 (a) schematisch und in (b) als Realisation gezeigt.
Es wird der Proteinkomplex GBPfluo1 sowie das Protein YFP vermessen. Die Experimente werden in Lösung durchgeführt mit einer Proteinkonzentration von GBPfluo1 und YFP von je 2 µM. Die Durchführung der Experimente in Lösung ist ausreichend, da die Immobilisierung der Proteine im Hydrogel keine Auswirkungen auf die spektrale Form der CFP- und YFP-Absorptionsspektren hat, wie in Abschnitt 4.1.1 gezeigt.

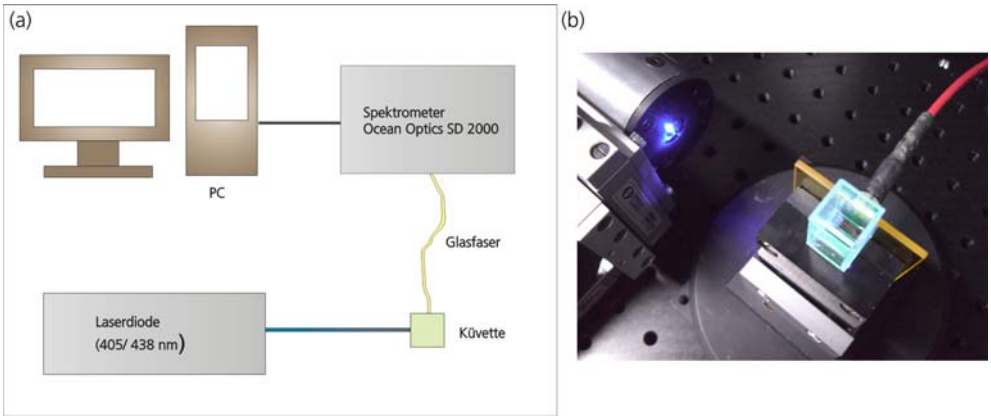


Abbildung 4.2: (a) Schema des experimentellen Aufbaus zur Messung der Emissionsspektren der Fluoreszenzproteine in Lösung. Die Fluoreszenzanregung wird mit zwei Laserdioden mit den Emissionswellenlängen 405 nm oder 438 nm durchgeführt. Das Fluoreszenzlicht wird mit einer 1 mm dicken Faser gesammelt und mit einem angeschlossenen Spektrometer analysiert.
(b) Experimenteller Aufbau zur Fluoreszenzmessung in Küvetten. Die Küvette ist im Laserstrahl platziert, senkrecht dazu ist die Detektionsfaser montiert, vor die optional optische Filter eingesetzt werden können.

Vergleicht man die Emissionsspektren von GBPfluo1 angeregt mit der 405 nm und der der 438 nm Laserdiode so wird, wie man aus Abbildung 4.3 entnehmen kann, ersichtlich, dass die Gesamtintensität bei der Anregungswellenlänge 438 nm höher liegt als bei 405 nm.

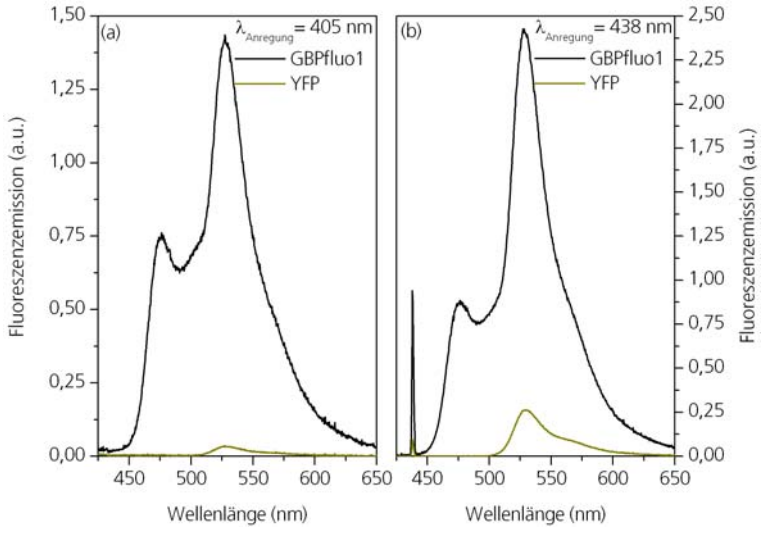


Abbildung 4.3: Fluoreszenzemissionsspektren der Fluoreszenzproteine YFP sowie des FRET-Konstrukts GBPfluo1. (a) bei der Anregungswellenlänge 405 nm, (b) bei der Anregungswellenlänge von 438 nm aufgenommen. Die Anregung der Proteinspektren mit 438 nm führt neben einer erhöhten Intensität zu einer erhöhten Direktanregung von YFP gegenüber der Anregung mit 405 nm.

Der YFP-Peak liegt bei 438 nm Anregung um den Faktor 1,7 höher verglichen mit dem YFP-Peak bei 405 nm Anregung. Das Verhältnis der Absorptionsquerschnitte in Lösung bei den entsprechenden Wellenlängen spiegelt mit einem Wert von 1,35 in etwa dieses

Ergebnis wieder. Weiter ist zu beobachten, dass die direkte Anregung von YFP bei 438 nm Anregung stärker ausfällt und somit ein höheres unspezifisches nicht FRET abhängiges YFP-Signal erzeugt wird.
Zur Quantifizierung des Verhältnisses des gesamten YFP-Signals gegenüber dem FRET-unabhängigen, direkt angeregten YFP-Signals im Proteinkonstrukt GBPfluo1, wird die YFP-Emission der Peak-Werte bei der Wellenlänge 527 nm des Gesamtkonstrukts und des freien YFPs bei der jeweiligen Anregungswellenlänge ins Verhältnis gesetzt. Es ergeben sich folgende Verhältnisse:

$$R^{YFP}_{GBP} \Big/ {}^{YFP}_{FREI}(405nm) = 39{,}8 \qquad 4.2$$

$$R^{YFP}_{GBP} \Big/ {}^{YFP}_{FREI}(438nm) = 9{,}3 \qquad 4.3$$

Bei Anregung mit 405 nm wird ein größeres Verhältnis von 39,8 und damit ein geringeres FRET unabhängiges direktes YFP-Signal gegenüber der Anregung mit 438 nm erzeugt.
Deshalb wird diese Laserdiode für das Sensorimplantat ausgewählt und für alle weiteren Experimente benutzt. Der Rückgang der Intensität der Emission des Proteinkonstrukts GBPfluo1 um 40%, ermittelt aus den Peak-Werten bei 527 nm, wird an dieser Stelle in Kauf genommen, kann aber durch eine entsprechende Erhöhung der Konzentration des Proteinkonstrukts kompensiert werden.

4.1.3 Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenz

Die maximale Proteinkonzentration, die für den Sensor verwendet werden kann, hängt von intermolekularen Wechselwirkungen ab, da mit zunehmender Proteinkonzentration die Abregung der Proteine durch Fluoreszenz zurückgeht und andere nicht strahlende Pfade der Energieabregung aufgrund der intermolekularen Wechselwirkungen zunehmen. Dieser Effekt wird Fluoreszenzlöschung bzw. „Quenching“ genannt [35].
Im Idealfall, es tritt kein „Quenching“ auf, verhält sich die Fluoreszenzintensität proportional zur Konzentration. Kommt es mit steigender Konzentration zu einer Abweichung vom linearen Verhalten, ist das ein Anzeichen für das Einsetzen der Fluoreszenzlöschung. Dies begrenzt die für den Sensor maximal mögliche Konzentration.
Zur Bestimmung der maximal möglichen Konzentration wird das Emissionsspektrum der Proteine GBPfluo1 bei steigenden Konzentrationen in Lösung spektrometrisch gemessen und die Intensität der CFP- und YFP-Maxima bei 480 nm und 527 nm gegenüber der Konzentration aufgetragen, dargestellt in Abbildung 4.4.
Bis 15 µM verhalten sich die Fluoreszenzsignale von CFP und YFP in etwa proportional zu deren Konzentrationen, angedeutet durch die rot gepunkteten Kurven. Mit steigender Konzentration flachen die Kurven aufgrund der Fluoreszenzlöschung ab. Anhand der dargestellten Messkurven wird eine maximal mögliche Konzentration von GBPfluo1 von 15 µM für den Sensor abgeschätzt, siehe blaue Markierung. Die weiteren Experimente werden deshalb mit einer Proteinkonzentration nahe der dieser der maximal möglichen Konzentration von 10 µM durchgeführt.

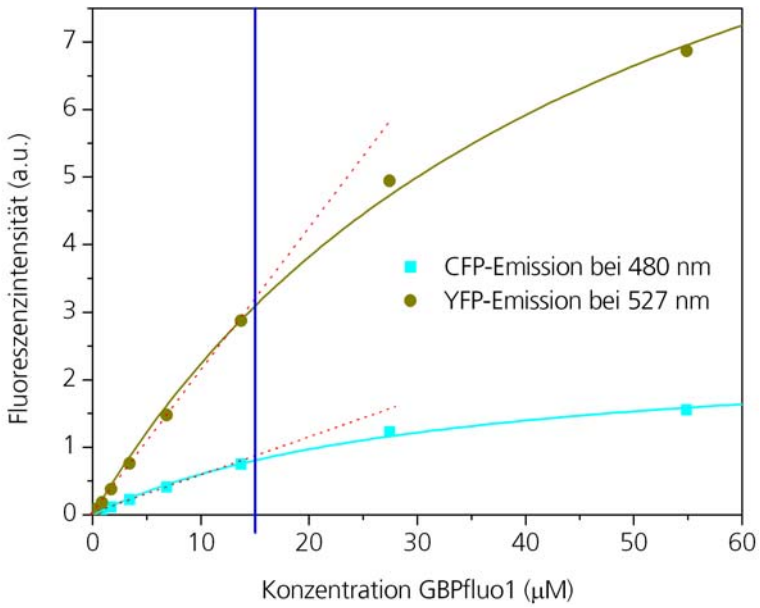


Abbildung 4.4: Fluoreszenzintensität bei 480 nm und 527 nm als Funktion der GBPfluo1 Konzentration inklusive linearer Näherung. Die kritische Konzentration, bei welcher der Effekt der Fluoreszenzlöschung beginnt die Fluoreszenz zu beeinflussen, es tritt eine Abweichung vom linearen Verhalten ein, liegt bei ca. 15 μM. Diese stellt die maximal mögliche Proteinkonzentration für den Sensor dar.

4.2 Proteine im synthetischen Hydrogelwellenleiter

Nach der grundlegenden optischen Charakterisierung der Proteine in Küvetten werden aus den synthetischen Hydrogelen nun kalziumsensitiven Wellenleiterstrukturen hergestellt und diese charakterisiert. Zuerst wird die Abhängigkeit des Fluoreszenzspektrums der GBPfluo1 Proteine von der Kalziumkonzentration anhand der Änderung des FRET-Verhältnisses untersucht und anschließend die Stabilität des Fluoreszenzsignals bei langer Laserbestrahlung.

4.2.1 Messmethode und Aufbau

Für die Charakterisierung der Sensorproteine im Wellenleiter wurde eine Messzelle entwickelt, die es ermöglicht den Hydrogelwellenleiter aufzunehmen. In dieser Zelle kann die Umgebungsflüssigkeit des Wellenleiters kontinuierlich gewechselt sowie gleichzeitig das Spektrum der Proteine gemessen werden. Damit kann der Hydrogelwellenleiter verschiedenen Kalziumlösungen ausgesetzt werden und gleichzeitig das sich entsprechend der Kalziumkonzentrationen ändernde Fluoreszenzsignal der Proteine mit dem oceanoptics Glasfaserspektrometer aufgezeichnet werden, siehe Abbildung 4.5 für eine Schemazeichnung. Beachtet werden muss, dass die Änderung des Fluoreszenzspektrums der Sensorproteine die Eindiffusion der Kalziumionen in das Hydrogel und deren Bindung an die Proteine im Hydrogel voraussetzt.

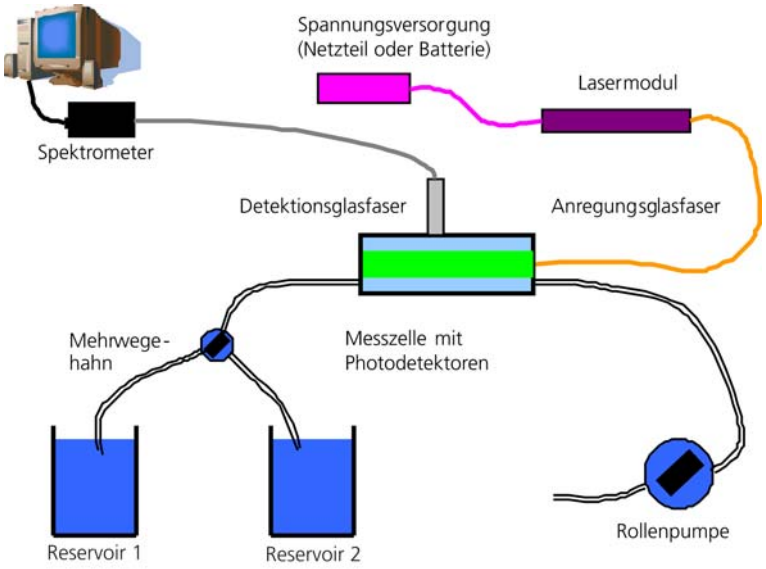


Abbildung 4.5: Schematischer Überblick des Messaufbaus zur Charakterisierung der kalziumsensitiven Hydrogelwellenleiter. Dieser besteht aus der Messzelle mit Hydrogelwellenleiter, angeschlossener Anregungsglasfaser mit Lasermodul und Spannungsversorgung sowie einem Perfusionssystem (Rollenpumpe, Reservoire, Mehrwegehahn) zum Lösungswechsel innerhalb der Messkammer und der Detektionseinheit, gebildet aus der Detektionsglasfaser, dem angeschlossenen Spektrometer und PC.

Die entwickelte Messzelle weist eine Größe von 0,8 cm x 0,8 cm x 2,0 cm auf. Sie besteht aus einer transparenten PMMA-Kammer mit aufgeklebten, eloxierten Aluminium-Boden und -Deckel, die jeweils zwei eingepresste Kanülen als Fluidanschlüsse beinhalten. Diese sind mit Reservoiren für die benötigten Lösungen verbunden. Zum Lösungstransport wird eine pulsationsarme ISMATEC Schlauchrollenpumpe mit 8 Rollen verwendet. Die Flussrate beträgt ca. 1 ml pro Minute. Der Deckel enthält gleichzeitig den Konnektor für den Lichtquellenanschluss. Dieser wird entweder über die Laserdiode direkt oder eine zwischen gesetzte Glasfaser realisiert. Eingesetzt werden die Hydrogele, indem sie durch die Öffnung für den Lichtquellenanschluss im Deckel eingeschoben werden. Diese Öffnung entspricht dem Wellenleiterdurchmesser und dient somit gleichzeitig als Halterung. Im Bereich des Glasfaserspektrometers ist der Hydrogelwellenleiter frei stehend und vollständig von der Analytflüssigkeit umgeben. Die Detektionsglasfaser für das Spektrometer wird in 90° Anordnung zum Wellenleiter angebracht und so auch mittels der geometrischen Anordnung die Detektion des Streulichts der Anregungslichtquelle minimiert. Die Glasfaserspitze ist dabei ca. 3,7 mm von der Mitte des Wellenleiterquerschnitts entfernt. Auf diese Weise kann die Eigenschaft des Wellenleiters optimal genutzt werden, da das Anregungslicht im Wellenleiter an der Detektionsfaser vorbei geführt wird, das isotrop ausgesendete Fluoreszenzlicht dagegen von der Faser aufgefangen wird. So ermöglicht die Anordnung einen einfachen Zugang zur Messung der Proteinspektren in sich wechselnden Umgebungsflüssigkeiten.
Wichtig bei den Messungen ist, dass sich die Position des Wellenleiters gegenüber der Messfaser nicht ändert, da dadurch die aufgefangene Lichtintensität beeinflusst wird.

Deshalb ist eine möglichst blasenfreie Perfusion der Kammer notwendig, da gerade Luftblasen die Position des Wellenleiters beeinflussen können oder selbst im Messbereich für Störungen sorgen.
In Abbildung 4.6 ist die Messzelle mit fluoreszierendem Proteinhydrogelwellenleiter, Glasfaserlichteinkopplung, Perfusionssystem und Detektionsfaser gezeigt.

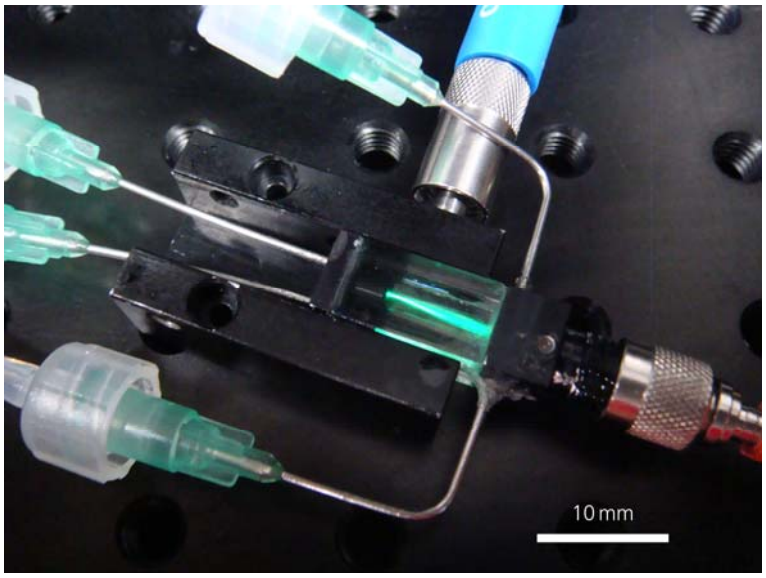


Abbildung 4.6: Messzelle mit Perfusionssystem zur Charakterisierung des Antwortverhaltens der Sensorproteine im synthetischen Hydrogelwellenleiter bei verschiedenen Umgebungslösungen. Das grüne Fluoreszenzlicht der Proteine aus dem Hydrogelwellenleiter wird in 90° Anordnung über ein Glasfaserkabel mit einem Spektrometer detektiert, die Lichteinkopplung ist hier mit einem Glasfaserkabel gezeigt.

4.2.2 Abhängigkeit des FRET-Signals von der Kalziumkonzentration

Die Effizienz des Försterenergietransfers bzw. FRET steigt mit zunehmender Kalziumkonzentration im sensitiven Bereich der Proteine an und führt damit zur Änderung des Emissionsspektrums. Zur Bestimmung der Kalziumsensitivität der Proteine im Hydrogelwellenleiter werden die Spektren der Proteine bei verschiedenen Kalziumkonzentrationen aufgezeichnet und mit Messungen in Lösung verglichen.
Die Stammlösung, TRIS-Puffer, wird hier mit speziellem Analysewasser hergestellt, welches eine Kalziumkonzentration von weniger als 25 nM Ca^{2+} enthält. Sie wird im Folgenden mit einer Kalziumkonzentration von 0 µM bezeichnet. Weiter werden die synthetischen Hydrogelwellenleiter mit einem Durchmesser von 0,76 mm benutzt und, mit einer Proteinkonzentration von 10 µM beladen, in die Durchflussmesszelle eingesetzt. Die Hydrogelwellenleiter werden für eine Dauer von 10 Minuten der jeweiligen Kalziumlösung ausgesetzt, bis sich durch die Kalziumeindiffusion ein Gleichgewicht einstellt, und anschließend ein Spektrum aufgezeichnet. In der Durchflusszelle werden die TRIS-Pufferlösungen mit Konzentrationen von 0, 100, 200, 500, 1000, 2000, 3500, 5000, 7500 und 10000 µM Ca^{2+} nacheinander eingefüllt.

Die Experimente in Lösung werden in Küvetten mit TRIS-Puffer und einer Proteinkonzentration von 10 µM, durchgeführt.
In Abbildung 4.7 ist die Antwort der Fluoreszenzproteine in Lösung und im Hydrogel auf verschiedene Kalziumlösungen gezeigt.

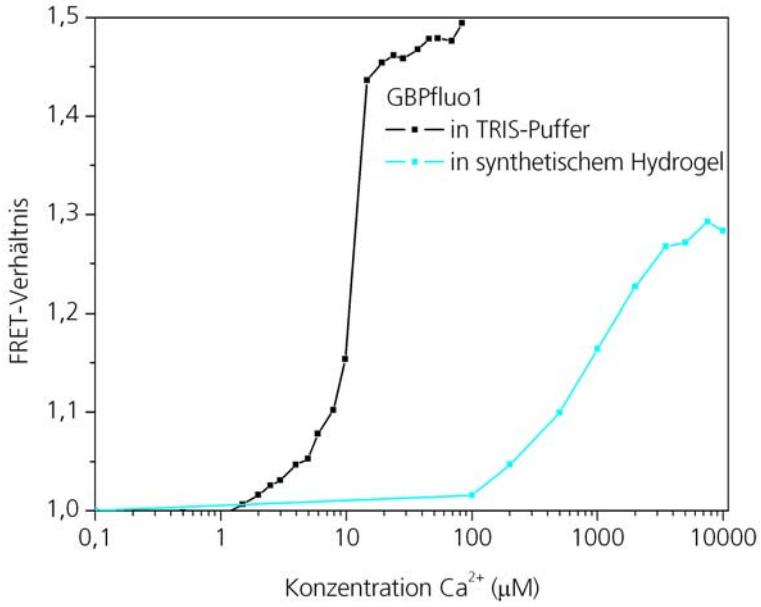


Abbildung 4.7: FRET-Antwort der Fluoreszenzproteine bei Anwesenheit von verschieden konzentrierten Ca^{2+}-Lösungen in Lösung und in Hydrogelwellenleitern immobilisiert. Der sensitive Bereich erstreckt sich in Lösung von 0 – 20 µM, im Hydrogel dagegen von 0 - 5000 µM Ca^{2+}.

Das dargestellte FRET-Signal der Spektrometermessungen setzt sich zusammen aus dem Verhältnis der Maxima von YFP und CFP bei den Wellenlängen 527 nm und 480 nm und wird bei einer Kalziumkonzentration von 0 µM auf 1 normiert.
Deutlich ist ein beträchtlicher Unterschied, um den Faktor 100, im Konzentrationsbereich, in dem eine Veränderung der FRET-Verhältnisse stattfindet, zwischen den Experimenten in Lösung und im Hydrogelwellenleiter zu erkennen. Der Konzentrationsbereich in dem eine Veränderung des FRET-Signals in Lösung erzeugt wird, erstreckt sich von 1 – 20 µM Ca^{2+}, im Hydrogel hingegen von 100 – 5000 µM Ca^{2+}. Weitere Unterschiede bestehen in den Maximalwerten der FRET-Verhältnisse. In Lösung nimmt das FRET-Verhältnis maximal um 45% zu. Im Hydrogel dagegen nur um 27%.
Eine Erklärung dieses Verhaltens ist, dass die in den Poren des Hydrogels immobilisierten Proteine in ihrer Bewegungsfreiheit eingeschränkt sind, sich nicht vollständig öffnen können und so die maximale FRET-Änderung reduziert ist. In Abbildung 4.8 sind zur Verdeutlichung des Proteinverhaltens in Lösung (a) und im Hydrogel (b) exemplarisch drei signifikante Spektren bei unterschiedlichen Kalziumkonzentrationen gezeigt. Dabei sind die Intensitäten der beiden Experimente (a) und (b) nicht auf eine gemeinsame Norm bezogen.

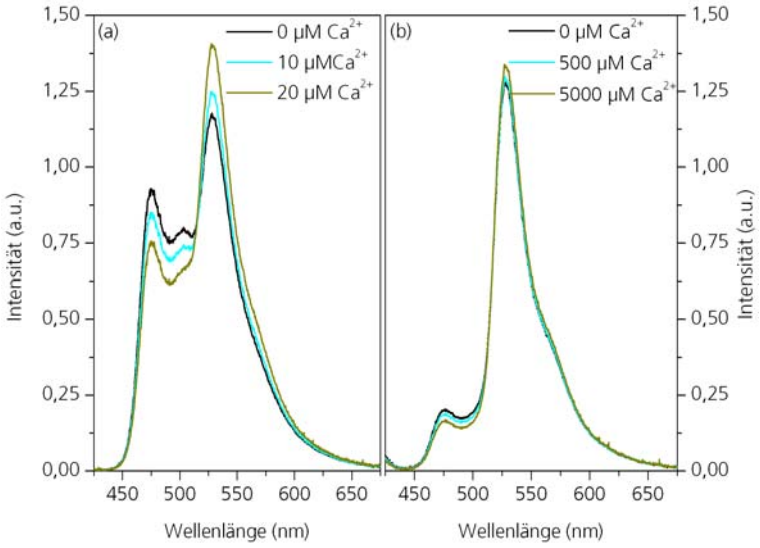


Abbildung 4.8: Spektren der Fluoreszenzproteine bei Anwesenheit von verschieden konzentrierten Ca^{2+}-Lösungen. (a) in Lösung, (b) im Hydrogel. Die Intensitäten von (a) und (b) sind nicht identisch skaliert.

Die Spektren unterstreichen diese These, da sie neben der geringeren Kalziumantwort des Proteins ein stark überhöhtes YFP-Signal im Hydrogel aufzeigen, was auf eine Stauchung des Proteins durch die Poren hinweist.
Die Verschiebung des sensitiven Bereichs der Proteine im Hydrogel wird auf das Hydrogel selbst zurückgeführt, da es durch eine Kalziumeinlagerung die Kalziumkonzentration in der Umgebung der Proteine beeinflusst. Das chemische Gleichgewicht bildet sich im Hydrogelwellenleiter demnach durch drei Reaktionspartner, das Hydrogel, das Sensorprotein und das Kalzium. Das führt dazu, dass der dynamische Bereich der Signalantwort der Proteine in den physiologisch relevanten Bereich verschoben wird.
Diese Ergebnisse zeigen die Funktionalität der Proteine im Hydrogelwellenleiter und die Möglichkeit, mit Hilfe dieses Konzepts Kalziumkonzentrationen im Bereich von 0 - 5 mM nachzuweisen.

4.2.3 Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D

Die Dissoziationskonstante gibt die Gleichgewichtskonzentration zwischen den an das Protein P gebundenen und ungebundenen Kalziumionen c, unter Vernachlässigung des Einflusses des Hydrogels, an. Sie ist deshalb ein Orientierungswert in welcher Konzentrationsgrößenordnung die chemische Reaktion, siehe Gleichung 4.4,

$$[c]+[P]\longleftrightarrow[cP] \qquad \textbf{4.4}$$

reversibel abläuft und dient an dieser Stelle zur Verifizierung des in Abschnitt 4.2.2. ermittelten sensitiven Konzentrationsbereichs der Sensorproteine. Die Dissoziationskonstante K_D ergibt sich aus dem Massenwirkungsgesetz [36] wie folgt:

$$K_D = \frac{[c][P]}{[cP]} = \frac{[c]\cdot([P_g]-[c_g]+[c])}{[c_g]-[c]} \qquad \textbf{4.5}$$

Hierbei stehen [c] und [P] für die freien Konzentrationen des Analyten c und des Proteins P. [cP] stellt die Konzentration des gebundenen Komplexes aus c und P dar. $[P_g]$ ist die im Hydrogel immobilisierte Gesamtkonzentration der Proteine und $[c_g]$ die gesamte zur Messung vorliegende Konzentration des Analyten Kalzium, siehe Gleichungen 4.6 und 4.7.

$$[P_g] = [P]+[cP] \qquad \textbf{4.6}$$

$$[C_g] = [c]+[cP] \qquad \textbf{4.7}$$

Aus Gleichung 4.5 ergibt sich eine quadratische Gleichung für die freie Konzentration des Analyten c, es gilt:

$$[c]^2 + [c]\cdot([P_g]-[c_g]+K_D)-K_D[c_g]=0 \qquad \textbf{4.8}$$

Die Nullstelle der Gleichung 4.8, die zu positiven Konzentrationswerten führt, siehe Gleichung 4.9,

$$[c]=\frac{-([P_g]-[c_g]+K_D)+\sqrt{([P_g]-[c_g]+K_D)^2+4K_D[c_g]}}{2} \qquad \textbf{4.9}$$

wird nun weiter im Modell zur Berechung des FRET-Verhältnisses verwendet. Für das Modell zur Bestimmung des FRET-Verhältnisses gilt nach Politu [37] und Eftink [38]:

$$FRET_{Verhältnis} = \frac{FRET_0 + FRET_{\max}[c]/K_D}{1+[c]/K_D} \qquad \textbf{4.10}$$

wobei $FRET_0$ das Verhältnis bei der geringsten Analytkonzentration und $FRET_{max}$ das Verhältnis bei maximaler Analytkonzentration darstellt. Im Gegensatz zu dem Modell beschrieben in [37] wird hier das FRET-Verhältnis anstelle der Fluoreszenzintensität verwendet, da in diesem Fall das FRET-Verhältnis charakteristisch für die Bindung des Analyten ist.
Das in Gleichung 4.10 abgeleitete Model wird nun als Fitfunktion zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D benutzt. Die gefitteten Daten entsprechen den unnormierten, bereits in Abbildung 4.7 diskutierten Messwerten, erhalten durch Verhältnisbildung der CFP- und YFP-Maxima der Proteinspektren, gemessen bei

verschiedenen Kalziumkonzentrationen in der Perfusionszelle im synthetischen Hydrogelwellenleiter. Die Daten und die Fitkurve sind in Abbildung 4.9 gezeigt.

