

Screening auf Rückstände von  
 $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Milch:  
Entwicklung eines optischen Biosensor-Assays  
mit Penicillin-bindenden Proteinen

Dem Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften  
der Bergischen Universität Wuppertal  
zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegte Dissertation

von

Giuseppe Cacciatore

Wuppertal

2005

Diese Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20050138

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20050138>]

## ABSTRACT

A biospecific interaction assay (BIA) for the detection of residues of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk was developed using a surface plasmon resonance (SPR) biosensor. Penicillin-binding proteins (PBP), which are enzymes involved in the final stages of murein biosynthesis and represent the lethal target of  $\beta$ -lactam antibiotics, were used as biomolecular recognition partners for penicillins and cephalosporins.

PBP were mixed with samples, incubated and then labelled with an antigen-tagged ampicillin-derivative prior to SPR analysis with antibodies against the antigen-tag immobilised on the sensor chip. PBP complexed exclusively antigen-tagged ampicillin in samples without residues (negative samples). In samples containing residues (positive samples), PBP complexed  $\beta$ -lactam antibiotics before they complexed antigen-tagged ampicillin. A certain ratio of antigen-tagged ampicillin complexed by PBP and as free compound was formed in intermediate situations reflecting the presence or absence of residues of  $\beta$ -lactam antibiotics in positive or negative samples, respectively. The immobilised antibodies captured antigen-tagged ampicillin complexed by the PBP or as free compound. The large difference in molecular mass at  $> 40$  kDa for antigen-tagged ampicillin complexed by PBP and at  $< 1$  kDa for antigen-tagged ampicillin as free compound led to a ratio dependent biosensor response since SPR signal is affected by the molecular masses of binding molecules. Consequently, the response was inversely related to the concentration of  $\beta$ -lactam antibiotics in the sample.

In order to detect residues of  $\beta$ -lactam antibiotics at concentrations corresponding to maximum residue limits (MRL) set by the European Union, a suitable PBP, an antigen-tagged ampicillin-derivative and an antibody against the antigen had to be found. PBP of *Streptococcus thermophilus* and *Bacillus stearothermophilus* were partly purified by ampicillin affinity chromatography and a soluble derivative of PBP 2x of *Streptococcus pneumoniae* was expressed as a recombinant protein in *Escherichia coli*. This soluble PBP 2x-derivative, called PBP 2x\*, had higher affinities towards different  $\beta$ -lactam antibiotics than the other studied PBP and was chosen for construction of the  $\beta$ -lactam-specific BIA.

Ampicillin (AMPI) was labelled with derivatives of digoxigenin (DIG), fluorescein (FLU) or 2,4-dinitrophenol (DNP). DIG, FLU and DNP were coupled through their activated *N*-hydroxysuccinimide esters to the amino group of AMPI, yielding DIG-labelled AMPI (DIG-AMPI), FLU-labelled AMPI (FLU-AMPI) and DNP-labelled AMPI (DNP-AMPI), respectively. DIG-AMPI, FLU-AMPI and DNP-AMPI were examined as antigen-tagged ampicillin-derivatives.

The formed complexes of these ampicillin-derivatives with PBP 2x\* were analysed by SPR analysis using their corresponding counter antibodies. Despite the binding of DNP-labelled bovine serum albumin, SPR analysis revealed that DNP-AMPI being complexed by PBP 2x\* was not bound neither by a polyclonal anti-DNP antibody nor by a monoclonal anti-DNP antibody in a reproducible manner. On the other hand, anti-FLU antibodies possessed insufficient affinity for FLU-AMPI. Of the monoclonal and polyclonal antibodies against DIG tested, the monoclonal antibody was chosen, since regeneration of the sensor-chip surface containing immobilised polyclonal antibody was not complete.

Benzylpenicillin, ampicillin, amoxicillin, cloxacillin, cephalexin and cefoperazone could be detected in commingled raw milk at concentrations below their respective MRL using PBP 2x\*, DIG-AMPI and the monoclonal antibody against DIG for SPR analysis of milk samples. As part of the sample preparation, commingled raw milk samples were defatted prior to addition of PBP 2x\* and DIG-AMPI. The SPR analysis of 20 raw milk samples from individual cows confirmed that matrix interferences are a critical point in BIAs as non-specific binding of matrix components to the sensor chip elevated the detection limit dramatically. Matrix interferences could be reduced to a lower and a more constant level by a heat treatment step and the addition of carboxymethylated dextran to the samples. With this additional sample preparation, individual samples containing benzylpenicillin at the MRL were identified as positive. The limit of detection of benzylpenicillin in individual raw milk samples was 2 ng/ml. Thus, the assay could be the basis for a screening test for routine use.

## DANK

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juli 2000 bis September 2004 an der Bergischen Universität Wuppertal im Fachgebiet Lebensmittelchemie des Fachbereichs Mathematik und Naturwissenschaften in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Michael Petz.

Herrn Prof. Dr. Michael Petz gilt mein besonderer Dank für die interessante Aufgabenstellung, sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und die gewährten Freiheiten bei der Durchführung.

Herrn Prof. Dr. Helmut Guth danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Ebenso nachdrücklich bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck für die Bereitstellung des Stamms zur Expression von PBP 2x\*. Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Reinhold Brückner und Herrn Dipl.-Biol. Jens Rutschmann für die vielen praktischen Tipps bei der Isolierung des PBP 2x\*.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Aldert A. Bergwerff, Frau Gertie C.A.M. Bokken und Frau Betty G.M. Jongerius-Gortemaker für die angenehme Arbeitsatmosphäre während mehrerer Forschungsaufenthalte an der Universität Utrecht, viele konstruktive Diskussionen und hilfreiche Anregungen bei der Durchführung der Biosensor-Messungen.

Herrn Dipl.-Chem. Marc Constapel und Herrn Dipl.-Chem. Marc Schellenträger danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Messungen.

Frau Lebensmittelchemikerin Ute Rettinger, Frau Lebensmittelchemikerin Katrin Keppler und Frau Dr. Elena Smouchkina danke ich für ihre im Rahmen von Forschungspraktika geleistete Mitarbeit.

Meinen Kolleginnen und Kollegen danke ich für das freundliche Arbeitsklima, in der diese Arbeit entstanden ist. Frau Dr. Erika Müller-Seitz und Herrn Dr. Joachim Schlösser danke ich herzlich für die vielen wertvollen Diskussionen.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir meine Ausbildung ermöglicht haben und mich immer unterstützt haben, wann immer es die Umstände erforderten.

Schließlich danke ich Frau Susanne Scherer sehr herzlich für ihre stete Geduld.

*Für Giuseppa und Antonino*

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Penicilline und Cephalosporine</b> .....	<b>3</b>
2.1	Strukturen .....	3
2.2	Reaktivität des $\beta$ -Lactam-Ringes .....	7
2.2.1	Chemische Abbaureaktionen.....	8
2.3	Wirkungsmechanismus.....	11
2.3.1	Murein-Biosynthese.....	13
2.3.2	DD-Transpeptidasen, Target der $\beta$ -Lactam-Antibiotika .....	14
2.4	Penicillin-bindende Proteine (PBP) .....	17
2.5	Resistenz.....	19
2.5.1	$\beta$ -Lactamasen.....	19
2.5.2	PBP mit geringer Affinität gegenüber $\beta$ -Lactam-Antibiotika.....	20
2.5.3	Therapiemaßnahmen gegen $\beta$ -Lactamase-produzierende Bakterien .....	20
2.6	Einsatz in der Veterinärmedizin.....	20
2.6.1	Pharmakokinetik und Metabolismus .....	21
2.6.2	Toxizität und allergische Reaktionen .....	21
2.6.3	Rechtliche Regelungen für Tierarzneimittelrückstände .....	22
<b>3</b>	<b>Analytik von <math>\beta</math>-Lactam-Antibiotika-Rückständen</b> .....	<b>24</b>
3.1	Screening-Verfahren.....	24
3.1.1	Mikrobiologische Hemmstofftests .....	24
3.1.2	Immunchemische Tests.....	25
3.1.3	Tests mit PBP.....	27
3.1.4	Tests mit $\beta$ -Lactamasen .....	29
3.1.5	Vorteile von Screening-Tests.....	29
3.2	Chemisch-physikalische Analysenverfahren .....	29
3.2.1	Probenvorbereitung .....	30
3.2.2	LC-Verfahren mit massenspektrometrischer Detektion (LC/MS).....	31
<b>4</b>	<b>Biosensor-Analysen</b> .....	<b>32</b>
4.1	Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Biosensoren (SPR-Biosensoren).....	32
4.1.1	Grundlagen der SPR .....	32
4.1.2	Aufbau eines SPR-Biosensors.....	35
4.1.3	Detektionsprinzip .....	36
4.1.4	Sensor-Chips.....	37
4.1.5	Mikrofluides System .....	38