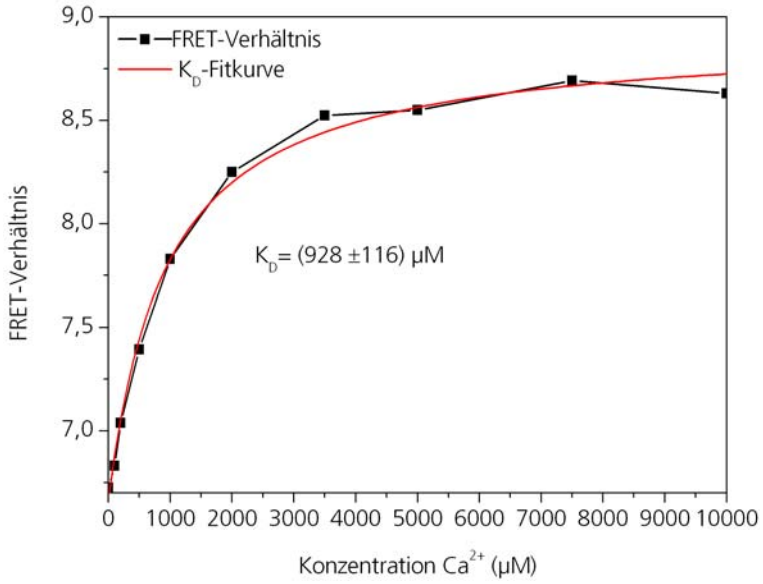


Abbildung 4.9: Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D des Gesamtsystems aus der FRET-Antwort der Fluoreszenzproteine bei Anwesenheit von verschieden konzentrierten Ca^{2+}-Lösungen im Hydrogelwellenleiter. K_D beträgt (928 ±116) µM.

Der Fit liefert bei guter Übereinstimmung mit den Messwerten eine Dissoziationskonstante von (928 ±116) µM. Sie bestätigt somit die Größenordnung des sensitiven Bereichs der Proteine, der sich, wie in Abschnitt 4.2.2 bestimmt, von 0 – 5000 µM erstreckt.
An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass der Ansatz obiger chemischer Reaktion zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten des Proteins und des Analyten aufgrund der Ergebnisse in Abschnitt 4.2.2 eine interpretationsbedürftige Vereinfachung darstellt, da das Hydrogel Einfluss auf die Konzentration des Analyten in der Umgebung des Proteins nimmt. Die ermittelte Dissoziationskonstante darf nicht als charakteristisch für die Analyt-Proteinbindung angesehen werden, sondern für das Gesamtsystem. Sie ist also eine effektive Dissoziationskonstante.

4.2.4 Stabilität der Proteine im Hydrogelwellenleiter

Die letzte Frage, die grundlegend zu beantworten ist, ist die nach der Stabilität der Fluoreszenzproteine. Es wird gemessen wie stark die Emission der Proteine sowohl in Lösung als auch im Hydrogelwellenleiter bei dauerhafter Laserbestrahlung zurückgeht, da die Energie, die durch Photonen von der Lichtquelle an die Proteine übertragen wird, durch wiederholte Absorptions- und Emissionsvorgänge der Fluoreszenzproteine, mit der Zeit zu einem Nachlassen des Fluoreszenzsignals führt [39].
Zur Messung des Ausbleichens der Proteine in Lösung wird eine 250 µl TRIS-Lösung mit 2 µM GBPfluo1 und 5 mM Ca^{2+} in einer Küvette über 14 Stunden gemessen. Der

Zustand des Proteins wird durch die 5 mM Kalziumlösung eingestellt und stabilisiert. Alle 15 Minuten wird ein Spektrum aufgezeichnet. Die Anregung wird mit der Laserlichtquelle mit 405 nm Anregungswellenlänge durchgeführt. Die optisch zugeführte Leistung beträgt ca. 1,8 mW, der Verlust über die optische Weglänge von 0,5 cm innerhalb der Lösung wird vernachlässigt. Weiter wird angenommen, dass innerhalb der Lösung alle Proteine die gleiche Anzahl an Photonen absorbieren also, dass die durchleuchtete Fläche senkrecht zum Laserstrahl mit einem Inhalt von 25 mm^2 homogen ausgeleuchtet wird.
Im synthetischen Hydrogelwellenleiter mit einem Durchmesser von 0,76 mm wird mit einer Proteinkonzentration von 10 µM und einer TRIS-Umgebungslösung mit ebenfalls 5 mM Ca^{2+} gearbeitet, die eingekoppelte Laserleistung beträgt 3,1 mW, die Messzeit beträgt 16 Minuten und das Spektrum wird 1 mal pro Minute aufgenommen. Die Messung wird nach ca. 0,5 cm optischer Weglänge innerhalb des Wellenleiters durchgeführt und hier ein, in Abschnitt 3.2.2 bestimmter, mittlerer Wellenleiterverlust von 5 dB/cm berücksichtigt.
Aus dem Absorptionsquerschnitt der Proteine in Lösung, der Anregungswellenlänge, der durchstrahlten Querschnittsfläche und der optischen Leistung wird die Anzahl der absorbierten Photonen pro Protein GBPfluo1 berechnet, siehe Anhang A.1. Für beide Experimente wird zur Berechnung der Absorptionsquerschnitt in Lösung bei 405 nm verwendet, da dieser in Abschnitt 4.1.1 genauer bestimmt werden konnte und in der gleichen Größenordnung liegt wie der Absorptionsquerschnitt im Hydrogel.
Die Umrechnung wird durchgeführt, da das Ausbleichen der Proteine auf deren Absorption der Laserstrahlung basiert. In Abbildung 4.10 sind die Ergebnisse der Messungen der Proteine in Lösung und im Hydrogel zum Vergleich dargestellt.
Gezeigt sind die normalisierten YFP_{527nm} und CFP_{480nm} Maximalwerte, wobei der Ausgangswert von YFP auf 1 und der von CFP auf 0,5 normiert wurden.
In Lösung ist nur ein Ausbleichen von YFP zu beobachten. Die Intensität nimmt im dargestellten Bereich von 0 – 40000 absorbierten Photonen pro Protein auf 84% ab. Die CFP-Intensität bleibt hingegen konstant.
Die Proteine immobilisiert im Hydrogel zeigen ein ähnliches Verhalten. Im betrachteten Intervall geht die YFP-Intensität auf 92% zurück, die CFP-Intensität bleibt ebenfalls konstant.
Diese Ergebnisse zeigen, dass das Hydrogel als Immobiliseriungsmatrix die Stabilität und Degeneration der Proteine durch Laserstrahlung positiv beeinflusst und das Ausbleichen der Proteine reduziert.

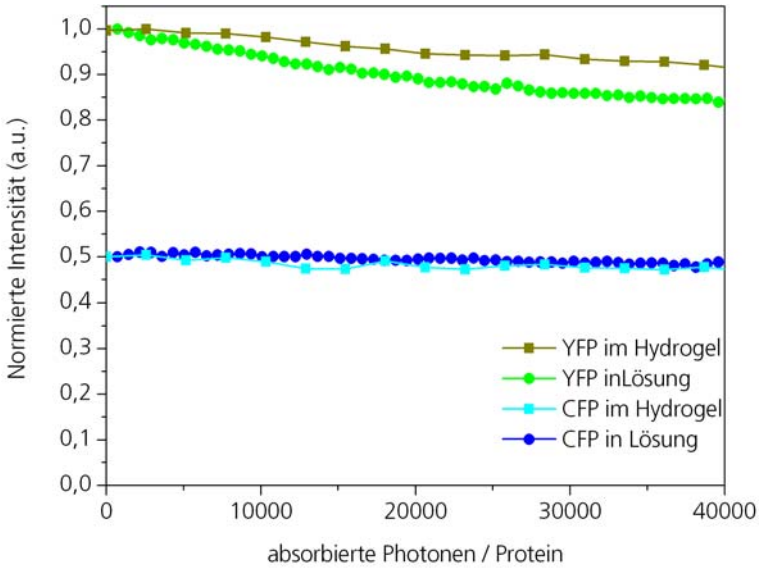


Abbildung 4.10: Langzeitmessung der Fluoreszenzintensitäten der CFP- und YFP-Maxima bei 480 nm und 527 nm des Proteins GBPfluo1 in Lösung und im Hydrogelwellenleiter zur Untersuchung des Einflusses der Laserstrahlung. Die Intensitäten werden gegenüber der Anzahl absorbierter Photonen pro Protein aufgetragen. Dabei werden die YFP-Werte auf 1 und die CFP-Werte auf 0,5 normiert.
Aus den unterschiedlichen Abnahmen der Messkurven ist zu erkennen, dass das Hydrogel den schädigenden Einfluss der Laserstrahlung reduziert.

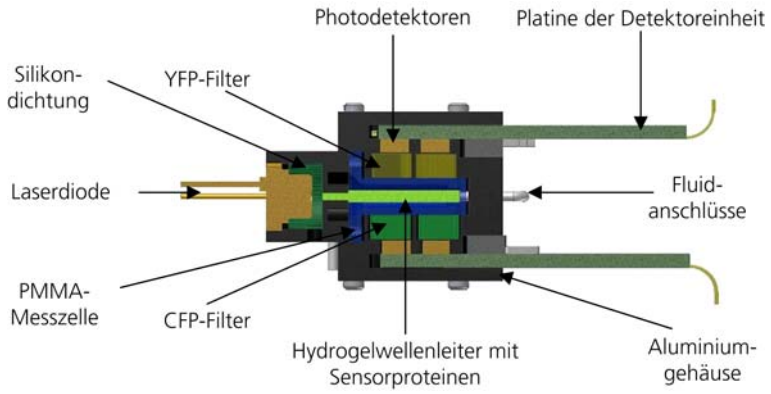
Eine Abschätzung der absorbierten Photonenzahlen im Falle der Sensoranwendung ergibt, bei einer Betriebsdauer von einem Jahr, einer Laserausgangsleistung von 0,1 mW und einer Messzeit von 0,4 s je Messung und 96 Messungen am Tag eine Photonenzahl von ca. 20000. In dieser Größenordnung geht das YFP-Signal im synthetischen Hydrogelwellenleiter auf ca. 95% zurück. Dieser Rückgang wird als unkritisch für ein Sensorimplantat angesehen. Berücksichtig werden muss allerdings, dass hier allein der Einfluss der Laserstrahlung auf das FRET-Signal der Proteine betrachtet wird und durch eine Dauerbestrahlung ein beschleunigtes Altern der Proteine simuliert wurde. Es wurde bisher kein Langzeitversuch über mehrere Monate mit wiederholten kurzen Lasermesspulsen entsprechend der Sensoranwendung durchgeführt. Dieser würde die Stabilität des Proteins in physiologischer Umgebung über diesen langen Zeitraum noch besser abbilden.

5 Biosensor

In diesem Kapitel wird gezeigt, wie das neue Konzept des kalziumsensitiven Hydrogelwellenleiters zu einem eigenständigen Sensor weiterentwickelt wird, mit dem es möglich ist die FRET-Signale der Proteine zu messen, ohne auf ein Spektrometer zurückzugreifen. Es steht am Anfang eine kurze Bestandsaufnahme aller für diese Entwicklung eines Sensordemonstrators notwendigen Komponenten und dessen Konstruktion. Anschließend wird im Detail die Funktion dieser Komponenten und deren Integration erläutert sowie der Demonstrator charakterisiert.

5.1 Konstruktion des Sensordemonstrators

Die typischen Komponenten eines optischen Fluoreszenzsensors finden sich auch in dem hier entwickelten Biosensors wieder. Zuerst wird eine Anregungslichtquelle benötigt. Es wird die in den vorangegangenen Experimenten ausgewählte Laserdiode mit 405 nm Emissionswellenlänge benutzt. Die Lichtquelle wird in einer Kopplungsvariante über eine Glasfaser an den Hydrogelwellenleiter gekoppelt. Alternativ wird in einer zweiten Kopplungsvariante auch die direkte Kopplung der Laserdiode ohne weitere optische Elemente an den Hydrogelwellenleiter untersucht. In beiden Kopplungsvarianten wird das Anregungslicht stirnseitig in den Hydrogelwellenleiter mit den immobilisierten Sensorproteinen eingekoppelt.



CAD-Zeichnung 5.1: Aufbau des Sensordemonstrators mit allen Komponenten im Querschnitt. In der Messzelle, versehen mit Fluidanschlüssen für das Perfusionssystem, befindet sich der Hydrogelwellenleiter. Darauf sind die Filter und die Photodetektoren mit der Platine der Detektionseinheit platziert. Stirnseitig ist hier die Laserdiode mit Silikonhaube montiert. Das Gehäuse ist aus schwarz eloxiertem Aluminium gefertigt.

Der Hydrogelwellenleiter selbst befindet sich in einer miniaturisierten transparenten PMMA-Messkammer. Diese wird über Fluidanschlüsse befüllt. Diese erlauben es, auch während der Messung, kontinuierlich die Umgebungsflüssigkeit des Wellenleiters zu tauschen. Auf der durchsichtigen Messkammer sitzen längs des Wellenleiters optische Filter für die beiden Fluoreszenzfarbstoffe CFP und YFP rechtwinklig zum geführten

Anregungslicht, um möglichst nur isotrop ausgesendetes Fluoreszenzlicht zu transmittieren und Streulicht zu reflektieren bzw. zu blockieren. Direkt dahinter befinden sich die Photodetektoren für CFP und YFP aus deren Signalen dann das FRET-Signal gebildet wird. Die Photodetektoren sind auf einer Platine aufgelötet, die gleichzeitig eine Verstärkungselektronik beinhaltet. Die spektralen Anteile von CFP und YFP des Emissionsspektrums werden durch die zugehörigen optischen spektralen Bandpassfilter getrennt und von je einem Photodetektor detektiert und in ein elektrisches Spannungssignal gewandelt. Diese Anordnung, bestehend aus optischen Filtern und Photodetektoren, ersetzt die spektrometrische Signalerfassung. Mechanisch wird das System in einem schwarz eloxierten Aluminiumkörper gehalten. Dieser schützt die Photodetektoren zusätzlich vor einfallendem Raumlicht. Der so konstruierte Aufbau ist in CAD-Zeichnung 5.1 gezeigt.
Das System wird in dieser Form mit einem externen Mikro-Controller und dem Lasermodul verbunden. Die Steuerung und Datenerfassung des Sensorsignals erfolgt mittels PC.
Das Sensorsignal, aufgrund der Funktionsweise der Proteine als FRET-Verhältnis $R_{YFP/CFP}$ bezeichnet, ergibt sich dann, wie in Abschnitt 2.3 eingeführt, wie folgt:

$$R_{YFP/CFP} = \frac{V_{YFP} - 0{,}381 \cdot V_{CFP}}{V_{CFP}} \qquad \textbf{5.1}$$

wobei V_{YFP} und V_{CFP} für die Spannungssignale der zugehörigen Detektoren stehen. Das YFP-Signal wird um 38,1% des CFP-Signals rechnerisch korrigiert, gemessen gegen das Integral im CFP-Filter, da dieser Anteil des CFP-Signals dem integralen spektralen Überlapp des CFP-Emissionsspektrums mit dem Transmissionsbereich des YFP-Filters, wie bereits in Abbildung 2.6. gezeigt, entspricht.

5.2 Integration

Die Herausforderung der Integration der beschriebenen Komponenten besteht darin, in einer möglichst kompakten Anordnung alle Komponenten funktionell zu verbinden. Als erstes wird die Lichteinkopplung in den Wellenleiter beschrieben, weiter folgt das optische System zur Detektion und zum Schluss der Gesamtaufbau inklusive Fluidsystem.

5.2.1 Lichteinkopplung

Zur effizienten Lichteinkopplung ohne große Verluste werden zwei Ansätze verfolgt. Erster Ansatz ist die Lichtfreisetzung innerhalb des Hydrogels mittels einer eingesteckten Glasfaser. Zweitens wird die Freistrahleinkopplung mittels Laserdiode, die direkt vor dem Hydrogelwellenleiter platziert ist, getestet.

Lichteinkopplung mittels Glasfaser
Die Einkopplung des Laserlichts in den Wellenleiter mittels eingesteckter Faser führt zu sehr kleinen Leistungsverlusten bei der Kopplung des Hydrogels mit der Faser, da

annähernd das gesamte Licht aus der Faser im Hydrogelwellenleiter freigesetzt und nur ein sehr kleiner Anteil in die Faser zurück reflektiert wird. Weiter werden Auskopplungsverluste durch den Öffnungswinkel der Faser minimiert, da der Öffnungswinkel der Faser mit einer numerischen Apertur von 0,22 in Luft [40] einen Reflexionswinkel θ_R von 81° im Hydrogelwellenleiter ergibt, siehe Anhang A.1. Dieser Winkel θ_R ist größer als der Totalreflexionswinkel von 75° an der Hydrogel-Wassergrenzfläche, berechnet nach Gleichung 2.2, so dass das eingekoppelte Licht den Hydrogelwellenleiterkern nicht verlassen kann. Die zur Bestimmung der Winkel notwendigen Brechungsindizes von Hydrogel und Wasser liegen bei $n_{Hydrogel}$ = 1,399 und n_{Wasser} = 1,349, entnommen aus Abbildung 3.7 bei 405 nm. Somit wird das Licht, das aus der Faser austritt, vollständig an der Hydrogel-Wasser-Grenzfläche reflektiert und im Hydrogelwellenleiter geführt, siehe Abbildung 5.2.

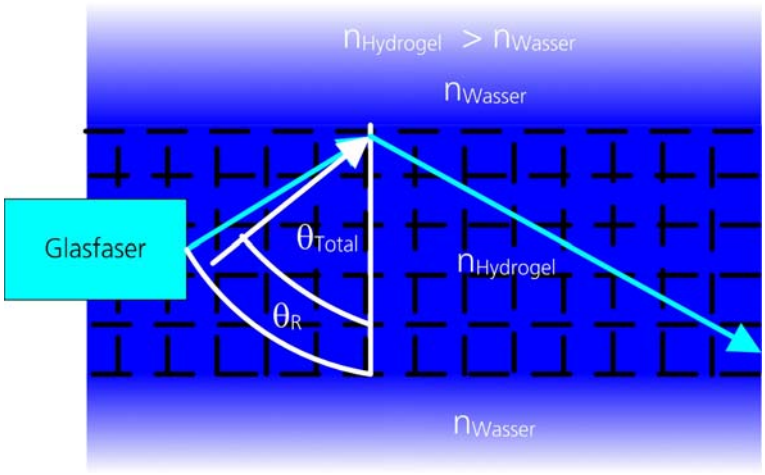


Abbildung 5.2**:** Schemazeichnung der Glasfaser-Hydrogelwellenleiterkopplung. Das Licht das die Glasfaser verlässt wird vollständig an der Hydrogel-Wasser-Grenzfläche mit $n_{Hydrogel} > n_{Wasser}$ reflektiert, da der Reflektionswinkel des Lichts aus der Glasfaser θ_R den Totalreflexionswinkel θ_{Total} übersteigt.

Für diese Methode wird eine Standard-Multimodefaser verwendet. Alle Schutzummantelungen der Faser werden entfernt, so dass nur noch der Glasfaserkern, mit Ummantelung, „core und cladding" bestehen bleiben. „Core" und „cladding" besitzen Durchmesser von 60 und 125 µm. Weiter wird die Faser mit einer Keramiktrennscheibe angeschnitten und gebrochen, um eine möglichst ebene Facette der Faser zu bekommen, da eine beschädigte Facette zu ungewünschten Lichtaustrittswinkel führt. Die Qualität der Facette wird optisch beurteilt. Zeigt sich auf einer Bildebene senkrecht zur Faser ein kreisrunder Lichtfleck ist das Brechen der Faser gelungen und die Vorbereitung abgeschlossen. Danach wird die Faser vorsichtig in die Stirnfläche des Hydrogels eingeschoben. Ein wichtiger Parameter hierbei ist die Festigkeit des Hydrogels. Ist das Hydrogel zu fest, kann die Faser nicht eingeschoben werden und bricht. Gleichzeitig ist eine Zusammenschiebung und Stauchung des Hydrogels möglich. In diesem Fall krümmt sich das Hydrogel meistens und bleibt nicht in seiner vorgesehen Position. Deshalb wird der Polymergehalt mit ca. 60% des

Hydrogels so gewählt, dass weiche Hydrogele entstehen, in die die Faser eingeschoben werden kann. Der Durchmesser des Hydrogels kann nicht beliebig klein gewählt werden, da der Hydrogeldurchmesser den Faserdurchmesser übersteigen muss.
Unter Berücksichtigung dieser Aspekte wurde zum Abschluss dieser Entwicklung eine Glasfaser-Hydrogelkopplung für einen kleinsten Hydrogeldurchmesser von 1,1 mm realisiert.
Zur Integration der Faser selbst in den Sensor, wird die Faser in einem FSMA-Standardkonnektor geführt. Mit Hilfe diese Konnektors wird die Faser durch eine Schraubverdingung mit der Messkammer verbunden, siehe Abbildung 5.3.
Die Glasfaser-Hydrogelkopplung weist eine Reihe von Defiziten auf, die sich für den Sensor nachteilig auswirken:

- Der Konnektor ist mit 17 mm Länge und 8 mm Durchmesser vergleichsweise groß.
- Die Kopplung der Faser an die Lichtquelle muss entweder ebenfalls mit einem FSMA-Konnektor hergestellt werden, oder aber die Faser muss mit einem speziellen Verfahren direkt auf die Lichtquelle aufgeschweißt werden. Da der Konnektor für die Experimente die größere Flexibilität bietet, wird auf diese Lösung zurückgegriffen.

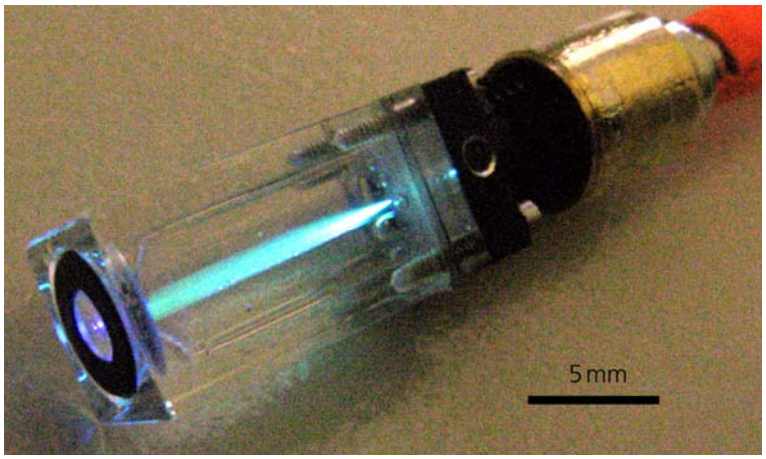


Abbildung 5.3: PMMA-Messzelle, gefüllt mit Wasser und Hydrogelwellenleiter mit fluoreszierenden Sensorproteinen. Der Hydrogelwellenleiterdurchmesser beträgt 1,1 mm bei einer Länge von 10 mm. Die Lichteinkopplung erfolgt mit einer 2 mm lang freistehenden Glasfaser, eingepresst in das Hydrogel, die mit einem FSMA-Konnektor aufgeschraubt ist.

- Diese Art der Kopplung der Faser und der Lichtquelle ist mit sehr hohen Verlusten belegt, die die Vorteile der verlustfreien Glasfaser-Hydrogelkopplung egalisiert.
- Weiter ist die Einführung der Faser in das Hydrogel kein reproduzierbarer Prozess.

Diese Gründe führen dazu ein zweites Kopplungsprinzip, die Freistrahleinkopplung zu entwickeln und zu untersuchen.

Freistrahleinkopplung mittels Laserdiode

Freistrahlkopplung bedeutet, dass das Licht nach dem Austritt aus der Laserdiode bis zur Einkopplung in den Hydrogelwellenleiter nicht optisch geführt wird. Das Anregungslicht trifft in diesem Konzept ohne zusätzliche optische Abbildungselemente, wie zum Beispiel Linsen, auf die Stirnfläche des Wellenleiters und breitet sich dann im Wellenleiter aus. Auf die strahlformenden, optischen Abbildungselemente wird hier aus Platzgründen bewusst verzichtet.

Um diese Anordnung zu realisieren, wird die Laserdiode in einem Halter unmittelbar hinter dem Wellenleiterende platziert. Die Laserdiode bekommt zusätzlich eine 0,8 mm dicke, transparente Silikonhaube aufgesetzt, die die Diode vor dem direkten Kontakt mit dem Hydrogel, Beschädigung durch Flüssigkeit und eventuellen Kurzschlüssen schützt, da bei einem direkten Kontakt zum Hydrogel, durch dessen Poren hindurch ein Kontakt zur Umgebungsflüssigkeit des Hydrogelwellenleiters besteht. Gegenüber der Glasfaser-Hydrogelkopplung ergeben sich folgende Unterschiede.

- Es steht nicht das gesamte Licht das die Laserdiode, bei annähernd gleicher numerischer Apertur wie die Glasfaser [41], verlässt zur Einkopplung in den Wellenleiter zur Verfügung, da der Durchmesser des Lichtaustrittskegels der Laserdiode mit 1,40 mm, geometrisch ermittelt, an der Stirnsite des Hydrogelwellenleiters größer ist als der Hydrogeldurchmesser mit 0,76 mm.
- Es treten zusätzliche Reflektionsverluste an der Hydrogeleintrittsfläche und der Silikonhaube auf.
- Dafür vereinfachen sich Integration und Kopplung bei einem gleichzeitig kompakteren Aufbau, da im Sensor lediglich ein Halter für die Laserdiode inklusive Silikonhaube benötigt wird, der Hydrogelwellenleiter und Diode verbindet.

In Abbildung 5.4 ist die direkte Kopplung der Laserdiode mit einem 0,76 mm dicken Hydrogelwellenleiter gezeigt.

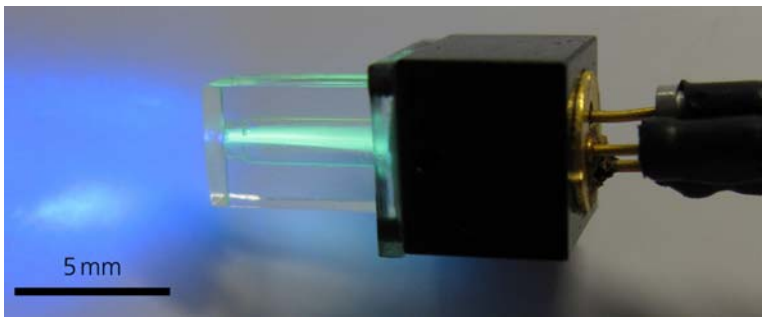


Abbildung 5.4: Realisierung des Freistrahlkopplungsprinzips mittels Laserdiode: Der Hydrogelwellenleiter befindet sich in der PMMA-Messzelle von Wasser umgeben. Direkt dahinter wird die Laserdiode mit Silikonhaube zur Lichteinkopplung im Aluminiumgehäuse eingesetzt. Die Fluoreszenz der Sensorproteine ist entlang des Wellenleiters grün zu sehen. Das im Hydrogelwellenleiter geführte blaue Anregungslicht der Laserdiode dagegen verlässt die Messzelle an deren Ende und tritt erst dort in Erscheinung.

Die Laserdiode befindet sich mit einer Silikonhaube versehen in dem Aluminiumblock mit den Abmessungen 7,4 mm x 7,4 mm x 6,3 mm. Der Aluminiumblock weist am Ende eine passende Bohrung für den Wellenleiter auf und begrenzt auf diese Weise das

Licht der Laserdiode auf den Wellenleiter. So gelangt kein Anregungslicht direkt in den transparenten Messbereich, der von einer polierten PMMA-Kammer gebildet wird. Das Licht der Laserdiode regt die Fluoreszenz der Sensorproteine an, die isotrop das grüne Fluoreszenzlicht aussenden. Das Anregungslicht wird im Wellenleiter geführt und tritt erst am Ende des Wellenleiters beim Verlassen der Messzelle blau in Erscheinung.