4.1.6	Biomolekulare Interaktionsanalyse .....	38
4.1.7	SPR-Biosensoren in der Lebensmittel- und Rückstandsanalytik.....	39
4.1.8	SPR-Biosensor-Assays für $\beta$ -Lactam-Antibiotika .....	43
<b>5</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>48</b>
6.1	Indirekter SPR-Biosensor-Assay zum Nachweis von $\beta$ -Lactam-Antibiotika-Rückständen .....	48
6.2	Isolierung, Synthese und Charakterisierung der essentiellen Komponenten .....	50
6.3	PBP .....	50
6.3.1	DD-Carboxypeptidasen aus <i>Streptococcus thermophilus</i> und <i>Bacillus stearothermophilus</i> .....	50
6.3.2	Literaturrecherche: $k_2/K$ -Werte.....	55
6.3.3	PBP 2x* aus <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	58
6.3.4	Markermolekül-markiertes $\beta$ -Lactam-Antibiotikum .....	62
6.3.5	Digoxigenin-, Dinitrophenyl- und Fluorescein-markierte Ampicilline .....	62
6.3.6	Charakterisierung der markierten Ampicilline: Interaktion mit PBP 2x* .....	63
6.4	Entwicklung des $\beta$ -Lactam-Antibiotika-spezifischen SPR-Biosensor-Assays.....	66
6.4.1	Markermolekül-spezifische Antikörper .....	66
6.4.2	Regenerierung des Sensor-Chips.....	67
6.4.3	Orientierende Voruntersuchungen.....	70
6.4.4	Nachweis von $\beta$ -Lactam-Antibiotika mit PBP 2x*, Digoxigenin-markiertem Ampicillin und monoklonalen Digoxigenin-spezifischen Antikörpern .....	73
6.4.5	Nachweis von $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Vollmilch und Rohmilch.....	82
6.4.6	Analyse von individuellen Rohmilch-Proben .....	89
6.4.7	Simulierte Feldstudie .....	93
6.4.8	Stabilität des Sensor-Chips .....	95
<b>7</b>	<b>Schlussbetrachtung und Ausblick.....</b>	<b>96</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>99</b>
<b>9</b>	<b>Arbeitsvorschriften .....</b>	<b>101</b>
9.1	Partielle Aufreinigung der DD-Carboxypeptidasen .....	101
9.1.1	DD-Carboxypeptidase-Aktivitäts-Assays .....	104
9.2	Expression und Aufreinigung von PBP 2x* .....	109
9.2.1	Bocillin FL-Assay .....	112
9.3	Markierung von Ampicillin .....	115

9.3.1	Fluorescein-markiertes Ampicillin .....	116
9.3.2	Digoxigenin-markiertes Ampicillin .....	117
9.3.3	Dinitrophenyl-markiertes Ampicillin .....	118
9.3.4	Massenspektrometrische Analysen .....	119
9.4	SPR-Biosensor-Analysen.....	120
9.4.1	Immobilisierung der Antikörper .....	121
9.4.2	Ermittlung der Regenerierungsbedingungen.....	122
9.4.3	Schachbretttitrationen.....	123
9.4.4	Nachweis von $\beta$ -Lactam-Antibiotika.....	123
9.4.5	Voruntersuchungen und Optimierung .....	123
9.4.6	Dotierung der Milch-Proben .....	124
9.4.7	Analyse von Vollmilch.....	124
9.4.8	Analyse von Rohmilch .....	124
9.4.9	Analyse von Rohmilch einzelner Kühe.....	125
9.5	Verwendete Software.....	125
<b>ANHANG.....</b>		<b>126</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>		<b>128</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>		<b>130</b>