Bewertung der Kopplungsprinzipien

Das Hauptkriterium für die Auswahl des Kopplungsprinzips ist die effiziente Lichteinkopplung in den Hydrogelwellenleiter. Weitere Kriterien sind die Kompaktheit des Aufbaus und die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Kopplung.
Zur Messung der optischen Einkopplungsleistung in den Hydrogelwellenleiter der beiden Verfahren, wird die optische Leistung jeweils an der Eintrittsstelle des Anregungslichts in den Wellenleiter mit einem optischen Leistungsmessgerät bestimmt. Die Leistungsmessung wird deshalb im Fall der Faserkopplung direkt nach dem Austritt des Lichts aus der Faserspitze durchgeführt. Im Fall der Freistrahleinkopplung wird die Messung der Lichtleistung am Ausgang des Laserdiodenhalters nach dem Durchgang des Laserlichts durch die Silikonhaube durchgeführt. Die Ausgangsleistung der Laserdioden wird in beiden Fällen vorab gleich eingestellt und beträgt 7,1 mW.
Es ergeben sich Werte für die eingekoppelte Leistung bei der Freistrahlkopplung von 3,5 mW und am Faserausgang von 25 µW.
Damit folgt abschließend diese Bewertung:

- Das Prinzip der Freistrahlkopplung weist bezüglich der Einkopplungsleistung die um den Faktor 140 besseren Werte gegenüber der Faserkopplung auf. Somit wird die von der Laserdiode verbrauchte Energie effizienter genutzt.
- Der Platzbedarf der für die Freistrahleinkopplung benötigten Komponenten, ist um den Faktor 2,5 geringer gegenüber dem bei der Faserkopplung benötigten Konnektor.
- Des Weiteren ist die Kopplung zwischen Hydrogelwellenleiter und Laserdiode einfach und zuverlässig umzusetzen.

Die Gegenüberstellung dieser Kriterien führt eindeutig zu dem Schluss, dass das Konzept der Freistrahlkopplung mittels Laserdiode, der Lichteinkopplung mittels Glasfaser klar überlegen ist und deshalb für den Sensor angewendet wird.

5.2.2 Optisches Detektionssystem

Das Detektionssystem besteht im Wesentlichen aus zwei Komponenten, den optischen Filtern, die das Signal in die Spektralbereiche von CFP und YFP trennen und das Anregungslicht herausfiltern, sowie den Photodetektoren, die das einfallende Licht in ein messbares elektrisches Signal wandeln.

Filter

Mit zwei verschiedenen optischen Filter wird das Fluoreszenzsignal der Sensorproteine in seine Bestandteile von CFP und YFP getrennt und jeweils einzelnen Photodetektoren zugeführt. Dabei ist zu beachten, dass das Spektrum des CFPs in den Filterbereich des

YFP-Filters hineinragt und dort zu einem Fremdsignal führt, welches rechnerisch korrigiert wird, siehe Gleichung 5.1.
Im Aufbau des Demonstrators werden die Standardmikroskopfilter brightline HC 483/32 zur Detektion der CFP-Emission und brightline HC 542/27 für YFP verwendet. Die erste Zahl gibt die mittlere Wellenlänge des durch die zweite Zahl gekennzeichneten Wellenlängenbereichs in Nanometer an. Die Filter besitzen laut Datenblatt eine optische Dichte ≥ 6 im nicht transmittierenden Bereich und eine Transmission im Durchlassbereich ≥ 95%, siehe Abbildung 5.5.

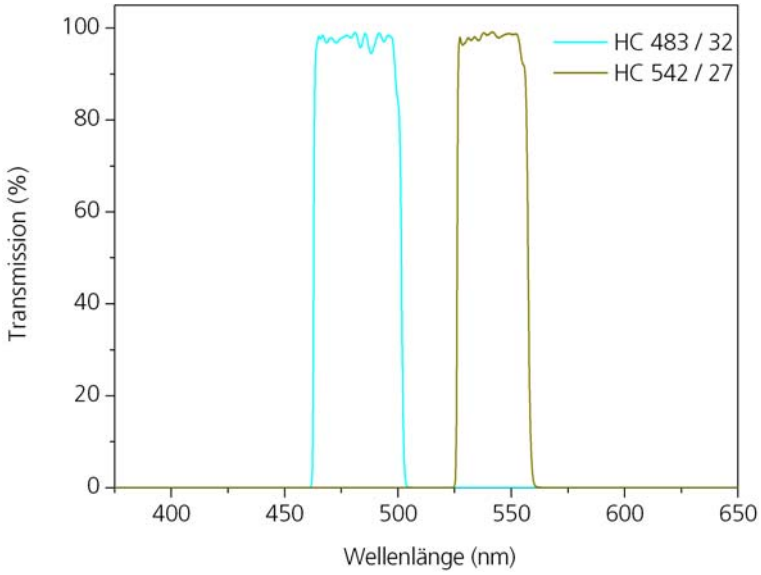


Abbildung 5.5: Vom Hersteller angegebene Transmissionsspektren der Filter HC 483/32 und HC 542/27

Die Filter werden von der Standardgröße von 25 mm Durchmesser und 2 mm Dicke auf die Größe von 5,5 mm x 3 mm x 2 mm mittels Wafersäge zugeschnitten, um in dieser verkleinerten Form entlang der Achse des Wellenleiters in einem Träger Platz zu finden. Nach dem passgenauen Zuschnitt werden die Filter in die dafür gefertigten und eloxierten Aluminiumträger eingeklebt. Hierfür wird der schwarze polyurethanbasierte Klebstoff DELO PUR 9691 verwendet. Wichtig beim Einkleben der Filter ist die Versiegelung der Schnittkanten mit dem lichtundurchlässigen Klebstoff, damit kein Licht ungefiltert auf die Photodetektoren fällt. Nach dem Einkleben werden die Filter einer optischen Kontrolle unterzogen und gegebenenfalls nachgearbeitet.
In Abbildung 5.6 sind die gefilterten Fluoreszenzspektren des Proteins gezeigt und werden mit dem ungefilterten Spektrum verglichen. Zur spektralen Vergleichbarkeit werden die Filterspektren entsprechend des ungefilterten Signals skaliert.
Man erkennt deutlich die Übereinstimmung der spektralen Anteile mit dem ungefilterten Signal im Durchlassbereich der Filterfenster. Das Anregungslicht im Bereich von 405 nm wird durch die Filter blockiert, das Fluoreszenzlicht hingegen passiert die Filter für CFP und YFP. Demzufolge beweist der optische Aufbau der Filter seine Funktion und wird in dieser Form umgesetzt.

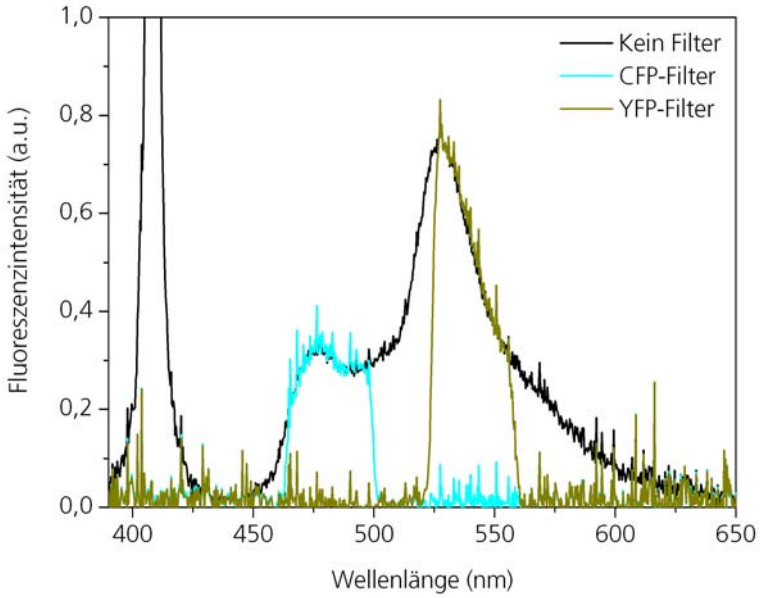


Abbildung 5.6: Das ungefilterte Fluoreszenzintensitätssignal von GBPfluo1 wird mit den entsprechend skalierten Signalen, die durch die CFP- und YFP-Filter gemessen werden, verglichen. Das Streulicht, das durch die Anregungslichtquelle im Bereich von 405 nm entsteht, wird von den Filtern blockiert.

Photodetektoren

Nach dem Durchgang des Fluoreszenzlichts durch die optischen Filter trifft das Fluoreszenzlicht auf die direkt hinter den Filtern angebrachten Photodetektoren. Sie wandeln das aufgefangene Licht in einen messbaren Photostrom um. Wichtig bei der Auswahl der Photodetektoren ist,

- dass das Maximum des Sensitivitätsbereichs möglichst im grünen Wellenlängenbereich liegt, entsprechend dem Emissionsbereich der Proteine,
- ein hoher generierter Photostrom im Messbereich, da dieser verstärkt und in eine Spannung gewandelt, die eigentliche Messgröße darstellt,
- ein niedriger Dunkelstrom, da der Dunkelstrom zu einem Hintergrundsignal führt,
- eine kleine Gehäusegröße, da sie eine wichtige Rolle bei der Integration in den Sensor spielt. Deshalb kommen ICs mit integriertem Verstärker nicht zum Zuge, da die Gehäuse zu groß sind.

Anhand dieser Eckdaten wurden zwei kommerziell erhältliche Photodetektoren für erste Tests ausgewählt. Bei den Detektoren handelt es sich um den Phototransistor Vishay TEMT 6000 und den Phototransistor Osram SFH 3204. Beide Photodetektoren weisen bei geringer Baugröße einen niedrigen Dunkelstrom auf und zeigen eine Photosensitivität in dem relevanten Wellenlängenbereich siehe Tabelle 5.7.

	Vishay TEMT 6000	**Osram SFH 3204**
Abmessungen (L x B x H)	4,0 mm x 2,0 mm x 1,1 mm	3,1 mm x 2,3 mm x 1,1 mm
Photostrom	50 µA bei einer Beleuchtung von 15 µW / cm^2	32 µA bei einer Beleuchtung von 100 µW / cm^2
Chipfläche	0,29 mm^2	0,04 mm^2
Maximale spektrale Empfindlichkeit	570 nm	920 nm
Dunkelstrom	3 nA	2 nA

Tabelle 5.7: Eckdaten zur Auswahl der Photodetektoren Vishay TEMT 6000 und Osram SFH 3204.

Von diesen beiden Phototransistoren wird der Photostrom unter Beleuchtung mit dem Fluoreszenzlicht des Proteins bei verschiedenen Versorgungsspannungen gemessen. Die Experimente werden jeweils mit und ohne optische Filter durchgeführt.

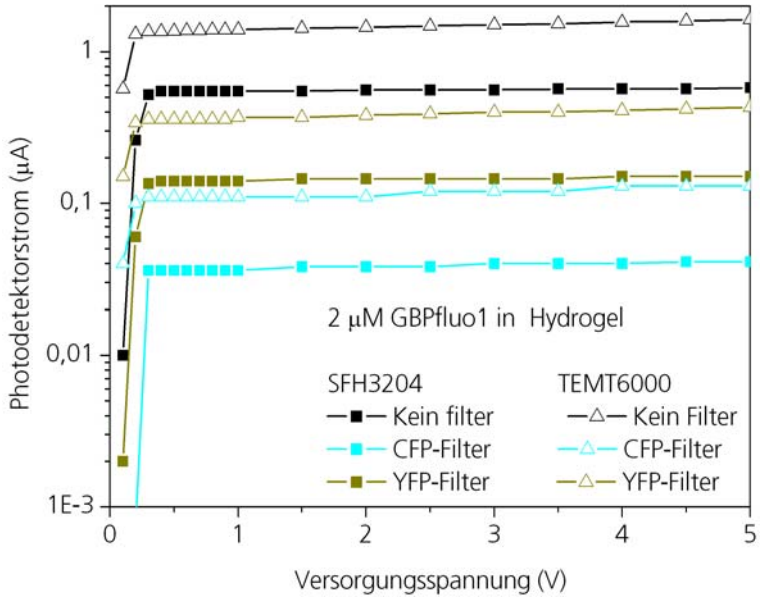


Abbildung 5.8: Dargestellt ist der Photostrom der Photodioden SFH3204 und TEMT6000 als Funktion der angelegten Spannung. Das Fluoreszenzsignal stammt aus einer mit Hydrogel und 2 µM GBPfluo1 gefüllten Küvette angeregt mit der 405 nm Laserdiode und einer Ausgangsleistung von 1,8 mW.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.8 dargestellt. Die Signale mit Filter sind niedriger als die ohne Filter. Das liegt daran, dass die Filter das Spektrum des Lichts, das auf die Detektoren fällt, beschränken und das Streulicht der Anregungslichtquelle herausfiltern. Der unverstärkt gemessene Photostrom des Phototransistors TEMT 6000 liegt in allen drei spektralen Messbereichen um den Faktor 3 über den zugehörigen Werten des SFH 3204 Phototransistors. Das entspricht den Angaben des Datenblatts unter Berücksichtigung der sensitiven Chipflächen und der unterschiedlichen Sensitivitätsbereiche.
Das Signalverhältnis zwischen CFP und YFP liegt bis auf einen Faktor 2 in der Größenordnung, das auch aus der Integration der Spektren in Abbildung 5.6

hervorgeht. Die Abweichung liegt ebenfalls in der unterschiedlichen Sensitivität der Spektralbereiche für CFP und YFP begründet. Die Sensitivität beider Detektoren im CFP-Bereich ist gegenüber der Sensitivität im YFP-Bereich um ca. 50% herabgesetzt [42], [43].
Anhand der gewonnen Daten wird aufgrund der höheren Signalwerte, die mit dem TEMT 6000 erzielt werden, dieser Phototransistor für den Sensor ausgewählt und eingebaut.

5.2.3 Gesamtaufbau des Demonstrators

Der gesamte Messaufbau besteht aus drei Hauptkomponenten: dem Demonstrator der Sensoreinheit, dem Perfusionssystem und der Steuerungseinheit mit der Datenerfassung.
Die Teile für den Aufbau des Demonstrators wurden aus Aluminium gefertigt und schwarz eloxiert, um die Reflexionen des Anregungslichts zu reduzieren. Der Aufbau besteht aus zwei identischen Hälften, die sowohl die Filter als auch die Photodetektoren tragen, mittig sitzt die transparente PMMA-Messzelle mit angeschlossener Lichtquelle. In Abbildung 5.9 (a) ist der geöffnete Demonstrator mit einer Detektionseinheit unter der Messzelle gezeigt. Der Demonstrator wird durch die Montage der zweiten Detektionseinheit geschlossen, dargestellt in Abbildung 5.9 (b).
Zur Messung wird die Messzelle mit Puffer gefüllt und anschließend der Wellenleiter eingeschoben. Abgeschlossen wird die Zelle mit dem Anbringen der Lichtquelle. Der fertiggestellte Demonstrator der Sensoreinheit weist, abgesehen von den Anschlussleitungen für Elektronik und Fluidik, eine Größe von 15 mm x 15 mm x 12 mm auf.

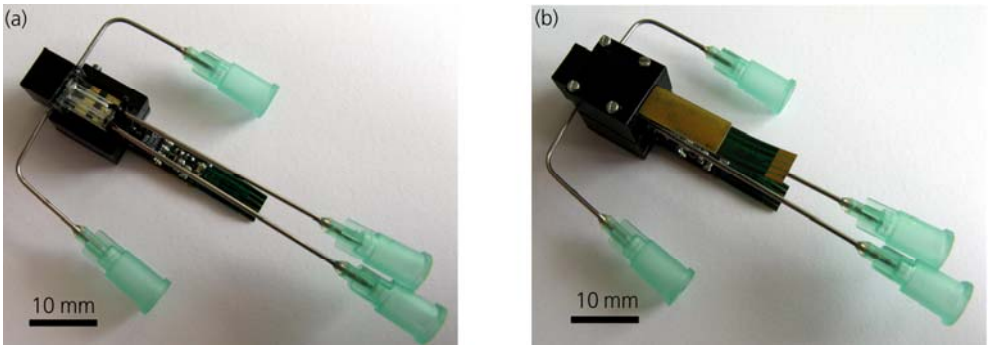


Abbildung 5.9: Aufbau des Demonstrators.
(a) Detektorplatine hinter den optischen Interferenzfiltern in mechanischem Träger und darauf platzierter Messzelle.
(b) Assemblierter Demonstrator in schwarz eloxiertem Aluminiumgehäuse ohne eingesetzte Lichtquelle.

Um die Charakterisierung des Sensors mit all seinen Komponenten durchzuführen, wird der Demonstrator mit dem Perfusionssystem verbunden und durch einen kontinuierlichen Lösungsaustausch das Antwortverhalten des Demonstrators gemessen. Der Gesamtaufbau zur Charakterisierung des Demonstrators ist in Abbildung 5.10 schematisch dargestellt.

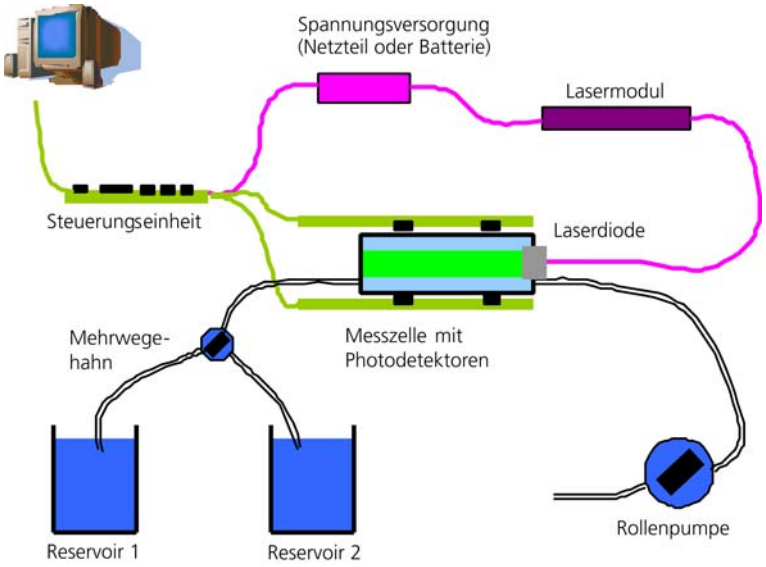


Abbildung 5.10: Schematischer Überblick aller für die Charakterisierung des Sensordemonstrators notwendigen Komponenten. Zur Detektion des Fluoreszenzlichts werden auf der Messzelle montierte Photodetektoren verwendet. Das Signal wird von einer Steuerungseinheit an den PC übertragen. Die Anregung erfolgt über eine Laserdiode mit Lasermodul. Das Perfusionssystem zum Lösungswechsel ist direkt an die Messzelle angeschlossen.

5.3 Charakterisierung

Zur Charakterisierung des Demonstrators werden Messungen von Stabilität, Sensitivität, Antwortzeit und Reproduzierbarkeit anhand der FRET-Antwort der Sensorproteine auf Kalzium durchgeführt.
Die Experimente zur Charakterisierung des Demonstrators unterscheiden sich dahingehend von den in Kapitel 4 beschriebenen Messungen, dass für sie nun der vollständige Demonstrator zur Messung des FRET-Zustandes herangezogen wird. D. h. es wird mit den eingebauten Photodetektoren der FRET-Zustand detektiert und nicht mit dem Spektrometer gearbeitet. Ebenfalls ändert sich die Darstellung des FRET-Verhältnisses. Es setzt sich aus den Spannungssignalen der Photodetektoren zusammen und wird wie in Gleichung 5.1 beschrieben gebildet. Unverändert bleiben der Hydrogelwellenleiter mit einer Sensorproteinkonzentration von 10 µM und das Perfusionssystem zum Austausch der Lösungen innerhalb der Messkammer.

5.3.1 Sensitivität

Die Sensitivität des Sensors wird unter drei Gesichtspunkten betrachtet. Einerseits unter dem Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis, zweitens unter dem Gesichtspunkt der Wiedergabe und Auflösung verschiedener Kalziumkonzentrationen und dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis.

Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis

Das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis ist definiert als das Detektorausgangssignal bei angeregtem Protein im hohen Energietransferzustand, geteilt durch das Detektorsignal erhalten bei einer Referenzmessung mit einem Hydrogelwellenleiter gleichen Hydrogeltyps ohne Protein. Gleiches gilt für den niedrigen Transferzustand. So wird bestimmt, wie hoch das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis ist. Insgesamt gilt, je höher das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis desto weniger schränkt das Hintergrundsignal den Messbereich des Sensors ein.

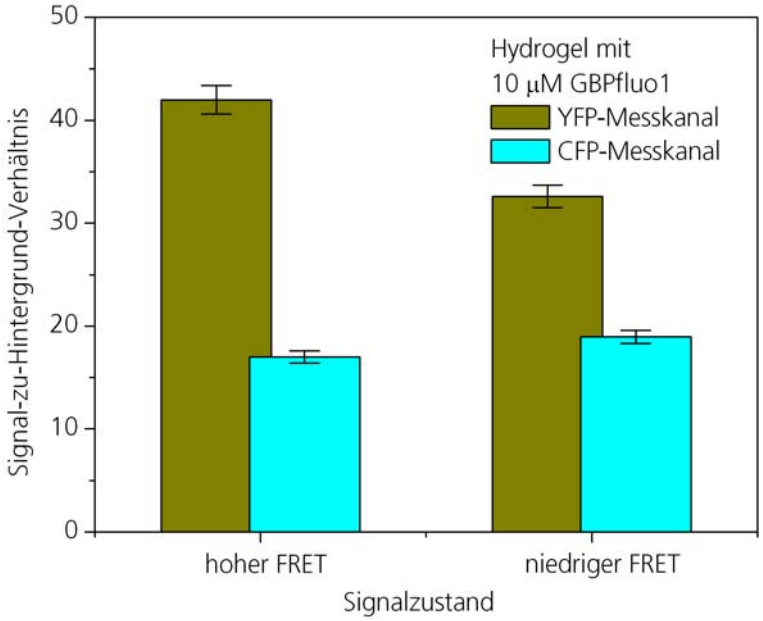


Abbildung 5.11: Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis des YFP- und CFP-Signals im hohen und niedrigen Energietransferzustand. Die minimalen und maximalen Verhältnisse treten im hohen Transferzustand auf. Sie betragen 17,0 ±0,6 auf dem CFP-Kanal und 42,0 ±1,5 auf dem YFP-Kanal.

In Abbildung 5.11 sind die Verhältnisse für die hohen und niedrigen Energietransferzustände der Messkanäle für CFP und YFP gezeigt. Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte und Standardabweichung von je 61 Messpunkten, gemessen in ca. 5 Minuten. Bei hohen YFP-Signalen in Anwesenheit von 5 mM Kalzium wird im Mittel mit Standardabweichung ein maximales Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis von 42,0 ±1,5 erreicht. Minimal wird das Verhältnis ebenfalls bei hohem Energietransferzustand auf dem CFP-Messkanal mit 17,0 ±0,6.
Da das Hintergrundsignal, resultierend aus dem Streulicht der Anregungslichtquelle, mehr als eine Größenordnung geringer ist als das Fluoreszenzsignal, wird das Sensorsignal durch das Hintergrundsignal nicht negativ beeinträchtigt.

Auflösung verschiedener Kalziumkonzentrationen

Die Messung und Unterscheidung verschiedener Kalziumkonzentrationen mit dem Sensordemonstrator stellt den grundlegenden Funktionsnachweis des Sensors dar.

Dafür werden die Kalziumkonzentrationen 0, 200, 500, 1000, 2000, 5000, und 10000 µM vermessen. Diese werden in die Messkammer eingespült und kontinuierlich getauscht. Jede Lösung ist für 15 Minuten in der Messkammer und wird dann durch die nächst höhere ersetzt. Es wird ein Hydrogelwellenleiter mit 0,76 mm Durchmesser und einer Proteinkonzentration von 10 µM eingesetzt. In Abbildung 5.12 ist die Messkurve des FRET-Signals dargestellt.
Die Messkurve setzt sich aus dem Verhältnis der Spannungssignale der Photodetektoren für CFP und YFP zusammen, dabei werden sowohl der Offset des Dunkelsignals als auch der Anteil des CFP-Signals im YFP-Signal nach Gleichung 5.1 berücksichtigt. Es werden alle 10 s Messwerte aufgenommen. Zur Verdeutlichung der Sensorantwort ist eine mit einem gleitenden Durchschnitt von 40 Punkten berechnete Glättkurve zusätzlich eingezeichnet. Bei jeder Erhöhung der Kalziumkonzentration bilden sich nach ca. 10 Minuten eine Stufe im Signal aus, in dieser Zeit stellt sich das chemische Gleichgewicht ein und das Signal des Sensors liefert so einen stabilen Wert.

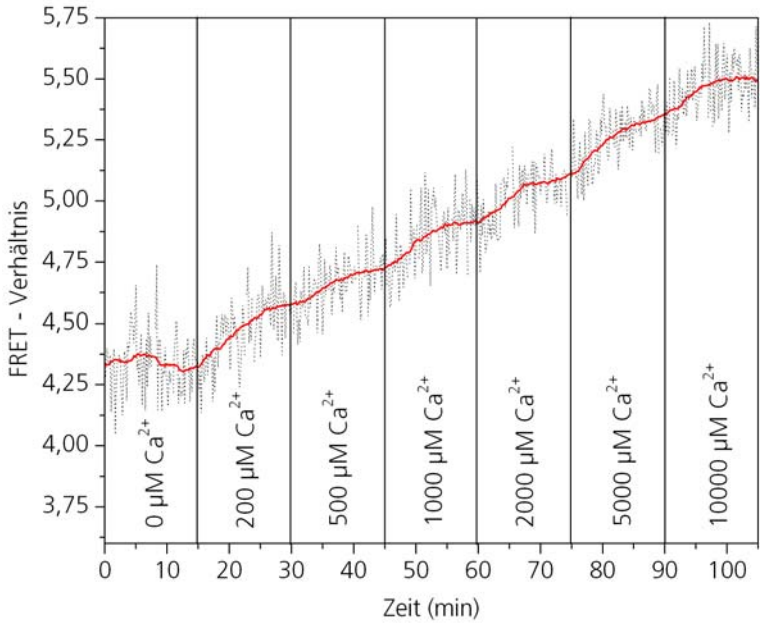


Abbildung 5.12: Dynamische Signalantwort des Sensors beim Wechsel verschiedener Kalziumkonzentrationen. Dargestellt sind das FRET-Verhältnis sowie eine Glättkurve. Der sprunghafte Anstieg der Kalziumkonzentration innerhalb der Messkammer führt zu einem exponentialförmigen Anstieg des FRET-Verhältnisses und anschließender Sättigung. Insgesamt ergibt sich so eine Stufenkurve.

Die zeitliche Änderung des Signals findet diffusionsbedingt näherungsweise exponentialförmig statt. Allerdings weist die Messkurve ein starkes Rauschen auf, das aus der Messelektronik resultiert.
In Abbildung 5.13 ist die Signalantwort der Stufenkurve so ausgewertet, dass die Messwerte 10 Minuten nach jedem Lösungswechsel für 5 Minuten gemittelt und die Standardabweichungen der Mittelwerte als Fehlerbalken eingetragen wurden. Man erkennt den Anstieg der jeweiligen Konzentrationen. Allerdings kommt es bei der Betrachtung der Fehlergrenzen zu Überlappungen der einzelnen Bereiche.