## 1 Einleitung

Landwirtschaftliche Nutztiere erkranken häufig an Infektionen des Gastrointestinaltraktes, der Atemwege und der Milchdrüsen, wobei bakterielle Infektionen mit Antibiotika\* behandelt werden<sup>1</sup>. Weitere Gründe, die den Einsatz von Antibiotika in der Nutztierhaltung erforderlich machen, sind die Verhinderung der Ausbreitung von Krankheiten, die Vermeidung der Übertragung von Zoonosen auf den Menschen und die Gewinnung qualitativ hochwertiger Lebensmittel. Darüber hinaus sind vier Antibiotika als Futter-Zusatzstoff zur allgemeinen Leistungsförderung bei gesunden Tieren zugelassen<sup>2</sup>. Die Verwendung von Antibiotika als Leistungsförderer wird jedoch ab Januar 2006 verboten<sup>3</sup>.

Die Behandlung von lebensmittelliefernden Tieren mit Antibiotika führt zur Bildung von Rückständen der verabreichten Wirkstoffe oder ihrer Metabolite in essbaren Geweben und Produkten, die von diesen Tieren gewonnen werden, wie Milch, Eier und Honig. Rückstände von Antibiotika in Fleisch oder Milch sind jedoch unerwünscht, da sie die menschliche Darmflora beeinflussen können, das Wachstum von lebensmitteltechnologisch genutzten Bakterien hemmen können, bestimmte Wirkstoffe bei sensibilisierten Menschen allergische Reaktionen auslösen können und bestimmte Substanzen toxisch sind<sup>4</sup>. Aktuell wird insbesondere der Zusammenhang zwischen der Anwendung von Antibiotika in der Landwirtschaft und der Zunahme von antibiotikaresistenten human-pathogenen Bakterien diskutiert.

Zum Schutz der öffentlichen Gesundheit und um den freien Warenverkehr innerhalb der Europäischen Union (EU) nicht zu behindern, wurden innerhalb der EU für Tierarzneimittel maximal duldbare Rückstandshöchstmengen in essbaren Geweben und Produkten (MRL-Wert, engl. maximum residue limits) festgelegt. Enthalten Lebensmittel Rückstände unterhalb dieser Höchstmengen, so geht nach gegenwärtigem Kenntnisstand von diesen keine Gefahr für die menschliche Gesundheit aus<sup>5</sup>. Des Weiteren muss, um eine Gefährdung der menschlichen Gesundheit durch Tierarzneimittelrückstände auszuschließen, nach der Behandlung von lebensmittelliefernden Tieren im Allgemeinen eine Wartezeit eingehalten werden<sup>6</sup>. Diese legt den Zeitraum fest, der zwischen letzter Behandlung und Lebensmittelgewinnung eingehalten werden muss, um sicherzustellen, dass zur Zeit der Schlachtung oder Gewinnung des Lebensmittels keine Gefährdung der Gesundheit durch Arzneimittelrückstände besteht und festgesetzte MRL-Werte nicht überschritten werden.

---

\* Der Bereich der Antiinfektiva lässt sich in Antibiotika und Chemotherapeutika unterteilen. Antibiotika sind Stoffe, die von Mikroorganismen produziert werden und das Wachstum von Bakterien hemmen (bakteriostatische Wirkung) oder Bakterien abtöten (bakterizide Wirkung). Chemotherapeutika sind synthetisch hergestellte Stoffe mit vergleichbarer Wirkung. Zur Vereinfachung werden beide Arzneimittelgruppen im weiteren Verlauf als Antibiotika bezeichnet.

Ein sinnvoller Verbraucherschutz kann nur erreicht werden, wenn die Einhaltung von Wartezeiten über MRL-Werte kontrolliert wird. Eine systematische Überwachung hinsichtlich der Anwendung von Antibiotika und anderer Tierarzneimittel bei lebensmittelliefernden Tieren erfolgt in Deutschland und anderen EU-Staaten über Rückstandskontrollpläne und im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung. Die Lebensmittelindustrie untersucht Lebensmittel auf entsprechende Rückstände als Bestandteil ihrer Qualitätssicherungssysteme. Antibiotika-Rückstände stellen insbesondere für die Milchindustrie ein Problem dar, da sie die Produktion von fermentierten Milchprodukten behindern, indem sie das Wachstum der verwendeten Starterkulturen zur Herstellung von z.B. Joghurt, Käse und Quark hemmen.