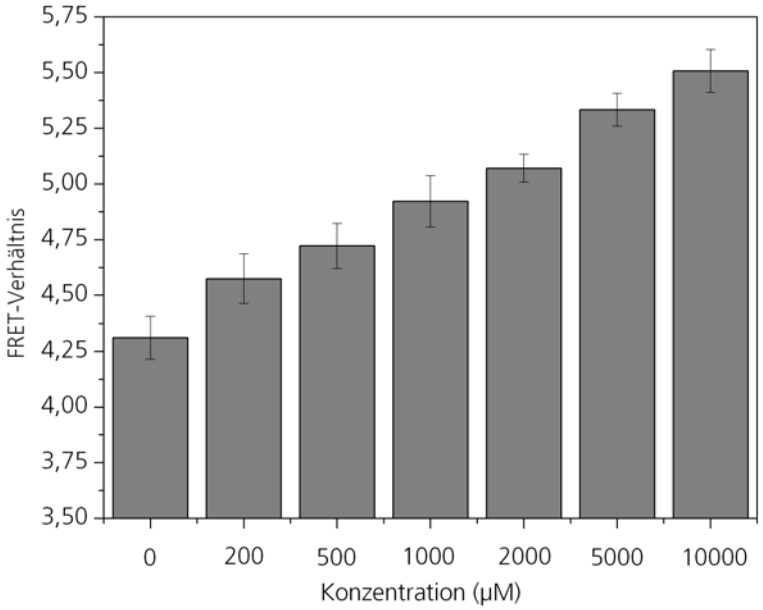


Abbildung 5.13: Gemitteltes FRET-Verhältnis bei verschiedenen Kalziumkonzentrationen.

Die Änderung des FRET-Verhältnisses ist über den Bereich von 0 - 10000 µM, wie in Abschnitt 4.2.2 bereits gezeigt, nicht konstant. Im Konzentrationsbereich von 0 - 1000 µM kann wie in Abbildung 5.14 durch die rote Näherungskurve ersichtlich, das FRET-Verhältnis in Abhängigkeit der Konzentration linear genähert.

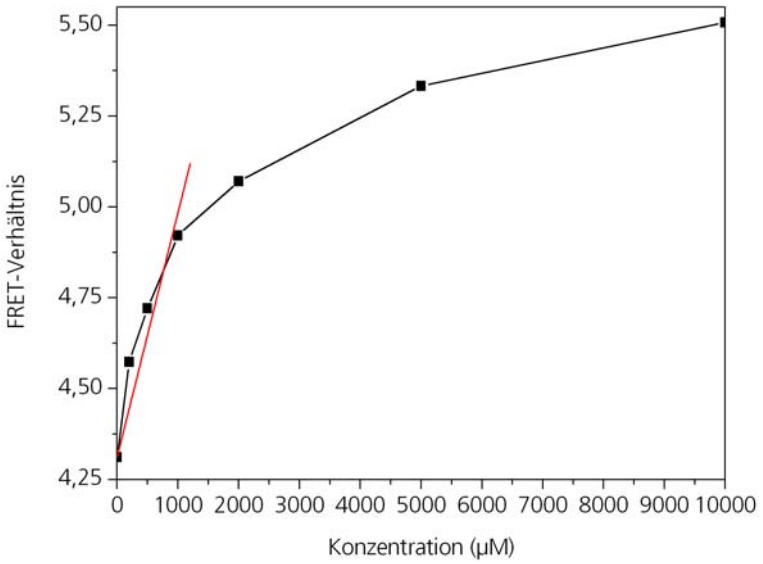


Abbildung 5.14: Lineare Näherung der Sensitivität des Demonstrators im Bereich von 0 – 1000 µM Ca^{2+}, dargestellt durch die rote lineare Fit-Kurve des FRET-Verhältnisses.

Hierfür wurde der gleiche Datensatz wie in Abbildung 5.13 zu Grunde gelegt. Die Steigung dieser Näherungskurve ist ein Maß für die Sensitivität des Sensors. Es ergibt

sich im Bereich von 0 - 1000 µM ein Wert für die Sensitivität S des Demonstrators von $S = (6{,}7 \pm 0{,}8) \times 10^{-4}$ / µM.

Auflösungsvermögen

Das Auflösungsvermögen gibt an, welche minimalen Konzentrationsänderungen im linearen Messbereich von 0 - 1000 µM mit dem Demonstrator unterschieden werden können. Es wird aus der Sensitivität und dem Rauschen bestimmt. Das Rauschen R des FRET-Verhältnisses wird im linearen Bereich durch das 2-fache der Standardabweichungen der Mittelwerte der FRET-Verhältnisse aus Abbildung 5.13 genähert. Die Standardabweichungen der gemittelten FRET-Verhältnisse werden mit dem Faktor 2 multipliziert, da dieser Wert dem Intervall Mittelwert ±Standardabweichung entspricht. Dies wird für die Konzentrationswerte 0, 200, 500 und 1000 µM durchgeführt. Diese Werte werden dann zur Bestimmung des mittleren Rauschens R_{Mittel} aufsummiert, gemittelt und die zugehörige Standardabweichung angeben. Dieses Vorgehen ist möglich, da sich die Standardabweichungen der FRET-Verhältnisse in diesem Bereich nur geringfügig unterscheiden und damit das Rauschen hier als konstant genähert werden kann.
Eine Signaländerung, hervorgerufen durch eine Konzentrationsänderung Δc, ist dann vom mittleren Rauschen R_{Mittel} zu unterscheiden, wenn sie größer als das mittlere Rauschen ist. Es gilt:

$$S \cdot \Delta c > R_{Mittel} \qquad \textbf{5.2}$$

wobei S für die Sensitivität steht. Diese Abschätzung liefert, bei einem mittleren Rauschen R_{Mittel} von 0,212 ±0,018 und der Sensitivität von $(6{,}7 \pm 0{,}8) \times 10^{-4}$ / µM, ein minimales Δc von (316 ±28) µM. Demzufolge können Konzentrationsänderungen von (316 ±28) µM durch eine Signaländerung gegenüber dem Signalrauschen unterschieden werden.

Signal zu Rausch-Verhältnis

Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis wird aus obigen Messdaten, siehe Abbildung 5.13, gewonnen. Dazu wird das mittlere FRET-Signal bei den gemessenen Konzentrationen im Gleichgewicht ins Verhältnis gesetzt mit dem 2-fachen der Standardabweichung des gemittelten FRET-Signals, dieser Wert entspricht dem Rauschen R, siehe Gleichung 5.3.

$$SRV = FRET_{Mittel} / R \qquad \textbf{5.3}$$

Die Verhältnisbildung wird für den Konzentrationsbereich von 0 µM – 1000 µM durchgeführt, die Daten gemittelt und die Standardabweichung angegeben. Die Berechnungen ergeben ein hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis SRV von 21,9 ±1,2.

5.3.2 Antwortzeit

Die Antwortzeit, die benötigt wird, bis sich das Signal einer Änderung der Analytkonzentration anpasst, hängt von der Diffusion von Kalzium in den Hydrogelwellenleiter hinein und aus diesem heraus ab.
Zur Bestimmung der Diffusionszeiten für Kalzium werden die Sensorproteine zyklisch einer hohen, 5000 µM, und niedrigen, 0 µM bzw. 100µM, Kalziumkonzentration ausgesetzt. Es ergeben sich exponentielle Antwortfunktionen des FRET-Verhältnisses aus denen entsprechend die Anstiegs- und Abfallszeiten des FRET-Signals ermittelt werden.
In Abbildung 5.15 ist beispielhaft die Signalantwort eines Zyklus dargestellt. Das FRET-Verhältnis, gemessen mit den Photodetektoren, steigt bei der Zugabe von 5 mM Ca^{2+} an, dabei liegt die Kalziumlösung mit 5 mM Ca^{2+} für 15 min vor. Beim Umschalten der Lösung auf 0 mM Ca^{2+} für 30 Minuten geht das Signal wieder zurück.
Die Mittelung von 14 Zyklen liefert eine mittlere Anstiegszeit von (2,1 ±0,36) min und eine Abfallszeit von (7,33 ±1,44) min. Der Unterschied der Antwortzeiten könnte dadurch begründet werden, dass die Öffnung des Proteins nicht instantan mit dem Entbinden von Kalzium erfolgt und sich deshalb die Abfallszeit des Signals verlängert.

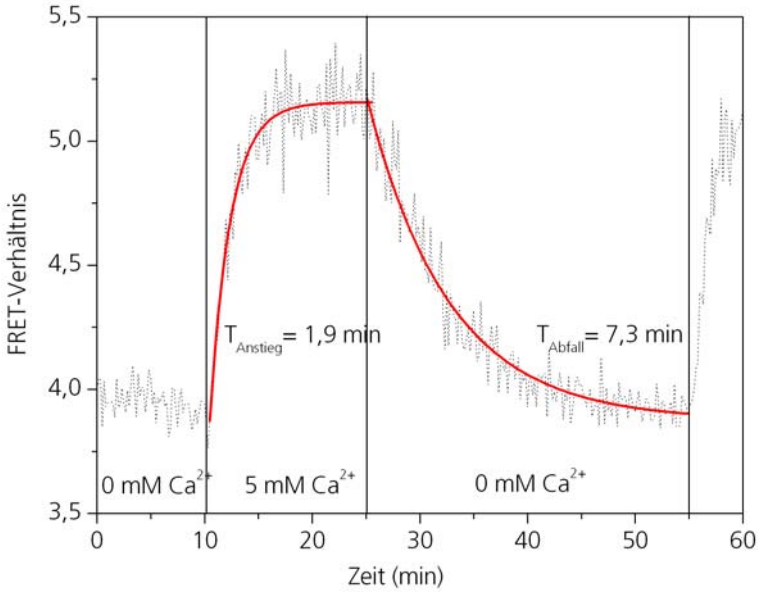


Abbildung 5.15: Abschätzung der Antwortzeit bei steigendem FRET durch die Zugabe von 5 mM Ca^{2+} und bei sinkendem FRET durch die Anwesenheit von 0 mM Ca^{2+}. Mittels exponentieller Fitkurven des Anstiegs und Abfalls des FRET-Verhältnisses mit der Zeit werden die Antwortzeiten bestimmt.

5.3.3 Reproduzierbarkeit

Um eine Aussage über die Reproduzierbarkeit der Signale zu treffen, wird getestet, ob sich die Signalniveaus der FRET-Verhältnisse bei zyklischen Messungen in einem Toleranzbereich von wenigen Prozent wiederholt einstellen.

Dazu werden die Lösungen mit 5000 µM Ca^{2+} und 100 µM Ca^{2+} zyklisch getauscht. Die 5 mM konzentrierte Kalziumlösung durchströmt für 20 Minuten die Anordnung, während die Lösung mit 100 µM Kalzium für 40 Minuten benutzt wird, um das Niveau mit geringem FRET-Verhältnis einzustellen. In Abbildung 5.16 ist das FRET-Verhältnis der Messung gezeigt, die alle 10 s durchgeführt wird. Die Signale steigen in Anwesenheit der hohen Kalziumkonzentration an und nehmen bei niedriger Konzentration ab. Die rote Linie ist ein gleitender Durchschnitt gebildet aus 35 Punkten der Messung. Die Glättung wird durchgeführt, um das Rauschen der Detektoren und der Anregungslichtquelle zu glätten. Die grauen Bereiche geben eine Breite von ±2% des Anfangssignals an. Im hohen FRET-Zustand liegt das FRET-Verhältnis bei 4,25 und im niedrigen bei 3,74. Die Durchschnittskurve in den Plateaus liegt innerhalb dieses Toleranzbereichs und in jedem der vier Zyklen stellen sich dementsprechend gleiche Werte ein.

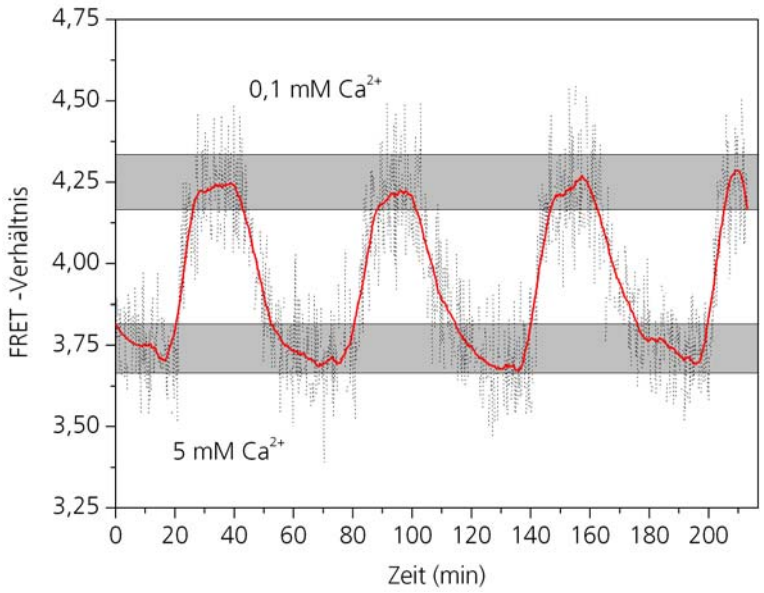


Abbildung 5.16: Reproduzierbarkeit der FRET-Signalniveaus des Hydrogelwellenleitersensors. Das FRET-Signal von GBPfluo1 im Hydrogelwellenleiter wird zyklisch durchfahren, durch den Austausch der Lösungen mit 100 µM Ca^{2+} und 5000 µM Ca^{2+} in der Messzelle. Es stellen sich mit einer Abweichung von ±2%, dargestellt durch die grauen Bänder, gleiche Signalniveaus des FRET-Verhältnisses ein. Zur Verdeutlichung der Messkurve ist zusätzlich eine Glättkurve des FRET-Verhältnisses eingezeichnet.

5.4 Theoretische Betrachtung

Die zeitliche Entwicklung des Sensorsignals wird in diesem Abschnitt theoretisch hergeleitet und mathematisch beschrieben. Das Modell wird dann mit gemessenen Daten in Korrelation gesetzt.

5.4.1 Separation der Diffusionsgleichung

Die Grundlage der zeitlichen Sensorsignalentwicklung basiert auf der Ein- und Ausdiffusion des Analyten Kalzium in den Hydrogelwellenleiter. Die chemische Reaktionszeit des Analyten mit den Sensorproteinen wird zur Vereinfachung als instantan angenommen. Dies ist ohne Einschränkung möglich, wenn die Reaktionszeit deutlich geringer als die Diffusionszeit ist. Aufgrund dieser Annahme ist der Diffusionsvorgang maßgeblich für die zeitliche Sensorsignalentwicklung und wird am Beispiel der Ausdiffusion aus dem Hydrogelwellenleiter berechnet. Weiter wird angenommen, dass sich die diffundierenden Teilchen nicht gegenseitig behindern, dies ist in ideal verdünnten Lösungen der Fall [44].
Unter diesen Annahmen wird die stattfindende Diffusion durch das zweite Fick'sche Gesetz beschrieben [45]. Es gilt für die Konzentration c des Analyten Kalzium bei konstantem Diffusionskoeffizienten D:

$$\frac{\partial c(r,t)}{\partial t} = \nabla \cdot (D \nabla c) = D \cdot \Delta c \qquad \textbf{5.4}$$

Unter Berücksichtigung der Zylindergeometrie des Hydrogelwellenleiters wird aus der allgemeinen Diffusionsgleichung 5.4 mit dem Laplace-Operator in Zylinderkoordinaten:

$$\frac{\partial c(r,t)}{\partial t} = D \cdot \left(\frac{1}{r} \frac{\partial c}{\partial r} \left(r \frac{\partial c}{\partial r} \right) + \left(\frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 c}{\partial \varphi^2} \right) + \left(\frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right) \right) \qquad \textbf{5.5}$$

Da die Diffusion aus Symmetriegründen unabhängig von der z- und φ-Komponente ist, vereinfacht sich Gleichung 5.5 mit:

$$\frac{\partial^2 c}{\partial \varphi^2} = 0 \qquad \textbf{5.6}$$

$$\frac{\partial^2 c}{\partial z^2} = 0 \qquad \textbf{5.7}$$

zu:

$$\frac{\partial c(r,t)}{\partial t} = D \cdot \left(\frac{1}{r} \frac{\partial c}{\partial r} \left(r \frac{\partial c}{\partial r} \right) \right) \qquad \textbf{5.8}$$

Die resultierende Diffusionsgleichung 5.8 wird mit dem Produktansatz nach Bernoulli

$$c(r,t) = R(r)T(t) \qquad \textbf{5.9}$$

separiert:

$$\frac{d^2R}{dr^2}+\frac{1}{r}\frac{dR}{dr}+k^2=0 \qquad \textbf{5.10}$$

$$\frac{dT}{dt}=-\frac{1}{\tau_D}T \quad mit \quad \tau_D=\frac{1}{Dk^2} \qquad \textbf{5.11}$$

Es ergibt sich daraus für die Konzentration c(r,t), die an der Stelle r = 0 endliche Werte und für t -> ∞ den Wert 0 annimmt, bei einer konstanten Konzentration außerhalb des Hydrogelwellenleiters von 0 µM Ca^{2+} die spezielle Lösung:

$$c(r,t)=AJ_0(kr)\cdot e^{-t/\tau_D} \qquad \textbf{5.12}$$

wobei J_0 für die Besselfunktion 1.Art, 0.Ordnung steht und A und k die Integrations- und Separationskonstante darstellen. Mittels der Randbedingung

$$c(R,0)=0 \qquad \textbf{5.13}$$

am Rand des Wellenleiters R ergibt sich der allgemeine Lösungsansatz:

$$c(r,t)=\sum_{n=1}^{\infty}A_nJ_0(j_{0n}\frac{r}{R})\cdot e^{-t/\tau_{Dn}}, \quad mit\ k=\frac{j_{0n}}{R}\ und\ n=1,2,... \qquad \textbf{5.14}$$

j_{0n} steht für die n. Nullstelle der Besselfunktion J_0. Die Konstanten A_n können mit Hilfe der Anfangsbedingung

$$c(r,0)=C_0 \qquad \textbf{5.15}$$

unter zu Hilfenahme der Fourier-Besselentwicklung bestimmt werden, siehe Anhang A.1. Es ergibt sich damit letztlich für die Konzentration innerhalb des Wellenleiters:

$$c(r,t)=2C_0\sum_{n=1}^{\infty}\frac{J_0(j_{0n}\,r/R)}{j_{0n}J_1(j_{0n})}\cdot e^{-t/\tau_{Dn}} \qquad \textbf{5.16}$$

Aus der Gleichung 5.16 läßt sich bereits die Konzentrationsentwicklung innerhalb des Wellenleiters ablesen. Sie setzt sich zusammen aus der Summe eines Produkts der Verteilungsfunktionen der Konzentration, abhängig von dem Radius r, und Exponentialfunktionen die nur von der Zeit t abhängen.
Diese Funktion wird nun weiter verwendet zur Ermittlung der spektralen Verhältnisse innerhalb des Wellenleiters und dem sich daraus ergebenden FRET-Verhältnis.

5.4.2 Massenwirkungsgesetz

Das Sensorsignal setzt sich aus der Überlagerung der sich im Hydrogelwellenleiter einstellenden Proteinspektren zusammen. Es können zwei Zustände des Proteins unterschieden werden. Entweder das Protein P hat Kalzium c gebunden und zeigt hohen Energietransfer oder das Protein hat kein Kalzium gebunden und zeigt niedrigen Energietransfer. Dieser sich einstellende Zustand der chemischen Reaktion, siehe Gleichung 4.4, hängt über das Massenwirkungsgesetzt verknüpft von der Konzentration des gebunden Proteinkomplexes [cP] wie folgt ab:

$$K_D = \frac{\left(\left[c_g\right] - \left[cP\right]\right)\left(\left[P_g\right] - \left[cP\right]\right)}{\left[cP\right]} \qquad \textbf{5.17}$$

wobei $[c_g]$, $[P_g]$ für die entsprechenden Gesamtkonzentrationen und K_D für die Dissoziationskonstante stehen. Die Differenzen im Zähler stellen die freien Konzentrationen des Analyten und des Proteins dar. Findet näherungsweise keine Reduktion der Gesamtkonzentrationen durch die Komplexbildung statt, dies gilt im Bereich kleiner Kalziumkonzentrationen unter 1 mM vergleiche 4.2.3, vereinfacht sich Gleichung 5.17 zu:

$$K_D = \frac{\left[c_g\right]\left[P_g\right]}{\left[cP\right]} \qquad \textbf{5.18}$$

Aus Gleichung 5.18 ergibt sich für die Konzentrationen des Proteinkomplexes mit gebundenem Kalzium [cP]:

$$\left[cP\right] = \frac{\left[c_g\right]\left[P_g\right]}{K_D} \qquad \textbf{5.19}$$

Innerhalb des Wellenleiters werden nun die Spektren der Proteine in gebundenem Zustand $S_{gebunden}$ und ungebundenem Zustand $S_{ungebunden}$ zu einem Gesamtspektrum $FRET_{Spektrum}$ überlagert. Es gilt:

$$FRET_{Spektrum} = \int_V \left(S_{gebunden} \cdot \left[cP\right] + S_{ungebunden} \cdot \left(\left[P_g\right] - \left[cP\right]\right)\right) dV \qquad \textbf{5.20}$$

Die Konzentration des Proteinkomplexes [cP] setzt sich nach Gleichung 5.19 aus der konstanten Proteinkonzentration, der konstanten Dissoziationskonstanten K_D und der Gesamtkonzentration des Analyten $[c_g]$ zusammen. Ebenso entspricht diese Konzentration $[c_g]$ dem sich durch Eindiffusion des Analyten einstellenden Konzentrationsprofil c(r,t) im Hydrogelwellenleiter, berechnet in Gleichung 5.16. Die Volumenintegration der Gleichung 5.16 liefert:

$$\int_V c(r,t)dV = 4\pi dC_0 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{R^2}{j_{0n}^{\ 2}} \cdot e^{-t/\tau_{Dn}} \qquad \textbf{5.21}$$

wobei l die Länge und R den Durchmesser des Wellenleiters beschreiben. Aufgrund des Quadrats der Nullstellen der Besselfunktion ist der zweite Summand der Reihe bereits um den Faktor 5,6 kleiner als der Erste. Deshalb wird die Summe zur weiteren Betrachtung nach dem ersten Summand abgebrochen. D.h. die zeitliche Abhängigkeit der Funktion c(r,t) kann durch eine dominierende Exponentialfunktion genähert geschrieben werden. Abschließend folgt daraus:

$$\int_V c_g dV = \int_V c(r,t)dV = \widetilde{C} \cdot e^{-t/\tau_{D1}} \qquad \textbf{5.22}$$

und für das FRET-Spektrum unter Berücksichtigung der Gleichung 5.19, 5.20 und 5.22 sowie dem Zusammenfassen aller Konstanten zu den Konstanten A und B:

$$FRET_{Spektrum} = A + B \cdot e^{-t/\tau_{D1}} \qquad \textbf{5.23}$$

Die zeitliche Entwicklung des FRET-Spektrums ist nach Gleichung 5.23 also exponentialförmig.

5.4.3 FRET-Verhältnis und Sensorsignal

Zur Bestimmung des FRET-Verhältnisses, das von dem Sensor detektiert wird, wird das FRET-Spektrum über die Transmissionswellenlängenbereiche der Filter für CFP und YFP integriert und ins Verhältnis gesetzt.

$$FRET_{Verhältnis} = \frac{\int_{YFP} FRET_{Spektrum}}{\int_{CFP} FRET_{Spekrum}} \qquad \textbf{5.24}$$

Unter Verwendung von Gleichung 5.23 ergibt sich aus der Gleichung 5.24 für das FRET-Verhältnis am Beispiel der Ausdiffusion von Kalzium:

$$FRET_{Verhältnis} = \frac{YFP_0 + \Delta YFP e^{-t/\tau_D}}{CFP_{\max} - \Delta CFP e^{-t/\tau_D}} \qquad \textbf{5.25}$$

dabei stellen YFP_0 und CFP_{max} die Endzustände des FRET-Proteins bei niedrigem FRET dar und ΔYFP und ΔCFP die Signalamplituden in integralen Anteilen des $FRET_{Spektrums}$. Sie bilden direkt die vom Sensor gemessenen Werte, unter Berücksichtigung der spektralen Sensitivität der verwendeten Detektoren und der durchzuführenden Signalkorrektur,

siehe Gleichung 5.1, ab. Anhand dieses Models werden daher die gemessenen und vom Modell berechneten Signalverläufe verglichen.
Beispielhaft wird dafür der Datensatz aus Abbildung 5.15 herangezogen. Es werden aus den Einzelsignalen CFP und YFP in ihrer korrigierten Form, die benötigten Werte, YFP_0 und CFP_{max} sowie ΔYFP und ΔCFP, entnommen und als Diffusionszeit τ_D wird die in Abschnitt 5.3.2 ermittelte mittlere Antwortzeit von 7,33 min verwendet. Das Ergebnis der Modellkurven ist in Abbildung 5.17 (a) gezeigt.
Diese Kurven werden dann in Abbildung 5.17 (b) mit den Messkurven überlagert. Hier zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung von Modell und Experiment. Die kleinen Abweichungen sind auf die durchgeführten Vereinfachungen zurückzuführen.

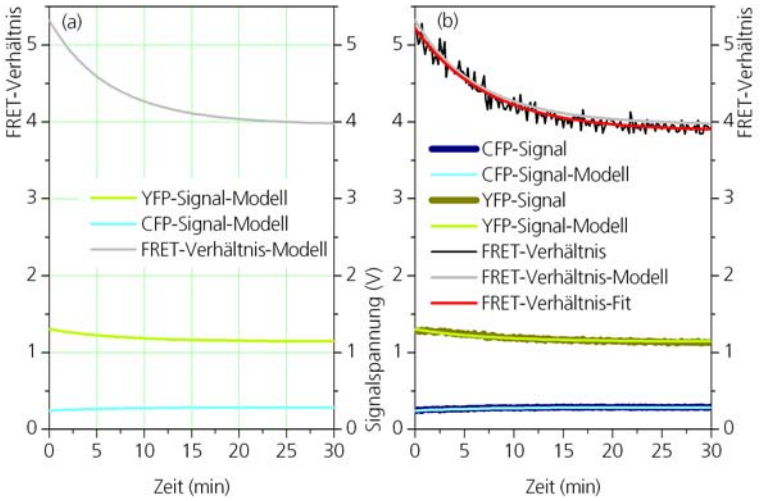


Abbildung 5.17: FRET-Signalvergleich von Experiment und Modell. Der zeitliche Verlauf der durch das Modell beschrieben Kurven des CFP- und YFP-Signals sowie des FRET-Verhältnisses stimmt sehr gut mit dem Signalverlauf im Experiment überein. Ebenso zeigt die Fit-Kurve des FRET-Verhältnisses eine gute Übereinstimmung mit dem Modell.

Bei kleinen ΔCFP-Werten, $\Delta CFP << 1$, ist es möglich das FRET-Verhältnis weiter zu vereinfachen, es folgt dann:

$$FRET_{Verhältnis} = FRET_{\max} - \Delta FRET e^{-t/\tau_D} \qquad \textbf{5.26}$$

Diese Funktion entspricht der Fitfunktion wie sie in Abschnitt 5.3.2 zur Bestimmung der Antwortzeit im Falle der Ausdiffusion von Kalzium verwendet wurde. Die hier dementsprechend rot dargestellte exponentielle Fitkurve besitzt eine Zeitkonstante τ_D von (7,28 ±0,33) min und gibt so ebenfalls gut das Zeitverhalten der Sensorantwort wieder und kann zur Abschätzung der Antwortzeit herangezogen werden.

6 Implantat

Das bisher vorgestellte und realisierte Konzept eines Biosensors wird in den nächsten Schritten zu einem vollständigen, autarken Implantat weiterentwickelt. Die Herausforderungen liegen in der Integration und dem Design aller Komponenten des gesamten Sensorsystems. Besondere Bedeutung kommt jetzt den verwendeten Materialen zu, da sie biokompatibel sein müssen, um implantiert werden zu können. Nach der Materialauswahl und dem Aufbau werden die in vitro Tests des Systems beschrieben.

6.1 Materialauswahl

Auf der Basis einer Vorauswahl an grundsätzlich implantierbaren Materialen, bestehend aus Titan [46], PEEK, Silikon, dem synthetischen sowie dem Alginathydrogel [47], werden die Materialien für das Implantat selektiert. Die Materialien werden verwendet zum Aufbau des Implantats und dessen Verkapselung sowie als Membran und Wellenleitermaterial.
Zur Untersuchung der Biokompatibilität werden Implantierversuche der vorausgewählten Materialien am MEIR Hospital Kfar Sava Israel durchgeführt und ausgewertet. Als Versuchtiere werden Sprague-Dawley Ratten verwendet und die 4 – 5 mm großen Proben subkutan im Rückenbereich der Tiere implantiert.
Hier werden die Ergebnisse der histologischen Befunde dieser Experimente zur Materialauswahl nach einer Implantation von einem Monat unter den Gesichtspunkten der Ausbildung einer Entzündungsreaktion, einer fibrösen Kapsel und der Adhäsion und Degeneration der Implantate dargestellt. Die Materialien, die in den Implantationsversuchen eine möglichst geringe Entzündung, Adhäsion sowie Verkapselung hervorrufen und durch die Implantation nicht degenerieren, kommen für das Implantat in Betracht. Die Beschreibung der Implantationsprozedur ist in Anhang A.4 zu finden.

6.1.1 Hydrogele

Die Hydrogele sind die wichtigsten Sensorkomponenten. Sie werden als Membran zur Filterung der interstitiellen Flüssigkeit in der Hülle des Implantats und als sensitiver Hydrogelwellenleiter verwendet. Deshalb sind diese Implantierversuche von besonderer Bedeutung.

Synthetische Hydrogele
Die Implantation der synthetischen Hydrogele unter die Haut der Versuchtiere ruft nach 35 Tagen eine geringe Entzündungsreaktion, sichtbar durch eine unebenmäßige Rötung des Gewebes um die Implantate, hervor. Eine dünne fibröse Kapsel bildet sich um die Hydrogelimplantate mit einer Dicke von 0,1 - 0,6 mm, siehe Implantation in Abbildung 6.1 (a) und histologischer Schnitt in Abbildung 6.1 (b). Nach der Explantation weisen die Hydrogele keine Adhäsion von Gewebe oder strukturelle Beschädigungen

auf und können einfach entnommen werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine gute Biokompatibilität und Eignung der Materialien als Membran und Wellenleiterkern hin.

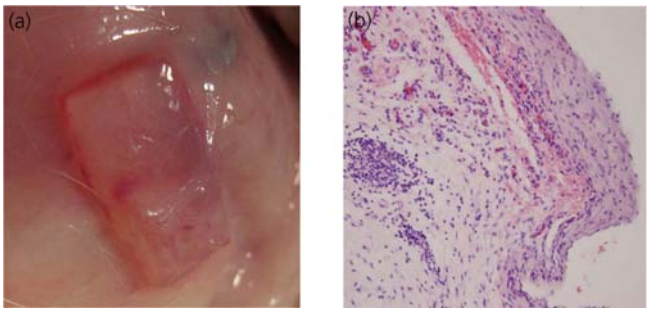


Abbildung 6.1: (a) Subkutan implantierte synthetische Hydrogele nach 35 Tagen. Das angrenzende Gewebe zeigt eine leichte Rötung, hervorgerufen durch eine leichte Entzündungsreaktion.
(b) Histologischer Schnitt der Kapsel um das synthetische Gel. Die fibröse Kapsel besitzt eine Dicke von 0,1 - 0,6 mm.

Alginatgel

Nach 35-tägiger Implantation der Alginatproben tritt eine minimale Entzündungsreaktion auf, sichtbar in Abbildung 6.2 (a) durch die Rötung des angrenzenden Gewebes. Des Weiteren bildet sich eine fibröse Kapsel mit einer Dicke von 0,1 - 0,2 mm, siehe Abbildung 6.2 (b).
Allerdings können die weichen Hydrogele nur schwer aus den Kapseln heraus getrennt werden und es kommt zu einer strukturellen Degradation des Materials nach einem Monat. Trotz der guten Biokompatibilität des Materials, ist es aufgrund seiner Fragilität und Degradation nicht als Membranmaterial geeignet.

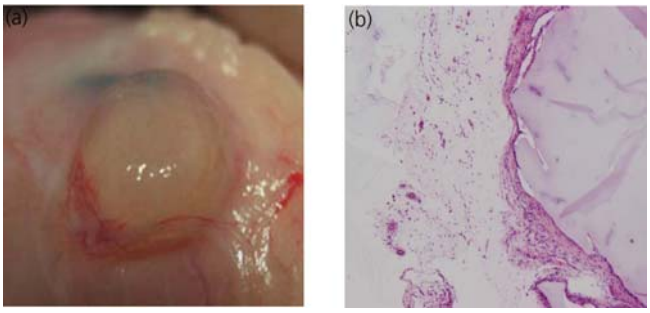


Abbildung 6.2: (a) Es ist eine minimale unbedenkliche Entzündungsreaktion des das Alginatimplantat umgebenden Gewebes zu erkennen.
(b) Eine dünne fibröse Kapsel von 0,1 - 0,2 mm Dicke umrandet das Alginatgel nach 35 Tagen Implantation.

6.1.2 Silikon und PEEK

Als Hüllmaterial werden in den Implantierversuchen die zwei medizinischen Silikone Nusil MED 6215 und Nusil MED 6210 sowie PEEK getestet. Es entwickelt sich eine sehr

dünne fibrotische Kapsel um die Implantate. Die Entzündung fällt gering aus und die Implantate lassen sich leicht und unbeschädigt wieder entnehmen. Die Entzündungsreaktion ist bei dem Silikon Nusil MED 6215 etwas schwächer ausgeprägt als bei dem Silikon Nusil MED 6210. Deshalb ist das Silikon Nusil MED 6215 für die Verkapselung und Implantation dem Silikon Nusil MED 6210 vorzuziehen.

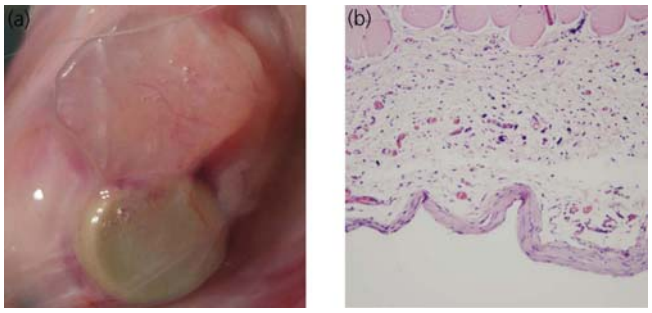


Abbildung 6.3: (a) Unter die Haut implantiertes PEEK und Silikon MED 6215 nach 35 Tagen. Kaum sichtbar ist eine leichte Entzündungsreaktion. Die implantierten Materialien werden von einer sehr dünnen fibrösen Kapsel umgeben.
(b) Histologischer Schnitt. Das Gewebe um das Silikonimplantat zeigt eine sehr dünne fibröse Kapsel.

PEEK ruft eine etwas dickere Kapselbildung als das Silikon hervor, aber keine Adhäsion des Gewebes, nur eine geringe Rötung und zeigt in dieser Weise eine gute Biokompatibilität, siehe Abbildung 6.3 (a). Die implantierten Silikon- und PEEK-Proben weisen vergleichbar gute histologische Befunde auf, siehe Abbildung 6.3 (b).

6.1.3 Fazit der Implantationsversuche der Materialien

Die Untersuchungen ergeben insgesamt eine gute Biokompatibilität der ausgewählten Materialien. Die synthetischen Hydrogele kommen sowohl als Hydrogelwellenleitermaterial als auch als Membranmaterial in Betracht. Das Alginatgel ist das biokompatibelste Material, kann allerdings aufgrund seiner strukturellen Degradation im Gewebe nicht eingesetzt werden. Unter den Silikonmaterialien wird das Silikon Nusil MED 6215 gegenüber dem Silikon Nusil MED 6210 wegen der besseren Ergebnisse bevorzugt. PEEK ruft eine etwas dickere fibröse Verkapselung als Silikon hervor, es wird aber keine Adhäsion und eine nur schwache Rötung des Gewebes festegestellt und ist so als Implantatmaterial geeignet.

6.2 Konstruktion und Aufbau

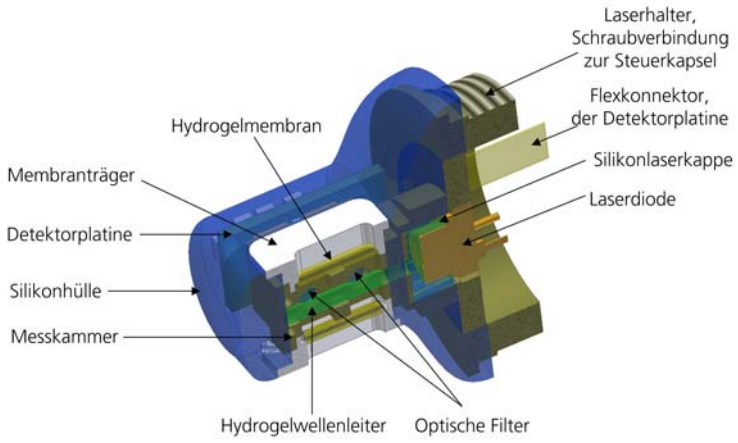
Zur Realisierung des Implantats wird die optische Messzelle des Demonstrators, sprich der Transducer, einem Redesign unterzogen um die Sensoreinheit zu miniaturisieren. Neben der Miniaturisierung kommt auch der Integration aller Komponenten jetzt eine wichtige Rolle zu. Insbesondere muss ein Assemblierungskonzept unter Berücksichtigung einer vollständigen Sterilisation des Implantats mit in die Konstruktion einfließen. Außerdem wird der bisherige Prototyp um eine Membran erweitert, um den

Austausch der Körperflüssigkeit mit dem Sensor zu ermöglichen. Im Anschluss an den Aufbau finden erneut Implantierversuche statt, um die Biokompatibilität der Außenhülle des Implantats und der Membraneinheit in ihrer Größe, Form und Materialkombination zu überprüfen.

6.2.1 Optischer Transducer

Die Konzepte und Entwicklungen beim Aufbau des Sensordemonstrators werden zur Realisierung des Implantats verwendet und ergänzt. Sie beinhalten:

- die Verwendung des Hydrogelwellenleiters mit immobilisierten Sensorproteinen als Basis des Sensors,
- die Lichteinkopplung per Freistrahlkopplung durch die Laserdiode direkt vor dem Hydrogelwellenleiter mit integrierter Silikonschutzhaube,
- die Positionierung des optischen Systems, bestehend aus CFP- und YFP-Filtern und zugehörigen Photodetektoren Vishay TEMT 6000, entlang des Wellenleiters, senkrecht zum Anregungslicht,
- die Miniaturisierung der Messkammer,
- die Erweiterung des Sensors um eine Membran, um den Austausch der Körperflüssigkeit mit dem Sensor zu ermöglichen. Es wird kein Perfusionssystem mehr verwendet,
- die Materialien zur Herstellung des Implantats: verwendet werden Titan bzw. PEEK, Silikon und Hydrogel.



CAD-Zeichnung 6.4: Querschnitt der mit einer Silikonhülle verkapselten Transducer-Einheit, bestehend aus einer Messkammer mit eingesetztem Hydrogelwellenleiter, integrierten optischen Filtern und dahinter sitzender Detektorplatine mit Flexkonnektor, Membranträger mit Membran sowie der in den Laserhalter eingesteckten Laserdiode mit einer Kappe aus Silikon.

Es ergeben sich anhand der Vorgaben folgende Änderungen für den Aufbau des Transducers:

- Die Zweiteilung von Träger und Messzelle wird aufgehoben und durch eine einzige Kammer mit eingeklebten Filtern und Photodetektoren ersetzt.

- Die Materialien werden durch biokompatibles Titan bzw. durch implantierbares, kohlefaserverstärktes, schwarzes PEEK-MOTIS der Firma Invibio ausgetauscht.
- Die Verbindungen der Transducer-Teile werden mit dem polyurethanbasierten Klebstoff DELO PUR 9691 hergestellt. Dieser Klebstoff wurde über 1000 h in einem Langzeitversuch in künstlicher interstitieller Flüssigkeit bezüglich der Haltbarkeit der Klebeverbindungen getestet und hat sich damit gegenüber Epoxy- und Zyanacrylatklebstoffen durchgesetzt. Außerdem ist der Klebstoff aufgrund seiner Schwarzfärbung optisch dicht und nicht fluoreszierend. Allerdings besitzt er keine Biokompatibilitätszertifizierung wie zum Beispiel ISO 10993 oder USP VI und muss erst in Implantierversuchen getestet werden.
- Um die Stabilität und Positionierung des Hydrogelwellenleiters zu verbessern, ist ein zusätzlicher Steg in die Zelle integriert, der die Bewegungsfreiheit des Zylinders einschränkt und vor dem Zerbrechen schützt, ihn aber nicht berührt.
- Nach dem Aufsetzen der Photodetektorplatinen, wird die Transducer-Einheit mit dem medizinischen Silikon Nusil MED 6215, das in Abschnitt 6.1.2 durch Implantierversuche untersucht und ausgewählt wurde, verkapselt.
- Abschließend werden zwei Membranträger mit Hydrogelmembranen zur Ankopplung des Transducers an die Körperflüssigkeit in die zwei Öffnungen der Messzelle eingesetzt.

Die Konstruktion des Transducers unter Berücksichtigung der vorgestellten Änderungen ist in CAD-Zeichnung 6.4 gezeigt.

Die mechanisch tragenden Komponenten des Transducers werden in zwei biokompatiblen Materialien PEEK und Titan hergestellt. Aufgrund der dabei gewonnenen Erfahrungen lassen sich die beiden Materialien vergleichen und ein favorisiertes Material auswählen.

Die Fertigung der Transducerkammer aus Titan weist abgesehen von der guten Biokompatibilität gegenüber PEEK wesentliche Nachteile auf.

- Die Transducer-Einheit aus Titan wiegt 5,2 g gegenüber 1,6 g der PEEK-Einheit und ist damit mehr als dreimal so schwer. Das Gewicht spielt bei dem Implantat eine Rolle, da es sich bei Bewegungen des Körpers träge mitbewegt und dadurch das umgebende Gewebe reizt und belastet.
- Die Bearbeitung von Titan ist aufwendig und teuer. Es ist im Gegensatz zu PEEK nicht spritzgussfähig und bietet keine billige massentaugliche Fertigungsmöglichkeit.
- Aus optischen messtechnischen Gründen ist die reflektierende Oberfläche des Titan nachteilig gegenüber dem schwarzen kohlefaserverstärkten PEEK, da die Reflektionen des Anregungslichts innerhalb der Messkammer dazu führen können, dass Anregungslicht nach Reflektionen auf die Photodetektoren gelangt.

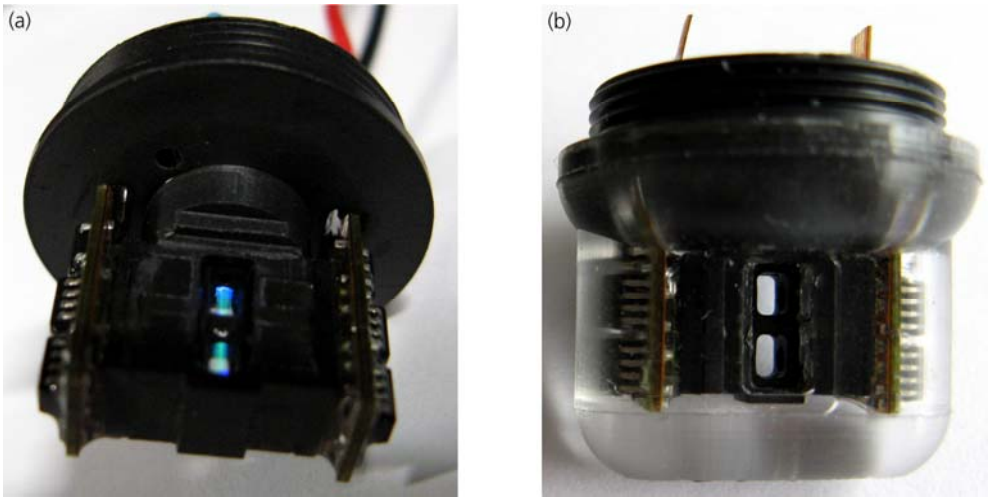


Abbildung 6.5: Aufbau der Transducer-Einheit.
(a) Messkammer mit Laserhalter, aufgesetzten Photodetektoren und eingesetztem Hydrogelwellenleiter und zur Fluoreszenz angeregten Sensorproteinen.
(b) PEEK-Transducer mit Silikonverkapselung.

Aus diesen Gründen wird in diesem Entwicklungsstadium die Herstellung der Transducer-Kammer aus PEEK favorisiert.
In Abbildung 6.5 (a) ist der PEEK-Transducer mit eingesetztem Hydrogelwellenleiter, Photodetektoren und angeschlossener Laserdiode im Laserdiodenhalter gezeigt. In den rechteckigen Aufsätzen befinden sich die optischen Detektionsfilter. Die Photodetektoren werden mit dem ISO 10993 zertifizierten Zyanacrylatklebstoff Loctite 4061 fixiert und anschließend mit dem UV Klebstoff Loctite 3301, ebenfalls ISO 10993 zertifiziert, vergossen und fest mit der Transducerkammer verbunden. Die Verbindungskabel der Photodetektoren werden durch Öffnungen im zylindrischen Laserhalter in den hinteren Teil des Sensors geführt. Abgeschlossen wird der Transducer-Aufbau mit der Silikonverkapselung, durchgeführt in einem Vakuumverfahren von der Firma Labman Automation (LA). Der verkapselte Transducer ist in Abbildung 6.5 (b) dargestellt.
Anschluss im hinteren Teil des Sensors, finden die Steuerungselektronik, Funkeinheit und Batterie (nicht dargestellt). Das Gewinde des Laserhalters dient zum Aufschrauben einer Kapsel welche diese Komponenten umschließt.

6.2.2 Implantathülle

Der Kontakt des Implantats mit dem Gewebe im Körperinneren erfordert spezielle biokompatible Eigenschaften der Hülle des Implantats, damit es zu keiner Entzündung, Abstoßungsreaktion oder einer festen fibrösen Einkapselung des Implantats kommt. Für die Hülle des Implantats wird biokompatibles Silikon zum Schutz der Transducer-Einheit verwendet, die Steuerungseinheit inklusive der Batterie wird von einem aufschraubbaren PEEK-Zylinder umgeben.

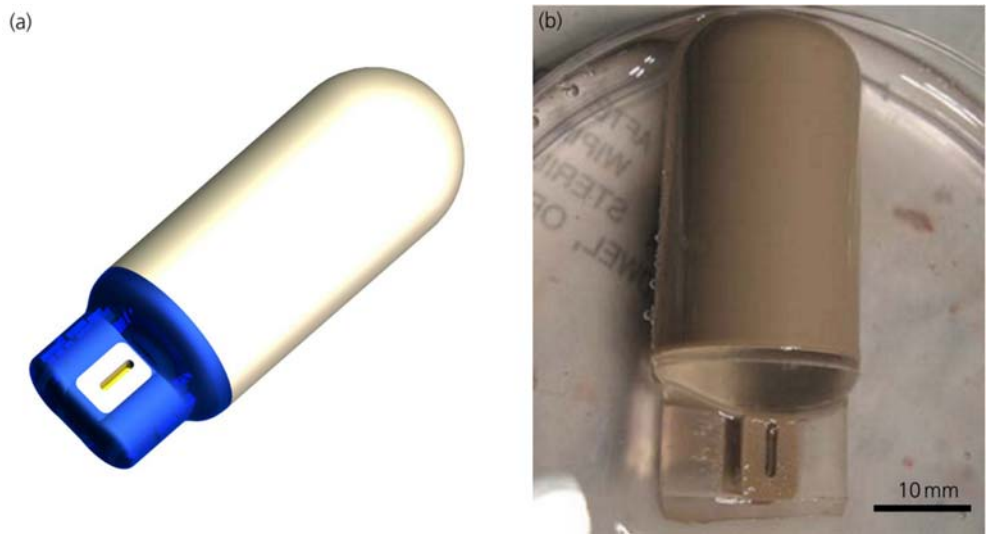


Abbildung 6.6: Verkapselung des Implantats.
(a) CAD-Konstruktion.
(b) Realisierung eines Hüllmodells des Implantats in PEEK-natur und Silikon Nusil MED 6215 der Firma Labman Automation.

Durch die Verwendung des Silikons wird eine Abdichtung der Transducer-Einheit erzielt und gleichzeitig eine Dichtfläche für die aufschraubbare PEEK-Kapsel bereitgestellt, so dass Batterie und Steuerungseinheit ebenfalls vor dem Eindringen von Körperflüssigkeit geschützt sind. Des Weiteren wird in den mit Silikon verkapselten Transducer beidseitig ein Membranträger aus PEEK eingesetzt.
In Abbildung 6.6 (a) ist die Konstruktion der Hülle gezeigt, sowie ein von LA anhand der Konstruktion hergestelltes Modell (b). Es besteht aus PEEK-natur mit einem Kopf aus Nusil MED 6215 Silikon. Das Modell wird für die Implantierversuche benutzt.

6.2.3 Implantation der Außenhülle

Die Implantation der Hülle des Implantats wurde durchgeführt, um die Biokompatibilität der Größe, Form und der Materialkombinationen zu untersuchen. Die Implantation der gesamten Hülle ist in Abbildung 6.7 gezeigt.

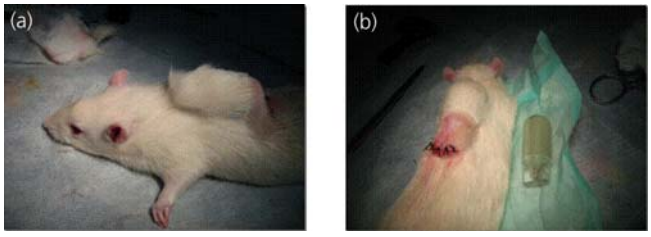


Abbildung 6.7: (a) und (b) Implantation der gesamten Hülle bestehend aus Silikon und PEEK in eine Ratte. Die Hülle besitzt einen Durchmesser von 21 mm und eine Gesamtlänge von 58 mm.

Sie besteht im vorderen Sensorteil aus Nusil MED 6215 Silikon und im hinteren Teil aus PEEK-natur, siehe Abbildung 6.6 (b), und wird ohne Inhalt implantiert. Sie besitzt einen Durchmesser von 21 mm und eine Länge von 58 mm.
Vier Versuchstiere erhalten je ein Implantat der Hülle. Die Hüllen werden mit Ethylenoxid sterilisiert. Alle Implantate werden nach 33 Tagen explantiert.
Um alle Implantate bildet sich eine flüssigkeitsgefüllte Kapsel. Diese wurde auf ihren Inhalt hin untersucht.
Die Flüssigkeit beinhaltet 4300 weiße Blutkörperchen/µL mit einem hauptsächlich mononukleären Zellinhalt. Die Natriumkonzentration liegt bei 136 mM, Kalium bei 5,3 mM und Glukose bei 136 mg/dL. Diese Werte sind vergleichbar mit den Werten der interstitiellen Flüssigkeit und deuten auf eine Eindiffusion der interstitiellen Flüssigkeit in die Kapsel hin. Damit scheint es möglich zu sein, den Glukosegehalt innerhalb einer Gewebekapsel zu messen.
Die Explantation der Implantathülle gelingt ohne Schwierigkeiten, da das Gewebe nicht adhäriert, siehe Abbildung 6.8 (a). Es hat sich eine glatte, unbedeutend entzündete, fibrotische Kapsel um die Hülle gebildet. Der histologische Befund ist jedoch schlechter. Eine Fremdkörperreaktion des angrenzenden Gewebes findet statt und die fibröse Kapsel weist eine Dicke zwischen 0,2 und 1,1 mm auf, siehe Abbildung 6.8 (b).
Die Versuchstiere zeigen bei diesen, für sie sehr großen Implantaten, eine deutliche Verhaltensbeeinträchtigung. Dies legt eine zukünftige Änderung bzw. Verkleinerung und Abflachung des Designs nahe, um die Beeinträchtigung zu reduzieren.

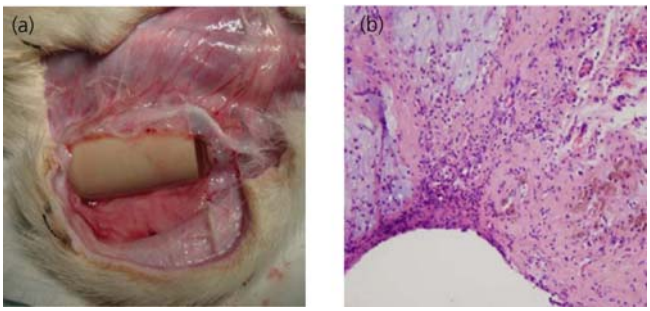


Abbildung 6.8: (a) Explantation der gesamten Hülle bestehend aus Silikon und PEEK, mit einem Durchmesser von 21 mm und einer Gesamtlänge von 58 mm.
(b) Histologischer Schnitt. Die fibröse Kapsel zeigt eine variable Dicke zwischen 0,2 und 1,1 mm.

6.2.4 Hydrogelmembran

Die Verbindung des Wellenleiters zur Umgebungsflüssigkeit wird über eine Hydrogelmembran hergestellt. Durch diese Membran wird verhindert, dass Körperzellen sowie größere Proteine in die Sensorzelle eindringen und die optische Messung stören.
Die Herstellung der Membraneinheit mit synthetischem Hydrogel wird am PISAS wie folgt durchgeführt: Die Polymerlösung des synthetischen Hydrogels wird in einen bereitgestellten Membranträger gefüllt. Der Membranträger besteht aus einem vorgefertigten PEEK-Rahmen, in den zur Stabilisierung der Hydrogelmembran

zusätzlich ein Edelstahlnetz der Firma Vomet mit dem PU-Klebstoff DELO PUR 9691 eingeklebt wird. Dieses befindet sich nach dem Eingießen der Flüssigkeit und deren Auspolymerisieren innerhalb des Hydrogels, stabilisiert und bewahrt es vor dem Herausfallen aus dem Rahmen, siehe Konstruktion in Abbildung 6.9 (a) und Realisierung in Abbildung 6.9 (b). Das Netz hat eine Dicke von 112 µm und eine offene Fläche von 54%.

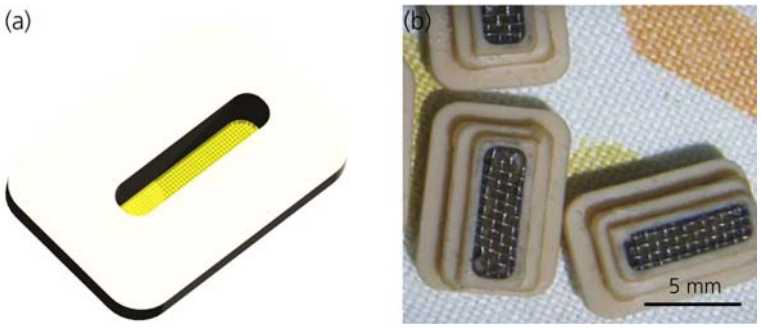


Abbildung 6.9: Hydrogelmembran in Membranhalter mit eingeklebtem Edelstahlnetz.
(a) CAD-Konstruktion der Membraneinheit.
(b) Realisierung der Membraneinheit (Rückseite).

Dieser Rahmen wird dann auf den Transducer aufgesteckt. Das Konzept ist einerseits fertigungstechnisch einfach und es entsteht eine 300 µm dünne Hydrogelmembran mit integriertem Netz, die eine große Öffnungsfläche bei gleichzeitig geringer Dicke aufweist. Andererseits kommen mit dem Edelstahlnetz und dem PU-Klebstoff zwei zusätzliche Materialkomponenten zum Einsatz und führen unter Biokompatibilitätsgesichtspunkten zu einem nicht optimalen Materialmix.
Nach der Herstellung der Membraneinheit wird deren Funktionstüchtigkeit am PISAS getestet. Die Porengröße der Membran beträgt 5 – 7 nm. Die Diffusionsmessung einer fluoreszenzmarkierten Glukoselösung hat gezeigt, dass diese Moleküle durch die Membran diffundieren. In einem zweiten Experiment mit fluoreszenzmarkierten 500 kDalton Dextranmolekülen und einer Größe von ca. 35 nm ist über einen Zeitraum von 3 Wochen keine Diffusion dieser Moleküle durch die Membran festgestellt worden. So ist demonstriert, dass eine effiziente Dichtung zwischen Hydrogelmembran und Rahmen besteht. Moleküle der interstitiellen Flüssigkeit kleiner der Porengröße diffundieren damit ausschließlich durch die Hydrogelmembran in die Messkammer, größere Moleküle dagegen gelangen nicht in den Sensor.

6.2.5 Implantation der Membran

Zur Untersuchung der Biokompatibilität der Membraneinheit werden ebenfalls Implantationsversuche durchgeführt. Jedem Versuchstier werden 2 Membraneinheiten eingepflanzt. Nach 28 Tagen werden alle Proben entnommen. Die Explantation einer Membraneinheit ist in Abbildung 6.10 (a) gezeigt.

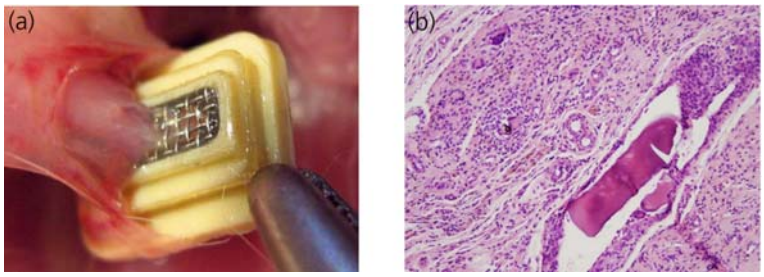


Abbildung 6.10: (a) Membraneinheit nach 4 Wochen explantiert. Die Membraneinheit wird von einer fibrösen Kapsel umhüllt. Ein verdicktes Wachstum ist auf beiden Seiten der Hydrogelstahlnetzmembran mit einer erhöhten Entzündungsreaktion und starker Adhäsion zu beobachten. Die Entnahme des Implantats führt zur Ablösung des Hydrogels von dem Netz.
(b) Histologischer Schnitt eines Hydrogelbruchstücks eingebettet in das Gewebe. Das schwarze Fragment könnte ein Kleberrest des Stahlnetzes sein.

Die Implantate sind von einer fibrösen Kapsel umgeben. Weiter wird bei der Explantation der Membraneinheit eine Gewebeadhäsion auf beiden Seiten der Membran sichtbar. Das Gewebewachstum führt zu Zerstückelung und Ablösung des Hydrogels vom Stahlnetz. Die Membraneinheit kann aus diesen Gründen nicht entnommen werden, ohne dass durch den Bewuchs die Hydrogelschicht vom Netz abgezogen wird. Der PEEK-Rahmen lässt sich dagegen problemlos entfernen.
Weiter findet man kleine schwarze Fragmente in der Kapselwand, siehe Abbildung 6.10 (b). Diese Partikel könnten von dem schwarzen Klebstoff DELO PUR 9691 herrühren, da dieser Klebstoff zum Einkleben des Edelstahlnetzes benutzt wurde.
Das Ergebnis dieser Experimente zeigt eindeutig, dass diese Konstruktion der Membran nicht für das Sensorimplantat geeignet ist. Da sich die Membran vom Träger samt Klebstoff ablöst.
Als eine Alternative zur Vermeidung des Materialmixes und Stabilisierung der Membran werden zwei weitere Varianten der Membraneinheit in Betracht gezogen. Es werden Membranträger vollständig aus PEEK bzw. Titan gefertigt. Diese bestehen nur aus einem Material und das Netz wird durch eine mit Bohrungen versehene Fläche ersetzt, die von dem Hydrogel bedeckt wird, so dass kein Klebstoff benötigt wird. Nachteilig könnte sich die geringere Öffnungsfläche von ca. 45%, aufgrund der technisch möglichen Anzahl an Bohrungen, auf die Antwortzeit des Sensors auswirken. Die Antwortzeit verlängert sich, da sich, durch die Verringerung der Öffnungsfläche, der diffusive Austausch der Körperflüssigkeit mit der Flüssigkeit in der Messkammer und dem Hydrogelwellenleiter verlangsamt.

6.2.6 Assemblierungsprozess

Die Verwendung von Hydrogelen und Sensorproteinen in einem Implantat erfordert ein Assemblierungskonzept, siehe Abbildung 6.11, das es einerseits erlaubt die Hydrogele in wässriger Umgebung zu halten und nicht zu beschädigen, andererseits die implantierten Komponenten zu sterilisieren und während des Zusammenbaus steril zu halten.

Deshalb werden parallel die Transducer-Einheit mit Silikonhülle und davon separat die Steuerungseinheit inklusive Batterie und Lasermodul aufgebaut. Das Lasermodul bildet die Schnittstelle. Diese beiden Einheiten werden sterilisiert und können so gelagert werden.

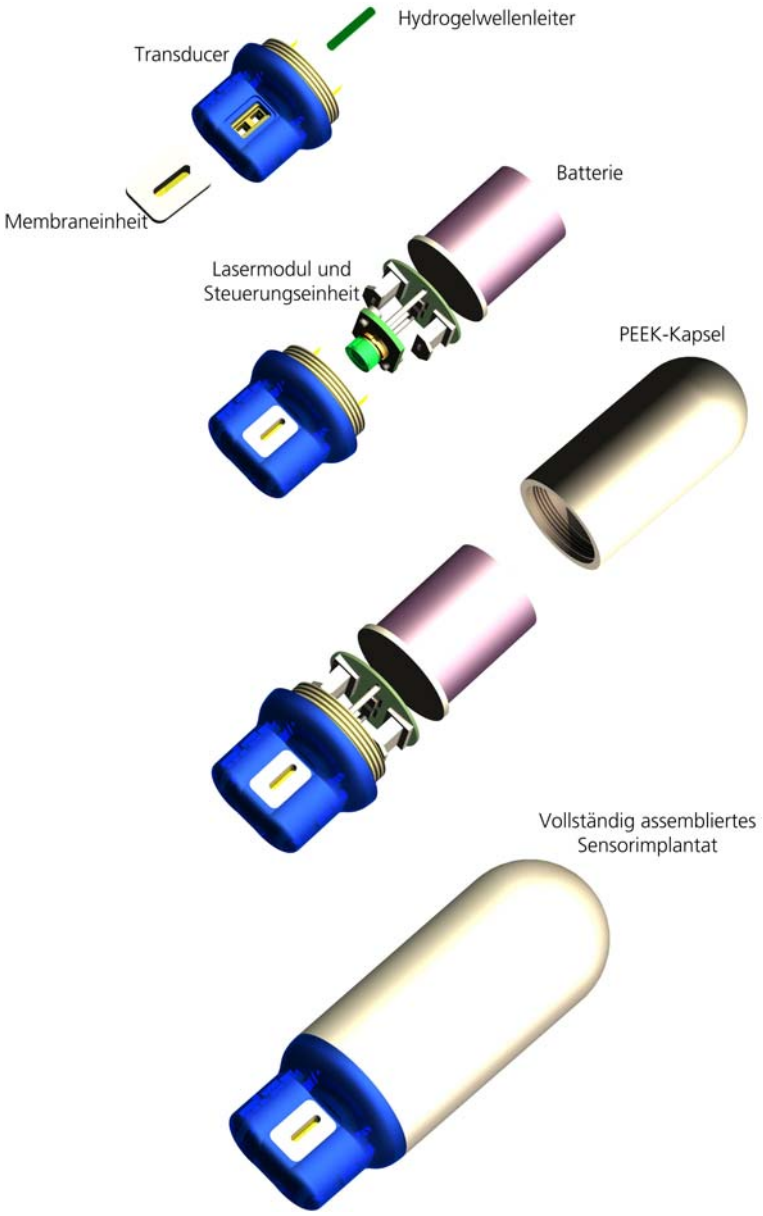


Abbildung 6.11: Assemblierungskonzept des Implantats. Zuerst wird der Transducer mit den Membranen und dem Wellenleiter versehen. Dann wird das Lasermodul zusammen mit der Steuerungseinheit sowie der Batterie montiert und zum Schluss die zylindrische Kapsel aufgeschraubt.

Als Sterilisationsverfahren kommen hier die Dampfsterilisation, Ethylenoxid- oder Formaldehydsterilisation oder eine Plasmasterilisation in Frage [48]. Eine UV-Sterilisation

ist eventuell, unter Drehung der zu sterilisierenden Komponenten, um alle Oberflächen zu beleuchten, möglich. Dieses Verfahren eignet sich beispielsweise zur Sterilisation der Batterie, da sie nur einer maximalen Temperatur von 100 °C ausgesetzt werden darf, aber wegen ihrer Zylindergeometrie einfach gedreht werden kann. Andere ionisierende Strahlung kommt aufgrund der möglichen Schädigung der elektronischen Bauteile und der hohen Kosten nicht in Betracht. Eine Dampfsterilisation aller Komponenten exklusive der Batterie und der Hydrogelkomponenten wurde erfolgreich durchgeführt.
Die Hydrogelkomponenten, d.h. Wellenleiter und Membraneinheit, werden aus sterilgefilterten Flüssigkeiten und sterilen Chemikalien in steriler Umgebung in ihren Formen hergestellt. Sie können dann ihrerseits ebenfalls in physiologischer Flüssigkeit bis zum Einsatz einige Tage gelagert werden. Das Zusammenführen der Komponenten muss dann ebenfalls in steriler Umgebung erfolgen.



Abbildung 6.12: (a) geöffnetes Implantat bestehend aus Transducer, Steuerungseinheit inklusive Lasermodul und Batterie sowie abschließender Kapsel.
(b) Geschlossener Implantatprototyp mit einem Durchmesser von 21 mm und einer Länge von 69 mm sowie einem Gewicht von insgesamt 26 g.

So wird zur Fertigstellung des Implantats auf den Transducer einseitig eine Membraneinheit aufgesteckt. Jetzt ist es möglich die Transducer-Einheit mit einer Pufferlösung zu füllen und so für das Einsetzen des Hydrogelwellenleiters vorzubereiten. Eingesetzt wird der Hydrogelwellenleiter über die Öffnung, die später zur Einkopplung des Laserlichts durch die Laserdiode verwendet wird.
Nach dem Einsetzen des Wellenleiters in die Transducer-Einheit wird diese mit der zweiten Membran verschlossen. Dann wird die Laserdiode mit Silikonkappe auf das Ende des Wellenleiters aufgesetzt und verschraubt. Jetzt wird die Steuerungseinheit und die Batterie angeschlossen und abschließend der PEEK-Zylinder aufgeschraubt.
Das anhand dieses Assemblierungskonzepts aufgebaute Implantat ist in geöffnetem Zustand in Abbildung 6.12 (a) und in geschlossenem Zustand in Abbildung 6.12 (b) dargestellt. Zu sehen sind die Transducer-Einheit mit Membranträger hergestellt aus Invibio PEEK-MOTIS und mit Silikon Nusil MED 6215 verkapselt, die Steuerungseinheit mit Lasermodul und Batterie sowie die PEEK-MOTIS-Kapsel. Die Hydrogelkomponenten Membran und Wellenleiter sind nicht sichtbar. Das Implantat weist eine Größe von 21 mm Durchmesser und 69 mm Länge auf und besitzt dabei ein Gewicht von 26 g.

6.2.7 Dichtheitstest

Der Implantatprototyp wird Dichtheitstests unterzogen, um zu gewährleisten, dass die elektronischen Komponenten nicht durch Flüssigkeitseintritt beschädigt werden. Es dürfen nur die Messkammer, der Hydrogelwellenleiter und die optischen Filter mit der interstitiellen Flüssigkeit in Kontakt treten. Demzufolge muss der Aufbau des Transducers selbst flüssigkeitsdicht sein und die Verbindungsstelle zwischen der auf geschraubten Kapsel und dem Transducer ebenfalls.
Dementsprechend werden zwei Dichtheitstest durchgeführt. Zur Überprüfung der Dichtheit der Fügestellen des Transducers werden die Öffnungen der Messkammer des Transducers mit speziell angefertigten Verschlussstücken an den Membraneinsatzstellen und der Laserdiode verschlossen und mit einen Luer- Konnektor versehen, siehe Abbildung 6.13 (a).

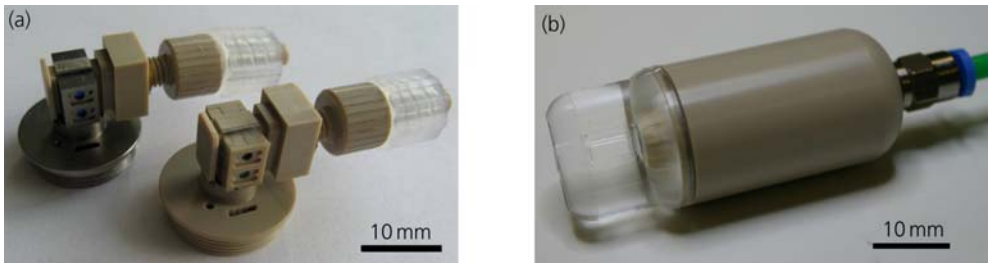


Abbildung 6.13: (a) Aufbau der Transducer-Einheit für den Dichtheitstest mit Luer-Lock-Druckluftanschlüssen.
(b) Aufbau des Dichtheitstest der Silikonverkapselung mit der PEEK-Hülle durch Anlegen eines Überdrucks innerhalb der Sensorkapsel über einen eingebauten Druckluftanschluss.

Der Test wird durchgeführt, indem die Zelle über den Luer- Konnektor an eine regelbare Druckluftzufuhr angeschlossen und ein Überdruck von 1 bar eingestellt wird.

Währenddessen wird die Kammer unter Wasser getaucht und auf Blasenaustritt kontrolliert. Kein untersuchter Transducer zeigte Blasenaustritt. Die Transducer sind somit unter den Testbedingungen dicht.
Die Dichtung zwischen der Silikonverkapselung und der PEEK-Hülle wird unter gleichen Bedingungen von LA getestet. Dazu wird die PEEK-Kapsel mit einem Druckluftanschluss versehen. Ebenfalls bei 1 bar Überdruck unter Wasser wird der zusammen geschraubte Testaufbau, bestehend aus Silikonverkapselung und PEEK-Hülle, auf Blasenaustritt kontrolliert, siehe Abbildung 6.13 (b). Auch die Schraubverbindung zeigte keinen Blasenaustritt, so dass das Sensorimplantat die Dichtheitstests bestanden hat.

6.3 Elektronik

Zuerst werden die gesamte Systemarchitektur und der Ablauf einer Messung erläutert. Die vollständige Elektronik des Sensorimplantats wird dann in zwei funktionelle Einheiten zusammengefasst und deren Funktionsweisen erklärt. Sie setzen sich zusammen aus Signalanregung und analoger Signaldetektion sowie digitaler Signalwandlung und Steuerung des Implantats.

6.3.1 Systemarchitektur

Die Systemarchitektur des Sensorimplantats besteht aus vier unterschiedlichen Grundelementen, siehe Abbildung 6.14:

- Die Steuerungseinheit aktiviert oder deaktiviert über einen Schalter die einzelnen Komponenten, digitalisiert die Daten und überträgt diese an den PC.
- Der PC ist via Zigbee-Funkeinheit mit der Steuerungseinheit verbunden und fungiert als Benutzerschnittstelle, Datenspeicher und zur Visualisierung.
- Das Lasermodul dient zur Erzeugung des Fluoreszenzlichts der Sensorproteine.
- Mit der Detektoreinheit wird das Fluoreszenzlicht erfasst, verstärkt und in ein elektrisches Spannungssignal gewandelt. Die beiden Detektoreinheiten enthalten je zwei Photodetektoren. Je ein Detektor soll zukünftig für eine Referenzmessung benutzt werden. Diese wird derzeit nicht durchgeführt und nur die Daten eines Detektors pro Einheit ausgewertet.

Die Spannungsversorgung des Implantats erfolgt mit einer Batterie und einem Step-Up Konverter, der die Batteriespannung von 4,1 V auf 5,5 V heraufsetzt, da diese Spannung für den Betrieb der Laserdiode benötigt wird.

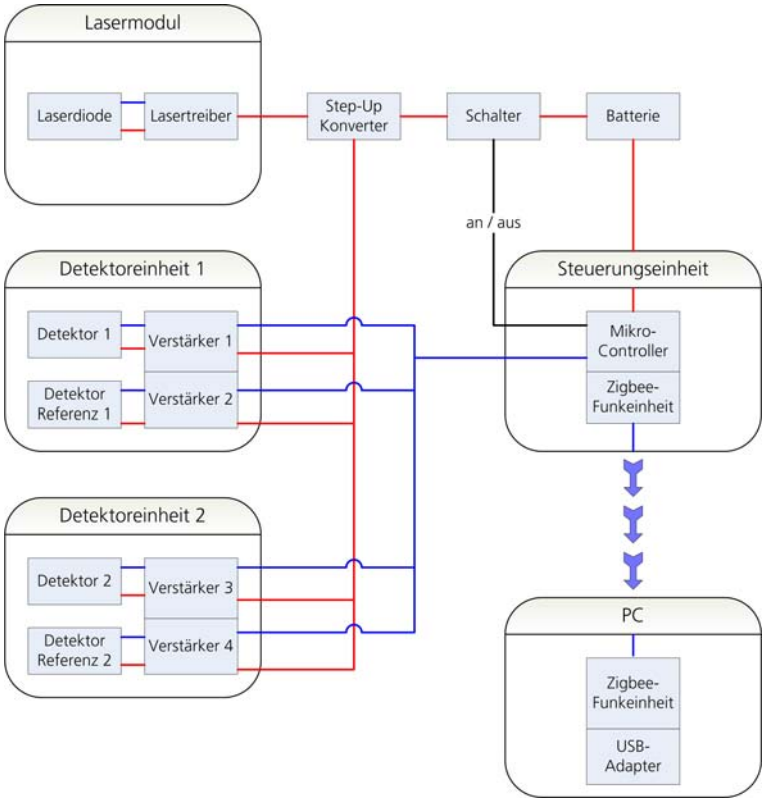


Abbildung 6.14: Schemazeichnung der Verschaltung der funktionellen Einheiten der Sensorelektronik. Der Mikro-Controller der Steuerungseinheit schaltet das Lasermodul, bestehend aus Lasertreiber und Laserdiode, sowie die Detektoreinheiten auf Befehl vom PC ein. Die benötigte Spannung wird von einer Batterie geliefert und von einem Step-Up Konverter heraufgesetzt.
Die Detektoreinheiten geben die gemessenen und verstärkten Spannungssignale an die Steuerungseinheit weiter und werden von dort über die Zigbee-Funkeinheit an den PC übermittelt. Zur Realisierung der PC-Steuerung ist ein USB-Adapter mit Zigbee-Funkeinheit an den PC angeschlossen.

6.3.2 Messablauf

Die nicht implantierte Einheit, hier der PC, initiiert die Messungen. Wird eine Messung vom PC aus gestartet, beginnt der Messvorgang mit dem Einschalten der Laserdiode durch die Steuerungseinheit. Dies geschieht $T_{Verzögerung}$ = 255 ms vor der eigentlichen Messung, um den Einfluss von Einschaltphänomenen des Lasers während der Messung zu minimieren. Anschließend nehmen die vier Photodetektoren N = 256 Messwerte auf. Die Messung ist „gesampelt“, d.h. die 4 Detektoren werden nacheinander durchgeschaltet. Die Zeitdauer eines Sampling-Durchlaufs beträgt $T_{sampling}$ = 100 µs. Der Messvorgang benötigt so weitere 4 x 25,6 ms. Nach $T_{Anregung}$ = 357,4 ms ist der Messvorgang abgeschlossen, dargestellt in Abbildung 6.15. Dies ist gleichzeitig auch die Dauer der Laserbestrahlung der Proteine. Es werden nun die 256 Messwerte je Messkanal gemittelt, per Funkeinheit an den Computer übertragen, gespeichert und über eine Software ausgegeben. Die angegebenen Zeitwerte stellen die Maximalwerte

der einstellbaren Zeiten der von der Firma Micro Tech (MT) zur Verfügung gestellten Software dar und bieten ein Maximum an Genauigkeit der Messungen.

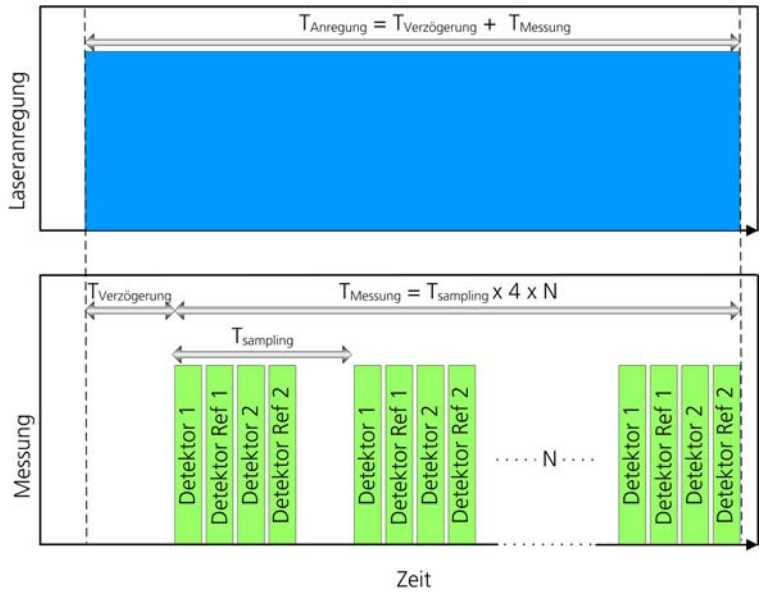


Abbildung 6.15: Zeitlicher Ablauf einer Messung, unterteilt in die Anregung der Proteine durch den Laser und die Messung des Fluoreszenzlichts durch die Photodetektoren. Die Laserbetriebsdauer beginnt $T_{Verzögerung}$ vor dem Einschalten der Photodetektoren und endet nach Ablauf der gesamten Messzeit $T_{Messung}$. Die 4 Detektoren (Detektor 1, Detektor Ref 1, Detektor 2, Detektor Ref 2) werden nacheinander durchgeschaltet. Nach $T_{sampling}$ beginnt der nächste Durchlauf. Dies geschieht N-mal so ergibt sich eine Messzeit $T_{Messung} = T_{sampling} \times 4 \times N$.

Die Software ermöglicht die Einstellung einer Wiederholzeit der Messungen, mit dieser Zeit wird vorgeben in welchem zeitlichen Abstand wiederholt Messungen vom PC initiiert werden. Ebenso kann die Verzögerungszeit eingestellt werden, mit der die Messung nach dem Einschalten des Lasers beginnt. Zudem ist eine automatische Stoppfunktion nach einer bestimmten Anzahl an Messungen implementiert. Diese Funktionen dienen der Variabilität der im Labor durchzuführenden Messungen und sind nicht notwendigerweise Bestandteil des Messprotokolls für das Implantat.

6.3.3 Anregungs- und Detektionselektronik

Das Lasermodul besteht aus der Laserdiode und dem Treiberbaustein, der die optische Ausgangsleistung der Laserdiode auf einen konstanten Wert von ca. 0,1 mW regelt. Es wird das gleiche Modul, in miniaturisierter Form, wie für den Demonstrator beschrieben in Abschnitt 5.2.1 verwendet, siehe Abbildung 6.17 (a). Da die Laserdiode für den Betrieb 5,5 V benötigt, die vorgesehene Batterie aber nur 4,1 V liefern kann, ist ein Heraufsetzten der Spannung mit einem Step-Up Konverter notwendig. Mit dieser Spannung werden sowohl die Laserdiode als auch die Detektorplatinen versorgt.
Die Detektionselektronik besteht aus zwei baugleichen Detektorplatinen mit je zwei Photodetektoren. Die Platine der Detektionseinheit wird aus einem starren Teil, das die Bauteile trägt und einem flexiblen Stück, das die Anschlussleitungen enthält,

hergestellt. Es werden die bereits in Abschnitt 5.2.2 charakterisierten und im Demonstrator benutzten Phototransistoren Vishay TEMT 6000 eingesetzt. Der dort generierte Photostrom wird mit zwei Operationsverstärkern AD 8034 in zwei Stufen verstärkt und in eine Spannung gewandelt. Der Signalbereich der Ausgangsspannungen liegt so zwischen 0 und 3,8 V. Durch die zweitstufige Verstärkung können Bauteile mit geringeren Fehlertoleranzen verwendet werden als bei einem Aufbau mit einer einstufigen Verstärkung, sodass sich die Reproduzierbarkeit der Schaltungen erhöht. Die verstärkte Signalspannung ergibt sich näherungsweise aus dem generierten Photostrom I_{Photo} des Photodetektors und den Widerständen R_1, R_3 und R_4, angeschlossen an den Operationsverstärkern, wie folgt:

$$V_{Signal} = I_{Photo} R_1 \frac{R_4}{R_3} \qquad 6.1$$

Die gewählten Widerstandswerte liefern einen Verstärkungsfaktor 70.

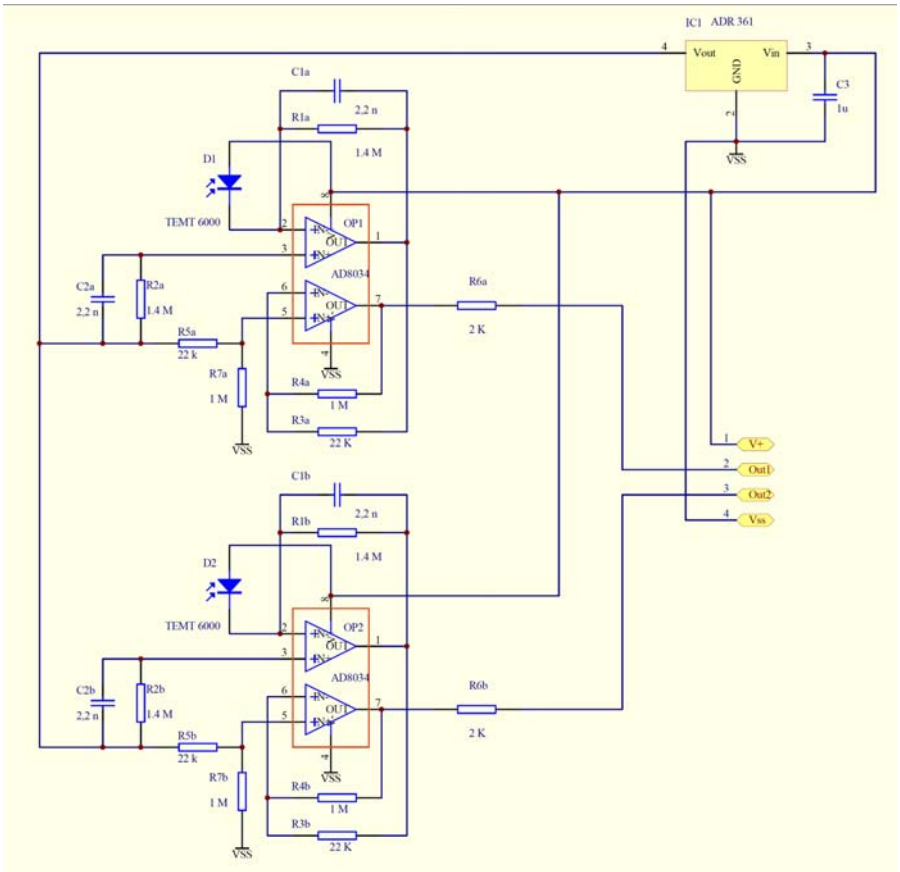


Abbildung 6.16: Schaltplan der Detektoreinheit. Der Photostrom des Phototransistors TEMT 6000 wird mit dem Operationsverstärkter AD 8034 in zwei Stufen verstärkt und in eine Spannung gewandelt. Zur Verbesserung der Genauigkeit wird eine Referenzspannungsquelle ADR 361 eingesetzt.
Auf einer Platine befinden sich zwei Photodetektoren und Operationsverstärker.

Zur Verbesserung der Genauigkeit wird zusätzlich eine Referenzspannungsquelle ADR 361 integriert, siehe Abbildung 6.16.
Das gesamte Layout wird kompakt gestaltet und die Platinen für das Implantat beidseitig bestückt, um den Anforderungen an die Miniaturisierung für das Implantat gerecht zu werden. Alle aktiven Bausteine werden in der kleinsten verfügbare Baugröße bestückt sowie Widerstände und Kondensatoren der Baugröße 0402 aufgelötet. Sie besitzen eine Größe von 0,5 mm x 1,0 mm x 0,4 mm. Der starre Teil der Platine weist eine Größe von 5,5 mm x 10,5 mm auf und ist inklusive Flexanschlusskabel in Abbildung 6.17 (b) gezeigt. Zu sehen ist die Vorderseite der Platine auf der sich die Detektoren TEMT 6000 befinden. Auf der Rückseite sind die aktiven Bausteine der Verstärkung und der Referenzspannungsquelle platziert.

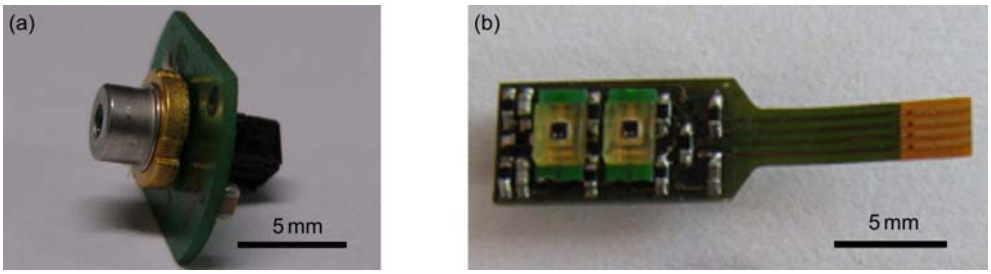


Abbildung 6.17: (a) Miniaturisiertes Lasermodul mit Laserdiode.
(b) Platine der Detektoreinheit mit 2 Photodetektoren.
Beide Komponenten werden in dieser Form in das Implantat eingebaut.

6.3.4 Steuerungseinheit

Die Steuerung und Datenerfassung der Sensoreinheit erfolgt mit Hilfe des energieverbrauchsarmen Mikro-Controllers TI CC2430, ausgestattet mit einem 12-bit Analogdigitalwandler, der über einen Zigbee-Funkeinheit drahtlos mit einem USB-Zigbee-Empfänger und angeschlossenem PC kommuniziert, so dass die Steuerung und Datenübermittlung aus dem Sensor heraus zur Außenwelt sichergestellt ist. Der Mikro-Controller steuert über einen Schalter das Ein- und Ausschalten des Lasermoduls und der Detektoreinheiten [49]. Diese Elektronik wurde von MT realisiert und befindet sich auf einer beidseitig von MT bestückten, runden Platine mit einem Durchmesser von 17 mm, siehe Abbildung 6.18 (a).
Die Funktion der Elektronik zur drahtlosen Steuerung und Kommunikation des Implantats mit einem Gerät außerhalb des Körpers wird im Tierversuch von MT getestet. Hierfür wird der Implantatprototyp unter die Haut eines Schweins implantiert, siehe Abbildung 6.18 (b), die Funksignale außerhalb des Tieres gemessen und die Kommunikation mit dem PC überprüft.
Das Senden und Empfangen von Daten, zwischen Implantat und PC kann in einer Distanz von bis zu 4 m zwischen der Empfangseinheit des PC's und dem Implantat im Versuchstier stattfinden. Größere Distanzen wurden nicht getestet. Dabei werden die Grenzwerte der Strahlenbelastung von 10 W/m^2 bei 2,4 GHz, nach den Richtlinien der internationalen Kommission für den Schutz vor nicht ionisierender Strahlung ICNIRP

[50], des Gewebes nicht überschritten. Die emittierte Energiedichte des Implantats, gemessen von MT, beträgt 2 mW/m^2.

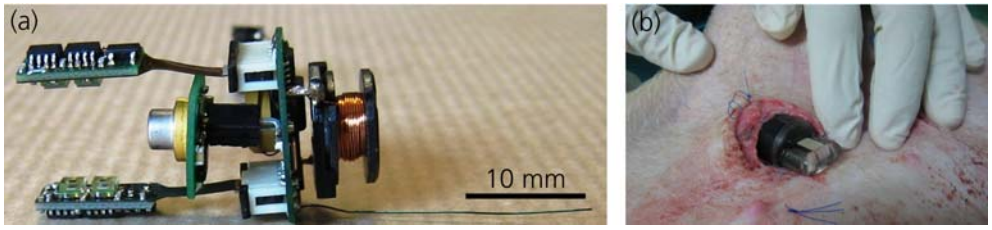


Abbildung 6.18: (a) Dargestellt ist die gesamte Elektronik bestehend aus Photodetektoren, Lasermodul und Steuerungs- und Funkeinheit mit Antenne.
(b) Sie wird an eine Batterie angeschlossen, in das Sensorimplantat eingebaut und unter die Haut eines Schweins implantiert. Die Funksteuerung des Implantats durch die Haut des Schweins funktioniert bis zu einer Entfernung von 4 m der Empfangseinheit vom Sensorimplantat, größere Distanzen wurden nicht getestet. Dabei beträgt die Strahlenbelastung der Haut 2 mW/m^2 und liegt damit weit unter dem empfohlenen Grenzwert von 10 W/m^2.

6.4 Funktionstest des Implantatprototypen in vitro

Im Mittelpunkt der Funktionstests des Implantats in vitro steht das Antwortverhalten des Sensors auf minimale und maximale Kalziumkonzentrationen. Anhand dieses Verhaltens wird die Funktionalität gezeigt und die Antwortzeit ermittelt und mit den Ergebnissen des Demonstrators verglichen. Abschließend wird die Betriebsdauer des batteriebetriebenen Implantats abgeschätzt.

6.4.1 Antwortzeiten

Zur Messung der Antwortzeiten des Implantats wird es in 50 ml Falcon-Röhrchen getaucht.



Abbildung 6.19: In Falcon-Röhrchen eingetauchtes Sensorimplantat. Die Messkammer ist nicht mit einer Membran verschlossen, der Wellenleiter steht in direktem Kontakt mit der Messlösung.

Die Röhrchen sind mit TRIS-Pufferlösungen mit den Kalziumkonzentrationen 0 mM bzw. 5 mM gefüllt. Alle 15 Minuten wird das Implantat aus einem Röhrchen genommen und in ein neues mit der jeweils anderen Konznetration getaucht, so dass die Konzentrationen in denen sich das Implantat befindet zyklisch von 0 mM auf 5 mM wechseln. Die Anordnung ist in Abbildung 6.19 gezeigt.
Die Versuche werden, im Gegensatz zu den Versuchen mit dem Demonstrator in Kapitel 5, nicht mehr mit einem Perfusionssystem durchgeführt, da der Austausch der nun benötigten, großen Volumina zu lange dauern würde und deshalb kein definierter Konzentrationssprung erzielt werden könnte. Außerdem wird keine Membraneinheit verwendet, so dass der Hydrogelwellenleiter in direktem Kontakt mit der Messlösung steht und das System in dieser Form mit dem Demonstrator vergleichbar ist. In Abbildung 6.20 sind die Signalantworten des YFP-Kanals, des CFP-Kanals und das daraus berechnete FRET-Verhältnis dargestellt. Es sind zwei vollständige Zyklen gezeigt, in denen die Signale vom niedrigen zum hohen FRET-Verhältnis und wieder zurück, bedingt durch die verschiedenen Kalziumkonzentrationen, wechseln.

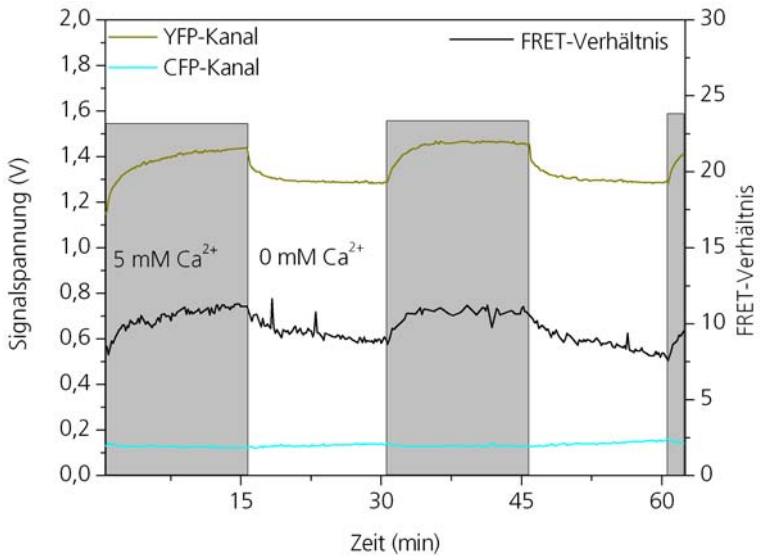


Abbildung 6.20: Zeitlicher Antwortverlauf des Sensors auf die sprunghafte Änderung der Kalziumkonzentration in der umgebenden Pufferlösung. Dargestellt sind sowohl die Spannungssignale der CFP- und YFP-Kanäle sowie das daraus ermittelte FRET-Verhältnis.

Die Änderung der Lösung verbunden mit dem Konzentrationswechsel hat instantan eine Änderung der Signalantwort zur Folge. Allerdings stellt sich erst nach ca. 5 - 10 Minuten ein konstanter Wert ein. Die Signalantwort ist sehr gut auf dem YFP-Kanal zu erkennen. Die Änderung der Signalantwort auf dem CFP-Kanal ist dagegen klein.
In Abbildung 6.21 ist der zeitliche Verlauf der Sensorantwort eines Zyklus verdeutlicht dargestellt. Das FRET-Verhältnis steigt in Anwesenheit von Kalzium exponentiell an und fällt bei Abwesenheit von Kalzium wieder exponentiell ab. Für die Mittelwerte mit Standardabweichung der Anstiegs- und Abfallzeiten ergeben sich $T_{Anstieg}$ = (2,9 ±1,5) min und T_{Abfall} = (6,2 ±2,2) min, bestimmt aus 6 Antwortzyklen des Implantats. Diese

Zeiten stimmen gut mit den Zeiten $T_{Anstieg}$ = (2,1 ±0,36) min und T_{Abfall} = (7,33 ±1,44) min des Sensordemonstrators in Abschnitt 5.3.2 überein.
Die Signalantwort auf dem CFP-Kanal ist sehr gering. Diese kleinen Werte führen schon bei kleinen Signalschwankungen zu einem, um den Faktor 2 gegenüber dem Demonstrator erhöhten, starken Rauschen des FRET-Verhältnisses, das aus dem korrigierten Verhältnis von YFP und CFP gebildet wird. Bei gleichbleibender Sensitivität, die hier nicht erneut bestimmt wurde, halbiert sich damit auch das Auflösungsvermögen um den Faktor 2. Die minimale Konzentrationsänderung Δc, die detektiert werden kann, erhöht sich von 316 µM auf 632 µM.
Eine Möglichkeit, dies zu beheben, ist die Verstärkung des CFP-Kanals zu erhöhen und so größere Signal-Werte bei gleichbleibenden kleinen Schwankungen, wie es der YFP-Kanal zeigt, zu erzielen. Möglich ist dies dann, wenn das Signalrauschen des CFP-Kanals verstärkungsunabhängig ist.

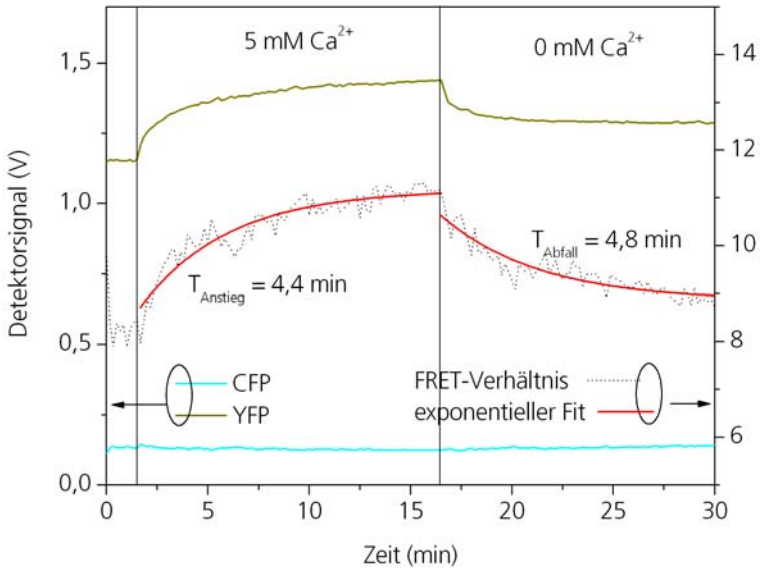


Abbildung 6.21: Zeitlicher Antwortverlauf des Sensors bei sprunghafter Änderung der Kalziumkonzentration, ermittelt aus den Detektorsignalen von CFP und YFP. Das FRET-Verhältnis wird zur Bestimmung der Antwortzeit exponentiell gefittet.

6.4.2 Betriebsdauer

Zur Abschätzung der Betriebsdauer wird der Strom während eines Messpulses gemessen und mit der Batteriekapazität die Funktionsdauer des Implantats anhand der erwarteten Anzahl an Messungen in einem bestimmten Zeitraum abgeschätzt. Ebenso wird der Strombedarf funktioneller Einheiten bestimmt, um die „Hauptverbraucher" zu identifizieren.

Batterie

Die Firma TADIRAN batteries (TB) hat im Rahmen des EU-Projektes P.Cezanne die Batterie speziell für die Anforderungen dieses Sensorimplantats entwickelt und zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um eine Lithiumbatterie, die bei einer Länge von 20 mm und einem Durchmesser von 15 mm eine Kapazität von 250 mAh aufweist. Weiter ist es möglich mit dieser Batterie kurze, hohe Strompulse zu erzeugen. Die Batterie liefert im Betriebszustand unter Last eine Spannung zwischen 4,1 V und 3,5 V. Ist die Kapazität der Batterie erschöpft, bricht die Spannung von 3,5 V auf 2,0 V ein. Ab diesem Zeitpunkt ist die Batterie nicht mehr in der Lage den Sensor zu betreiben.

Strombedarf

Zur Bestimmung des Strombedarfs der Schaltung, wird der gelieferte Batteriestrom mit einem Speicheroszilloskops durch den Spannungsabfall über einen 1 Ohm Widerstand in der Spannungsversorgungsleitung gemessen.

In Abbildung 6.22 sind Messungen des Stromverlaufs während eines Messpulses in verschiedenen Konfigurationen der funktionellen Einheiten des Sensorimplantats dargestellt.

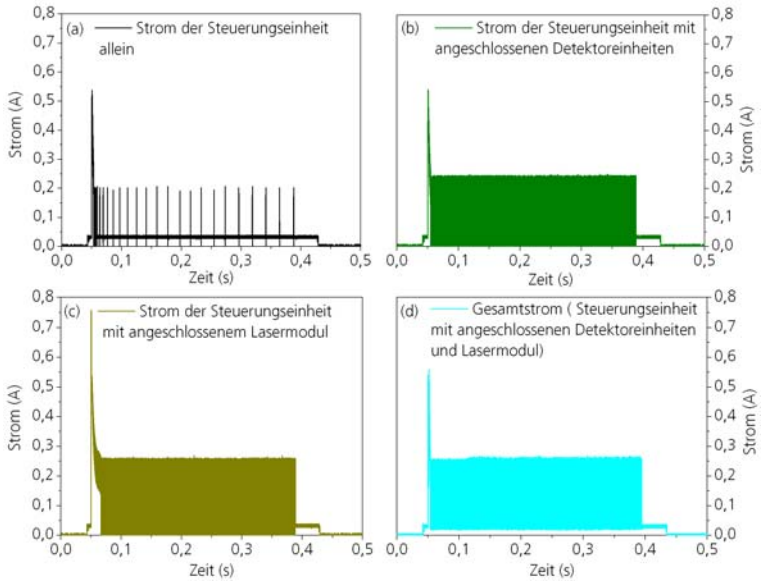


Abbildung 6.22: Stromverbrauch funktioneller Einheiten des Sensorimplantats während eines Messpulses.
(a) Stromfluss bei allein angeschlossener Steuerungseinheit.
(b) Stromfluss bei angeschlossener Steuerungseinheit und Detektoreinheiten.
(c) Stromfluss bei angeschlossener Steuerungseinheit und Lasermodul.
(d) Gesamtstrom des Sensorimplantats bei angeschlossener Steuerungseinheit, Detektoreinheiten und Lasermodul.
Das Lasermodul benötigt neben den Detektoreinheiten den meisten Strom. Der Peak-Wert des Stroms der gesamten Schaltung beträgt 760 mA. Der Rückgang des Peaks in Abbildung (d) gegenüber Abbildung (c) ist auf ein Messartefakt zurückzuführen. Während der Messphase beträgt der Gesamtstrom maximal 275 mA.

Die Strommesskurve beginnt mit einem kurzen Einschalt-Peak mit einer Dauer von bis zu 15 ms und geht dann in einen konstanten Strombedarf während der Messphase über.
Der Stromverbrauch der Steuerungseinheit allein zeigt einen Einschalt-Peak von 0,54 A und ein konstantes Niveau während de Messphase von ca. 35 mA. Sichtbar sind einzelne Peaks, die auf Auf- und Entladevorgänge des Step-Up Konverters zurückzuführen sind, siehe Abbildung 6.22 (a).
Diese Peaks gehen bei erhöhtem Strombedarf in Oszillationen über, wie sie die Stromkurve der Steuerungseinheit zusammen mit den beiden Detektoreinheiten ohne angeschlossenes Lasermodul in Abbildung 6.22 (b) zeigt. Die Oszillationen durchlaufen hier einen Strombereich von 0 - 250 mA. Der Einschalt-Peak bleibt dagegen unverändert.
Im Falle der Kombination von Steuerungseinheit und Lasermodul ohne Detektoreinheiten, steigt der Einschalt-Peak nun auf 720 mA an und der Strom während der Messphase erreicht maximal einen Wert von 260 mA, siehe Abbildung 6.22 (c).
Abschließend wird der Gesamtstrom der Schaltung, bestehend aus der Steuerungseinheit, den zwei Detektoreinheiten sowie dem Lasermodul in Abbildung 6.22 (d) betrachtet. Der Einschalt-Peak geht auf einen Wert von 560 mA zurück. Dieser Rückgang ist nur durch ein Messartefakt des Peaks zu erklären. Die Oszillationen während der Messphase überstreichen jetzt einen Bereich zwischen 20 – 260 mA.
Anhand dieser Messdaten wird deutlich, dass die „Hauptstromverbraucher" des Sensorimplantats das Lasermodul und die Detektoreinheiten sind. Die Steuerungseinheit inklusive Funkeinheit des Implantats hingegen trägt, bis auf den Einschalt-Peak, nicht wesentlich zum Gesamtstrom bei. Daraus folgt weiter, dass der Stromverbrauch des Implantats wesentlich von der Anzahl der durchgeführten Messungen abhängt.

Betriebsdauer

Die Betriebsdauer des Implantats wird unter der Annahme ermittelt, dass das Implantat zur Glukosemessung eingesetzt wird. Deshalb wird zur Abschätzung eine Anzahl von 96 Messungen pro Tag angenommen. Das entspricht 4 Messungen pro Stunde. Multipliziert mit dem Integral des in Abbildung 6.22 (d) gemessenen Gesamtstroms, ergibt sich unter Berücksichtigung der Batteriegesamtkapazität von 250 mAh eine Betriebsdauer von ca. 8 Monaten.
Eine Möglichkeit zur Optimierung der Betriebsdauer besteht darin, bei gleichbleibender Tendenz der Messwerte, beispielsweise nachts, die Anzahl der Messungen zu reduzieren.

7 Ausblick

Die Herstellung des Sensorimplantats und die Charakterisierung in vitro haben gezeigt, dass das Konzept des Hydrogelwellenleiters mit integrierten Sensorproteinen als Basis eines implantierbaren Biosensors funktioniert. Trotzdem erkennt man bei einer kritischen Betrachtung der Technologie Verbesserungsmöglichkeiten, die vor dem Einsatz eines solchen Biosensors als Implantat untersucht und genutzt werden müssen. Es werden hier mögliche Optimierungsansätze dargestellt und abschließend zwei bereits durchgeführte Versuche vorgestellt. Erstens die Reduktion der Größe des Sensorimplantats zur Verbesserung der Akzeptanz des Implantats im Körper und zweitens der Transfer der Technologie von der Messung des Analyten Kalzium hin zur Messung des Analyten Glukose.

7.1 Technologiebetrachtung und Optimierungsansätze

Optimierbare Aspekte der entwickelten Sensortechnologie und deren nächstliegende Verbesserungsmöglichkeiten werden nun aufgezeigt.

Verkürzung der Antwortzeit

Die Antwortzeit des Sensors liegt derzeit im Minutenbereich. Diese Zeit wird durch die noch durchzuführende Membranintegration erhöht und sich in etwa verdoppeln. Da es für Diabetespatienten aber wichtig ist, möglichst zeitnah, zum Beispiel nach der Nahrungsaufnahme den Blutzuckerspiegel zu messen, sollte die Antwortzeit des Sensors verringert werden.

Die Antwortzeit des Sensors hängt von der Diffusionsstrecke des Analyten in den Hydrogelwellenleiter ab.

- Zur Verringerung der Diffusionsstrecke kann die Messzelle optimiert werden, indem das Volumen der Messzelle weiter verkleinert wird.
- Ebenfalls ist durch einen mechanisch unterstützten Hydrogelwellenleiter durch eine Haltestruktur eine Verkleinerung des Wellenleiterdurchmessers denkbar.
- Die Membrandicke muss auf ein Minimalmaß reduziert werden. Die Dicke beträgt momentan ca. 300 µm. Eine Dicke von 50 µm wird angestrebt.

Erhöhung der Sensitivität

Wie bereits in Abschnitt 4.2.2 beschrieben deutet das hohe FRET-Verhältnis der im synthetischen Hydrogel immobilisierten Proteine auf eine räumliche Einengung der Proteine in den Poren hin. Kann diese durch eine Vergrößerung der Poren aufgehoben werden, nimmt der maximale FRET-Unterschied von 27% auf 45% wie in Lösung beobachtet zu. Unter der Annahme, dass diese Zunahme auch für den linearen Messbereich gilt, d. h. das FRET-Verhältnis bei 1000 µM steigt ebenfalls um den Faktor 1,67 an, führt dies zu eine Sensitivitätssteigerung um den Faktor 5, da die Steigung der

Linearisierungsgeraden des Sensitivität, vergleiche Abbildung 5.14, um den Faktor 5 zunimmt.
Berücksichtig werden muss, dass eine Vergrößerung der Poren zu einer Leckage der Proteine aus dem Hydrogelwellenleiter führen kann und in diesem Fall die Immobilisierungschemie der Proteine im Hydrogel angepasst werden muss. Eine Möglichkeit wäre beispielsweise eine kovalente Anbindung der Proteine an das Polymernetzwerk.

Verlängerung der Betriebsdauer
Die momentane Betriebsdauer von 8 Monaten ist im Vergleich mit der Betriebsdauer von Herzschrittmacherimplantaten, die bei mehreren Jahren liegt, deutlich geringer. Eine Steigerung der Batteriekapazität auf 450 mAh bei gleicher Baugröße ist bereits von TB in Aussicht gestellt. Weiter kann die Verwendung einer LED anstatt einer Laserdiode den Step-Up Konverter überflüssig machen und so den Stromverbrauch um 30% senken, da die LED ca. 15 -20 mA weniger Strom verbraucht als die Laserdiode und der Step-Up Konverter mit einer Energieeffizienz von nur ca. 85% wegfällt. Mit der Reduktion des Strombedarfs auf 70% des derzeitigen Bedarfs und einer Erhöhung der Batteriekapazität um 80% wird eine Steigerung der Betriebsdauer auf 20 Monaten möglich.

Verbesserung der Biokompatibilität der Aufbau- und Verbindungstechnik
Die Herstellung des Implantatprototyps ist bis zu diesem Zeitpunkt unter Zuhilfenahme von CNC-Fräsmaschinen erfolgt. Diese Fertigungstechnologie setzt einfache Geometrien der herzustellenden Teile voraus, wodurch die Gesamtzahl der Teile, aus denen der Sensor zusammengebaut werden muss, hoch ist. Mit Hilfe von Spritzgusstechnologien kann die Komplexität der Teile gesteigert und damit die Anzahl der Teile reduziert werden. Beispielsweise können die optischen Filter in die Spritzgussform eingesetzt werden, um diese durch Umspritzen direkt in die Messkammer zu integrieren. Durch die Reduktion der nötigen Teile fallen mehrer Verbindungsstellen weg. Die Verbindung der Teile wurde bisher durch Kleben realisiert. Da der Klebstoff aus Biokompatibilitätsgründen vermieden werden sollte, können bei gleichzeitiger Reduktion der Verbindungsstellen die PEEK-PEEK-Verbindungen mittels Laserschweißen hergestellt und auf den Klebstoff verzichtet werden. Denkbar ist zum Beispiel eine vollständige Hülle des Implantats aus PEEK-Halbschalen die abschließend laserverschweißt werden. So kann auch die Anzahl der verwendeten Materialien herabgesetzt werden. Eine zusätzliche Reduktion der Fremdkörperreaktion könnte dann durch die Titanisierung der PEEK-Hülle erfolgen [51].
Allerdings müssen bei einer geänderten Aufbautechnologie die Anforderungen des Assemblierungskonzepts beachtet werden.

7.2 Alternativer Sensoraufbau

Wie die Implantierversuche gezeigt haben, ruft die Größe des Implantats eine deutliche Fremdkörperreaktion hervor, die die Funktionalität des Sensors beeinträchtigen könnte. Zur Lösung dieses Problems unter Beibehaltung aller Komponenten des bisherigen

Implantats wird das Implantat in zwei kleinere Einheiten aufgeteilt. Die beiden Einheiten werden durch ein Kabel miteinander verbunden. Da der Großteil des Implantats aus Steuerungselektronik und Batterie besteht, der Sensorteil dagegen klein ist, wird hier die Trennung von Sensor auf der einen Seite und Stromversorgung und Steuerung auf der anderen Seite vorgenommen. Dies hat den Vorteil, dass der in Abbildung 7.1 gezeigte Sensorkopf aufgrund seiner geringeren Größe von 23 mm x 18 mm x 8 mm und Masse von 3,8 g eine kleinere Belastung für den Körper darstellt und so dieser Teil einer geringeren Fremdkörperreaktion ausgesetzt sein wird als das in Kapitel 6 vorgestellte Implantat. Dieses nicht aufgeteilte Implantat hier noch einmal zum Vergleich hat einen Durchmesser von 21 mm bei einer Läge von 69 mm und einem Gewicht von 26 g.

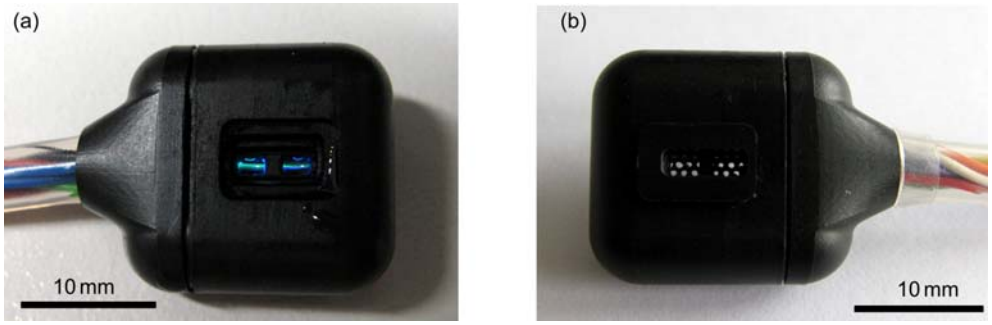


Abbildung 7.1: Sensorkopf mit einer Größe von 23 mm x 18 mm x 8 mm und einer Masse von 3,8 g.
(a) Sensorkopf mit fluoreszierendem Hydrogelwellenleiter. Die Fluoreszenz wird unverändert durch eine Laserdiode im Sensorkopf vor dem Wellenleiter angeregt. Die Spannungsversorgung erfolgt über eine separate Einheit die mit den Kabeln angeschlossen ist.
(b) Sensorkopf ohne Hydrogelwellenleiter mit aufgesetztem Membranträger.

Der Versorgungsteil nimmt etwas an Größe und Gewicht zu, 34 g bei einer Länge von 53 mm, einer Breite von 35 mm und Dicke von 26 mm. Dies liegt darin begründet, dass die Zylinderform der Hülle nicht bei behalten wird, sondern zur Verbesserung der Biokompatibilität eine linsen- und tropfenförmige Geometrie der PEEK-Hülle gewählt wird, die aufzunehmende Elektronik und Batterie aber in ihrer Zylinderform bestehen bleiben. Eine Fremdkörperreaktion und Verkapselung des Versorgungsteils stellt aber keine funktionelle Beeinträchtigung des Sensors dar, da hier keine Eindiffusion des Analyten in den Sensor stattfindet.
Weiter bietet diese Variante die Möglichkeit den Sensorkopf, statt subkutan, in einem flüssigkeitsgefüllten Raum wie zum Beispiel der Harnblase zu implantieren und so die fibröse Verkapselung des Sensorkopfes im Gewebe zu umgehen.
Die Hüllen beider Einheiten werden aus Invibio PEEK-MOTIS hergestellt, es wird kein Silikon zur Verkapselung mehr verwendet, sondern nur noch als Ummantelung und Dichtung des Verbindungskabels, siehe Abbildung 7.2. Das Assemblierungskonzept bleibt in ähnlicher Form wie in Abschnitt 6.2.6 vorgestellt bestehen, nur das Verbindungskabel zwischen Versorgungs- und Messeinheit wird zusätzlich benötigt.

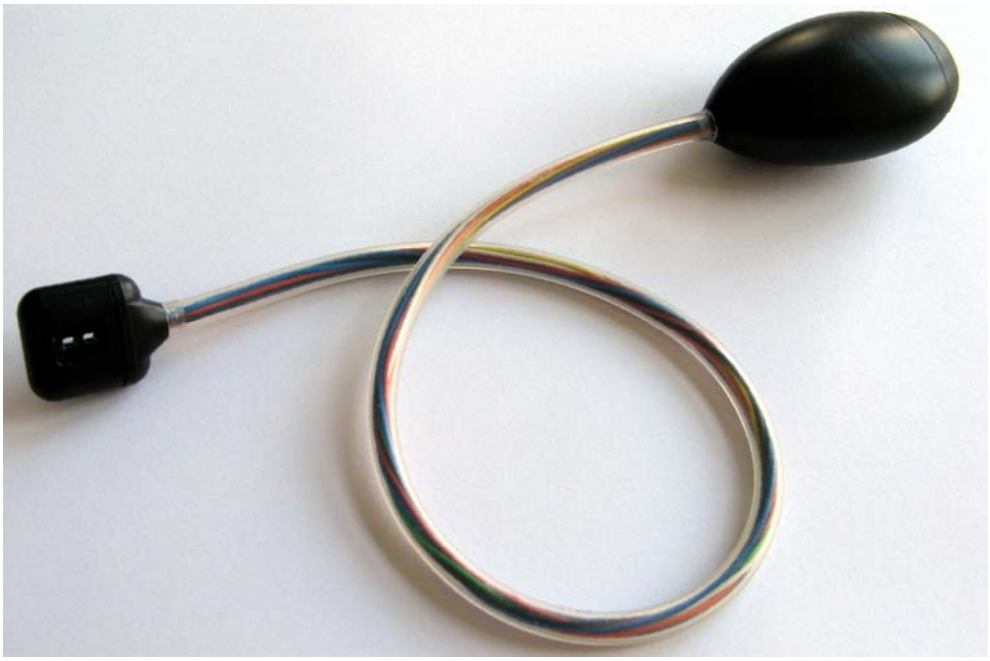


Abbildung 7.2: Zweigeteilte Sensorvariante mit einem kleinen Sensorkopf und einer über ein Kabel angeschlossenen Versorgungseinheit.

7.3 Glukosesensitives Protein

Die Anwendung des Systems zur Messung des Glukosespiegels von Diabetespatienten setzt ein glukosesensitives FRET-Protein voraus. Dazu wurde am IMBB ein neues Protein GBPfluoCFP12 basierend auf der bisherigen Struktur von CFP-GBP-YFP durch Mutation hergestellt. In Abbildung 7.3 ist die Antwort des mutierten Proteins GBPfluoCFP12 auf zwei Glukoselösungen mit 1 mM und 2 mM Glukose in künstlicher interstitieller Pufferlösung, aif (artificial interstitial fluid, Zusammensetzung siehe A.3), gezeigt. Man erkennt deutlich eine Zunahme des FRET-Verhältnisses bei diesen Glukosekonzentrationen. Dies stellt die prinzipielle Funktion des FRET-Proteins unter Beweiß. Allerdings sind diese Experimente bisher nur in Lösung erfolgreich durchgeführt worden. Der Transfer des Proteins in das Hydrogel am PISAS hat bis dato nicht funktioniert. Innerhalb des Hydrogels zeigt das Protein bisher keine Veränderung des Energietransfers in Abhängigkeit der Glukosekonzentration und ist in einem durch Glukose unveränderlichen Zustand immobilisiert. Die Experimente in Lösung weisen allerdings das Potential auf, mit diesem Protein Glukose auf Basis von Energietransfer nachweisen zu können. Deshalb sollte die Immobilisierung des Proteins in weiteren Experimenten optimiert werden, um auch im Hydrogel ein glukosesensitives FRET-Protein zu bekommen.

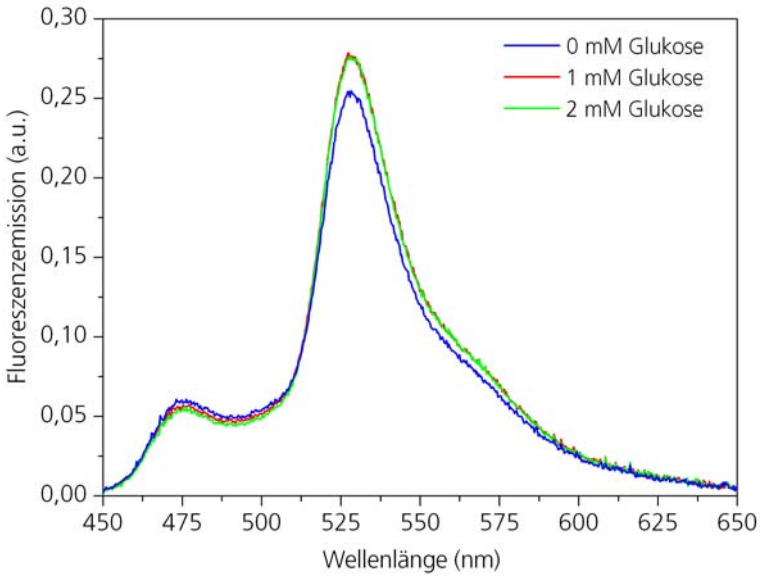


Abbildung 7.3: Antwort des glukosesensitiven FRET-Proteins GBPCFP12 in künstlicher interstitieller Lösung (aif) auf die verschiedenen Glukosekonzentrationen 0 mM, 1 mM, 2 mM, in der aif-Lösung. Das FRET-Verhältnis steigt mit zunehmender Glukosekonzentration an. D.h. der spektrale Anteil von CFP geht zurück wohingegen der Anteil von YFP ansteigt.

Anhang

A.1 Berechnungen

Bestimmung der Anzahl absorbierter Photonen pro Protein
Die Anzahl der absorbierten Photonen pro Protein N_{abs} hängt mit der Photonenflussdichte Φ, dem Absorptionsquerschnitt σ_{abs} der Proteine und der Bestrahlungsdauer T wie folgt zusammen:

$$N_{abs} = \Phi \sigma_{abs} T \qquad \text{A.1}$$

dabei gilt für die Photonenflussdichte an der Stelle l des Wellenleiters mit der Querschnittsfläche A [52]:

$$\Phi = \frac{P_0 e^{-\alpha l} \lambda}{Ahc}, \; mit \; [\alpha] = 1/cm \qquad \text{A.2}$$

P_0 stellt dabei die eingangs in den Wellenleiter eingekoppelte Laserleistung mit der Anregungswellenlänge λ dar. Diese nimmt exponentiell mit der Länge l des Wellenleiters ab. α entspricht dem Dämpfungskoeffizient des Hydrogels ermittelt durch die Verlustmessungen. h steht für das Plancksche Wirkungsquantum und c für die Lichtgeschwindigkeit.

Bestimmung des Reflexionswinkels θ_R innerhalb des Hydrogelwellenleiters
Für die numerische Apertur (NA) der Glasfaser gilt [31]:

$$NA = \sin\alpha \; n_{Hydrogel} \qquad \text{A.3}$$

dabei entspricht α dem halben Öffnungswinkel des Strahlenbündels das die Glasfaser verlässt und $n_{Hydrogel}$ dem Brechungsindex des Hydrogels. Aus der numerischen Apertur der Glasfaser, siehe Gleichung A.3, ergibt sich ein halber Öffnungswinkel α des Strahlenbündels im Hydrogel von:

$$\alpha = \arcsin\left(\frac{NA}{n_{Hydrogel}}\right) \qquad \text{A.4}$$

für den Reflektionswinkel, siehe Abbildung 5.2, folgt damit:

$$\theta_R = 90° - \alpha \qquad \text{A.5}$$

Fourier- und Besselentwicklung
Die Entwicklung wird durchgeführt indem man die Gleichung A.6, resultierend aus den Gleichungen 5.12 und 5.13,

$$C_0 = \sum_{n=1}^{\infty} A_n J_0(j_{0n}\frac{r}{R}) \qquad \textbf{A.6}$$

auf beiden Seiten mit $rJ_0(j_{0m}r/R)$ multipliziert und über den Orthogonalitätsbereich $0 \le r \le R$ integriert:

$$C_0 \int_0^R rJ_0(j_{0m}\frac{r}{R})dr = \sum_{n=1}^{\infty} A_n \int_0^R rJ_0(j_{0n}\frac{r}{R})J_0(j_{0m}\frac{r}{R})dr, \qquad \textbf{A.7}$$

daraus ergibt sich, siehe [53]:

$$C_0 \frac{R^2}{j_{0m}} J_1(j_{0m}) = \frac{1}{2}R^2 J_1^2(j_{0m})A_m \qquad \textbf{A.8}$$

womit die Koeffizienten A_n bestimmt sind.

A.2 Herstellung der Hydrogelwellenleiter

Silikagel
Verwendete Chemikalien:

Tetraethylorthosilikat (TEOS)
Methanol
HCl
Glycerol
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)
Millipore-Wasser

Herstellungsprozess:
Das Silikahydrogel wird nach der Methode von Gill [24] hergestellt. Es wird eine Lösung bestehend aus 12,4 ml TEOS, 5,6 ml Methanol und 1 ml 0,6 M HCl bei 0 °C für 20 Minuten gerührt. Dann werden 4,1 ml Glycerol hinzugefügt, die Lösung für 1,5 h gerührt und auf 25 °C erwärmt. Weiter wird die Lösung auf 60 °C - 70 °C aufgeheizt und erneut für 40 Stunden gerührt. Nach dem Verdampfen des Alkohols entsteht Polyglyceryl-Silikat-Sol (PGS).
PGS wird nun in einem Volumenverhältnis von 1:1 mit Wasser gemischt und für 15 Minuten im Ultraschallbad homogenisiert. Abschließend wird diese Lösung in einem

Volumenverhältnis von 1:2 mit TRIS-Puffer (50 mM, pH 8) verdünnt und in die Wellenleiterform zum Auspolymerisieren gefüllt. Das dauert ca. 1 - 1,5 Stunden.

Alginatgel
Verwendete Chemikalien:

Protanal LF 10/60 (Alginat)	von FMC Biopolymer Norwegen
D-Glukono-δ-Lakton (GDL)	
$CaCO_3$	
$BaCl_2 \cdot 2H_2O$	
Millipore-Wasser	

Herstellungsprozess:
Die Alginatgele werden mit 4 Gew.-% Polymeranteil hergestellt. Dazu werden 0,508 g Alginat in 9,75 ml Wasser für 2 - 3 Stunden eingerührt. 3,6 g dieser Lösung werden mit 8 mg $CaCO_3$, gelöst in 200 µl Wasser, gemischt. Nach einer Minute rühren werden 21 mg GDL, gelöst in 200 µl Wasser, hinzugegeben. Diese Lösung wird ca. 10 Sekunden gerührt und darauf folgend in die Wellenleiterformen gefüllt. Der erste Gelprozess ist nach 20 Stunden bei 4 °C abgeschlossen. Ein abschließender Prozessschritt erfolgt, indem die Hydrogele für 1 – 2 Stunden in eine 15 mM konzentrierte Bariumlösung getaucht werden.

Synthetisches Gel
Verwendete Chemikalien:

N-(3-sulfopropyl)-*N*-(methacryloxyethyl)-*N*,*N*-dimethylammonium-betain (SMADB)	Aldrich 97%
N,*N*-bis(methacryloxyethyl)-*N*-methyl-*N*-(3-sulfopropyl)-ammonium-betain	Crosslinker synthetisiert am PISAS
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	
Tetramethylethylendiamin (TMEDA)	
CFP, bzw. YFP oder GBPFluo1	Hergestellt am IMBB
Millipore-Wasser (desoxygeniert)	

Herstellungsprozess:
Es werden 480 µl einer wässrigen Lösung mit SMADB, in einer Konzentration von 558 mg/ml und dem Crosslinker, 8 mg/ml, unter Rühren hergestellt und für 10 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt. Dann werden 50 µl einer TRIS-Lösung (pH 8, 50 mM) und 40 µl einer 0,22 M APS-Lösung als Initiator des Gelprozesses hinzugegeben. Diese Lösung wird erneut 5 Minuten gerührt, um eine homogene Mischung zu erhalten. Anschließend wird der Katalysator TMEDA und gegebenenfalls das entsprechende Protein GBPfluo1, CFP, oder YFP in der Konzentration entsprechend des Experiments hinzugegeben.

Diese Lösung wird dann zum Auspolymerisieren in die Form, eine Küvette oder Wellenleiterform, gefüllt. Das Auspolymerisieren erfolgt unter Sauerstoffausschluss in 1 - 1,5 Stunden.

A.3 Messlösungen

Zur Messung der Proteine in Lösung und im Hydrogelwellenleiter werden zwei verschiedene Puffer verwendet. Für alle Experimente durchgeführt mit dem Sensorprotein GBPfluo1 wird der TRIS-Puffer benutzt. Er besteht aus:

50 mM	Tris(hydroxymethyl)-aminometan (TRIS)	pH 8,0 eingestellt mit HCl
	$CaCl_2$	Konz. angegeben beim Experiment

Für den Ansatz des Puffers wird Analysewasser von Merck verwendet.
Die Experimente zur Bestimmung der Glukosesensitivität der Proteine GBPfluoCFP12 werden in künstlicher interstitieller Flüssigkeit, aif („artificial interstitial fluid"), durchgeführt. Der Puffer setzt sich zusammen aus:

10 mM	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	pH 7,4 eingestellt mit HCl
122	NaCl	
25 mM	$NaHCO_3$	
3 mM	KCl	
1,2 mM	$CaCl_2$	
1,2 mM	$MgCl_2$	
0,5 mM	K_2HPO_4	
	Glukose	Konz. angegeben beim Experiment

Der aif-Puffer wird mit Millipore-Wasser angesetzt.

A.4 Implantierversuche

Die Materialien, die die Hülle des Implantats bilden, kommen mit dem Gewebe in Berührung. Sie werden in den Implantierversuchen am MEIR Hospital in Kfar Sava Israel auf ihre Biokompatibilität untersucht. Zudem wird die gesamte Hülle in ihrer späteren Form implantiert, um auch den Einfluss der Form, der Größe und der Materialkombination des Implantats in den Untersuchungen zu berücksichtigen.

Implantation der Materialien
Die Versuche werden mit 8 Wochen alten, 250 g schweren, männlichen Sprague Dawley Ratten durchgeführt. Zur Implantation werden die Tiere mit 0,3 - 0,5 ml einer Lösung, bestehend zu 85% aus einer 100 mg/ml konzentrierten Ketaminlösung und zu 15% aus einer 2%-igen Xylazinlösung, intraperitoneal gespritzt betäubt. Implantiert werden die in Abschnitt 6.1 beschriebenen Proben. Sie haben eine Größe von 4 - 5 mm und eine Dicke von 1 mm. Pro Versuchstier werden 4 Proben durch kleine Einschnitte

unter der Haut am Rücken der Tiere eingesetzt und mit 1 - 2 Stichen vernäht. Kontrolltiere erhalten ebenso die Einschnitte und die Nähte, aber keine Implantate.
Weiter erhalten die Tiere eine immunosuppressive Behandlung für 18 Tage mit Ciclosporin A in einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht innerhalb der ersten neun Tage und 5 mg/ kg Körpergewicht in den zweiten neun Tagen [54].

Explantation und Auswertung

Zur Explantation werden die Versuchstiere betäubt und durch eine Herzpunktion getötet. Die explantierten Materialien werden einer Sichtprüfung auf Degradation und Adhäsion unterzogen. Ebenso wird die Erscheinung des Gewebes auf Rötung und Infiltration geprüft. Vom Gewebe in Berührung mit den Implantaten werden histologische Schnitte angefertigt und eine Hämatoxylin-Eosin Färbung durchgeführt. Die Untersuchung der CRP-Werte lieferte keine signifikanten Ergebnisse. Die wesentlichen Ergebnisse werden für die einzelnen Materialien dargestellt.

Literaturverzeichnis

1. J.C. Pickup, F. Hussain, N.D. Evans, O.J. Rolinski, and D.J.S. Birch, "Fluorescence-based glucose sensors: 20th Anniversary of Biosensors and Bioelectronics", *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, no. 12, pp. 2555–2565.
2. T. Förster, C. Strohhöfer, "Wellenleiterkern und Biosensor“, Patent DE. 102008007823, Feb. 7, 2008.
3. T. Förster, C. Strohhöfer, K. Bock, P. Kasak, M. Danko, Z. Kronekova, T. Nedelcev, I. Krupa, and I. Lacik, "Biosensor for calcium based on a hydrogel optical waveguide with integrated sensor proteins: Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Conference, 2009. TRANSDUCERS 2009. International", *Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Conference, 2009. TRANSDUCERS 2009. International*, pp. 1218–1221.
4. J. Adrian, S. Pasche, J.-M. Diserens, F. Sánchez-Baeza, H. Gao, M.P. Marco, and G. Voirin, "Waveguide interrogated optical immunosensor (WIOS) for detection of sulfonamide antibiotics in milk", *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, no. 11, pp. 3340–3346.
5. J.P. Golden, G.P. Anderson, S.Y. Rabbany, and F.S. Ligler, "An evanescent wave biosensor. II. Fluorescent signal acquisition from tapered fiber optic probes : An evanescent wave biosensor. II. Fluorescent signal acquisition from tapered fiber optic probes: Biomedical Engineering, IEEE Transactions on", *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, vol. 41, no. 6, pp. 585–591.
6. J. Dostálek, J. Ctyroký, J. Homola, E. Brynda, M. Skalský, P. Nekvindová, J. Spirková, J. Skvor, and J. Schröfel, "Surface plasmon resonance biosensor based on integrated optical waveguide", *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 76, no. 1-3, pp. 8–12.
7. R.J. Schechter, "Snell's law: Optimum pathway analysis", *Survey of Ophthalmology*, vol. 21, no. 6, pp. 464–466.
8. P.V. Lambeck, "Integrated opto-chemical sensors", *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 8, no. 1, pp. 103–116.
9. A.S. Hoffman, "Hydrogels for biomedical applications", *ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS*, vol. 54, no. 1, pp. 3–12.
10. A. Bourgeois, A. Brunet Bruneau, S. Fisson, B. Demarets, D. Grosso, F. Cagnol, C. Sanchez, and J. Rivory, "Determination of pore size distribution in thin organized mesoporous silica films by spectroscopic ellipsometry in the visible and infrared range: Proceedings of the 30th International Conference on Metallurgical Coatings and Thin Films", *Thin Solid Films*, vol. 447-448, pp. 46–50.
11. Ó. Esteban, F. Marvá, and J.C. Martínez-Antón, "Optical constants of a sodium alginate polymer in the UV-vis range", *Optical Materials*, vol. 31, no. 4, pp. 696–699.

12. A.F. Jalbout, and T. Jiang, "Refractive indices for various co-polymer mixtures of styrene, acrylonitrile, and methyl methacrylate", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 58, no. 12, pp. 2647–2649.

13. Miguel F. Refojo, "Glyceryl methacrylate hydrogels", *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 9, no. 9, pp. 3161–3170.

14. F. Khan, L. Gnudi, and J.C. Pickup, "Fluorescence-based sensing of glucose using engineered glucose/galactose-binding protein: A comparison of fluorescence resonance energy transfer and environmentally sensitive dye labelling strategies", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 365, no. 1, pp. 102–106.

15. Th. Förster, "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz", *Annalen der Physik*, vol. 437, no. 1-2, pp. 55–75.

16. B.T. Dye, "Flow cytometric analysis of CFP-YFP FRET as a marker for in vivo protein-protein interaction", *Clinical and Applied Immunology Reviews*, vol. 5, no. 5, pp. 307–324.

17. C. Berney, G. Danuser, "FRET or No FRET: A Quantitative Comparison", *Biophysical Journal*, vol. 84, no. 6, pp. 3992–4010.

18. G.H. Patterson, D.W. Piston, and B.G. Barisas, "Förster Distances between Green Fluorescent Protein Pairs", *Analytical Biochemistry*, vol. 284, no. 2, pp. 438–440.

19. M.J. Borrok, Y. Zhu, K.T. Forest, and L.L. Kiessling, "Structure-Based Design of a Periplasmic Binding Protein Antagonist that Prevents Domain Closure", *ACS Chemical Biology*, vol. 4, no. 6, pp. 447–456.

20. T. Kogure, H. Kawano, Y. Abe, and A. Miyawaki, "Fluorescence imaging using a fluorescent protein with a large Stokes shift: Visualization of molecular processes in cells using fluorescence imaging", *Methods*, vol. 45, no. 3, pp. 223–226.

21. M. Gerritsen, A. Kros, V. Sprakel, J.A. Lutterman, R.J.M. Nolte, and J.A. Jansen, "Biocompatibility evaluation of sol-gel coatings for subcutaneously implantable glucose sensors", *Biomaterials*, vol. 21, no. 1, pp. 71–78.

22. G. Klöck, A. Pfeffermann, C. Ryser, P. Gröhn, B. Kuttler, H.-J. Hahn, and U. Zimmermann, "Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginates", *Biomaterials*, vol. 18, no. 10, pp. 707–713.

23. Z. Zhang, T. Chao, L. Liu, G. Cheng, B.D. Ratner, and S. Jiang, "Zwitterionic Hydrogels: an in Vivo Implantation Study", *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 20, pp. 1845–1859.

24. I. Gill, and A. Ballesteros, "Encapsulation of Biologicals within Silicate, Siloxane, and Hybrid Solâˆ'Gel Polymers: An Efficient and Generic Approach", *Journal of the American Chemical Society*, vol. 120, no. 34, pp. 8587–8598.

25. H. Zimmermann, D. Zimmermann, R. Reuss, P.J. Feilen, B. Manz, A. Katsen, M. Weber, F.R. Ihmig, F. Ehrhart, P. Geßner, M. Behringer, A. Steinbach, L.H. Wegner, V.L. Sukhorukov, J.A. Vásquez, S. Schneider, M.M. Weber, F. Volke, R. Wolf, and U. Zimmermann, "Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 16, no. 6, pp. 491–501.

26. K.I. Draget, K. Østgaard, and O. Smidsrød, "Alginate-based solid media for plant tissue culture", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 31, no. 1, pp. 79–83.
27. Z. Zhang, T. Chao, and S. Jiang, "Physical, Chemical, and Chemicalâ˜Physical Double Network of Zwitterionic Hydrogels", *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 112, no. 17, pp. 5327–5332.
28. Ö. Pekcan, and S. Kara, "In situ monitoring of energy release in real time during gelation of acrylamide (AAm)", *Polymer*, vol. 42, no. 17, pp. 7411–7417.
29. H. G. O. Becker, *Einführung in die Photochemie.* 3rd ed. Berlin: Deutscher Verlag der Wissenschaften, 1991.
30. H. Horvath, "Experimental investigation on the validity of the Lambert-Beer law at high particle concentrations: Sixteenth Annual Conference of the Gesellschaft fur Aerosolforschung", *Journal of Aerosol Science*, vol. 19, no. 7, pp. 837–840.
31. H. Stöcker, "*Taschenbuch der Physik".* 4th ed. Frankfurt am Main: Verlag Harri Deutsch, 2000.
32. D.J. Segelstein, *The complex refractive index of water*, Thesis (M.S.), 1981.
33. P. Labeye, "Cours d'optique guidée". Grenoble: ENSPG - Ecole Nationale Supérieure de Physique de Grenoble, 1995.
34. J.D. Ingle Jr., S.R. Crouch, "*Spectrochemical analysis"*, Prentice Hall New Jersey 1988 (ISBN 0-13-826876-2) xv +. 590 pp.
35. B. Herman, P. Wodnicki, S. Kwon, A. Periasamy, G. Gordon, N. Mahajan, and X. Wang, "Recent developments in monitoring calcium and protein interactions in cells using fluorescence lifetime microscopy", *Journal of Fluorescence*, vol. 7, no. 1, pp. 85–91.
36. W. Schröter, K.H. Lautenschläger, A. Wanninger, "*Taschenbuch der Chemie".* 20th ed. D-60486 Frankfurt am Main: Verlag Harri Deutsch GmbH, 2005.
37. A.S. Politou, R. Spadaccini, C. Joseph, B. Brannetti, R. Guerrini, M. Helmer-Citterich, S. Salvadori, P.A. Temussi, and A. Pastore, "The SH3 domain of nebulin binds selectively to type II peptides: theoretical prediction and experimental validation", *Journal of Molecular Biology*, vol. 316, no. 2, pp. 305–315.
38. M.R. Eftink, "[11] Fluorescence methods for studying equilibrium macromolecule-ligand interactions", in *Methods in Enzymology : Flourescence Spectroscopy*, Ludwig Brand and Michael L. Johnson, Ed.: Academic Press, 1997, pp. 221–257.
39. L. Greenbaum, C. Rothmann, R. Lavie, and Z. Malik, "Green Fluorescent Protein Photobleaching: a Model for Protein Damage by Endogenous and Exogenous Singlet Oxygen", *Biological Chemistry*, vol. 381, no. 12, pp. 1251–1258.
40. Laser Components, "Specialty mulitmode step index fiber - Specification sheet launch fiber".
41. Sanyo, "Blue-violet laser diode DL-4146-101S - Specification Sheet".
42. Vishay Semiconductors, "TEMT6000 Ambient Light Sensor - Specification sheet".
43. Osram, "Silicon NPN Phototransistor SFH 3204 - Specification Sheet".

44. A. Polson, "Untersuchungen über die Diffusionskonstanten der Proteine", *Colloid & Polymer Science*, vol. 87, no. 2, pp. 149–181.

45. Y.H. Sniekers, and C.C. van Donkelaar, "Determining Diffusion Coefficients in Inhomogeneous Tissues Using Fluorescence Recovery after Photobleaching", *Biophysical Journal*, vol. 89, no. 2, pp. 1302–1307.

46. S.W. Ha, and E. Wintermantel, "Biokompatible Metalle", in *Medizintechnik*, 2009, pp. 191–217.

47. S.W. Ha, E. Wintermantel, and G. Maier, "Biokompatible Polymere", in *Medizintechnik*, 2009, pp. 219–276.

48. S.W. Ha, M. Koller, and G. Göllner, "Sterilisation", in *Medizintechnik Life Science Engineering*, 2008, pp. 105–117.

49. P. Valdastri, E. Susilo, T. Förster, C. Strohhöfer, A. Menciassia, and P. Dario, "Wireless implantable electronic platform for blood glucose level monitoring: Proceedings of the Eurosensors XXIII conference", *Procedia Chemistry*, vol. 1, no. 1, pp. 1255–1258.

50. ICNIRP Guidelines, "Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic and electromagnetic fields (up to 300 GHz)", Health Physics Society 1998.

51. F. Breme, V. Güther, and K.-U. van Osten, "Composite material", Patent EP0897997, Aug. 21, 1998.

52. E. Hecht, *Optik.* 4th ed.: Oldenburg, 2005.

53. H. Henke, *Elektromagnetische Felder: Theorie und Anwendung.* 3rd ed.: Springer, 2007.

54. M. Figliuzzi, T. Plati, R. Cornolti, F. Adobati, A. Fagiani, L. Rossi, G. Remuzzi, and A. Remuzzi, "Biocompatibility and function of microencapsulated pancreatic islets", *Acta Biomaterialia*, vol. 2, no. 2, pp. 221–227.

Danksagung

An dieser Stelle danke ich all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Professor Dr. Karlheinz Bock für die Möglichkeit zur freien und eigenständigen Bearbeitung des Themas und für seine Gesprächsbereitschaft.

Professor Dr. Erich Wintermantel für seine wertvollen Anregungen.

Dr. Christof Strohhöfer für seine intensive Betreuung der Arbeit, als Diskussionspartner und Ratgeber sowie für das Korrekturlesen.

Dr. Igor Lacik und seiner Gruppe für die Herstellung der Hydrogele, insbesondere *Dr. Peter Kasak* für die Herstellung der synthetischen Hydrogele und der damit verbundenen sehr guten Zusammenarbeit.

Dr. Pietro Valdastri für die Bereitstellung der Steuerungselektronik inklusive Software.

Professor Dr. Tassos Economou für die Bereitstellung der Sensorproteine.

Den Werkstudenten, *Benjamin Eckmanns*, *Astrid Ziegler*, *Sarah Bardakji*, *Stephan Lüke*, die die Arbeit unterstützt und mit ihren Ideen bereichert haben.

Den Kollegen *Dieter Hemmetzberger* und *Horst Hengelmann*, für die Unterstützung bei der Entwicklung und Herstellung der Detektorelektronik.

Dem Werkstattteam für die Herstellung diverser Teile für den Sensordemonstrator und das Implantat.

Den Kollegen des IZM, die mit Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft ein angenehmes Arbeitsumfeld gestaltet haben.

Der Europäischen Kommission für die Unterstützung des EU-Projekts P.Cezanne (EU/IST-2006-031867) in dessen Rahmen diese Arbeit entstanden ist.

Meiner Familie und meinen Freunden für ihr Verständnis und ihre moralische Unterstützung.