Um Antibiotika-Rückstände in Lebensmitteln nachzuweisen, benötigen daher sowohl amtliche als auch private Untersuchungslaboratorien schnelle und empfindliche Untersuchungsmethoden. Neben chemisch-physikalischen Analysemethoden werden mikrobiologische, immunochemische und biochemische Tests verwendet. Letztere erlauben insbesondere ein Screening auf das Vorhandensein bestimmter Antibiotika und zeichnen sich durch ihre einfache Durchführbarkeit und Schnelligkeit aus, so dass mit derartigen Testsystemen ein hoher Probendurchsatz erzielt werden kann.

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines instrumentellen Screening-Tests für den Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-Rückständen in Milch und die Isolierung, Synthese und Charakterisierung der dafür benötigten biomolekularen Erkennungspartner. Ein Vorteil instrumenteller Screening-Tests ist, dass sie die Reproduzierbarkeit instrumenteller Analyseverfahren und die oben beschriebenen Vorteile von Screening-Tests vereinen.

Essentielle Bestandteile sämtlicher Screening-Tests sind spezifische Bindungskomponenten, wie Antikörper, Proteine oder Bakterien, mit denen z.B. ein gesuchter Wirkstoff oder eine gesuchte Wirkstoffklasse nachgewiesen werden kann. Für den Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika erfüllen diese Anforderung Penicillin-bindende Proteine (PBP). PBP sind bakterielle Enzyme, die das Target der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika im bakteriellen Stoffwechsel sind und, wie der Name suggeriert, Penicilline und andere  $\beta$ -Lactam-Antibiotika spezifisch binden<sup>7</sup>. Verschiedene PBP wurden zunächst auf ihre Tauglichkeit für die Entwicklung des Screening-Tests für den Nachweis von Penicillinen und Cephalosporinen untersucht und anschließend als analytisches Tool für die Entwicklung eines optischen Biosensor-Assays auf Basis der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR, engl. surface plasmon resonance) eingesetzt.

## 2 Penicilline und Cephalosporine

$\beta$ -Lactam-Antibiotika, wie Penicilline und Cephalosporine, sind wichtige Antibiotika, die sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin zur Behandlung bakterieller Infektionen verwendet werden<sup>8</sup>.  $\beta$ -Lactam-Antibiotika sind neben Tetracyclinen und Makroliden die bedeutendste Antibiotikagruppe, die zur Behandlung von landwirtschaftlichen Nutztieren verwendet wird<sup>9,10</sup>.

### 2.1 Strukturen

$\beta$ -Lactam-Antibiotika können auf der Basis gemeinsamer Grundkörper in verschiedene Klassen eingeteilt werden. Gemeinsames Strukturmerkmal aller  $\beta$ -Lactam-Antibiotika ist der  $\beta$ -Lactam-Ring (Abbildung 1), der als Bestandteil von Benzylpenicillin 1945 röntgenspektroskopisch nachgewiesen wurde<sup>11</sup>.  $\beta$ -Lactam-Antibiotika sind mit Ausnahme der monocyclischen  $\beta$ -Lactame bicyclische Verbindungen. Am  $\beta$ -Lactam-Ring sind über das Stickstoffatom und das angrenzende C-Atom entweder fünfgliedrige oder sechsgliedrige Ringsysteme ankondensiert.

#### Penicilline

Penicilline sind Carbonsäuren, dessen Grundkörper ein Kondensationsprodukt aus  $\beta$ -Lactam-Ring und Thiazolidin-Ring, das so genannte Penam, ist<sup>15</sup> (Abbildung 1). Mit Ausnahme von Benzylpenicillin und Phenoxymethylpenicillin, die durch biotechnologische Fermentation gewonnen werden, sind die meisten der heute klinisch verwendeten Penicilline semisynthetische Derivate, die ausgehend von der 6-Aminopenicillansäure (6-APA) synthetisiert werden. Bei der Synthese werden die entsprechenden Seitenketten an die Aminogruppe der 6-APA angeknüpft<sup>12,13</sup>. Die Gewinnung der 6-APA erfolgt enzymatisch aus Benzylpenicillin oder Phenoxymethylpenicillin mit Penicillin-Acylasen (Penicillin-Amidohydrolasen), die vom Muttermolekül Phenylelessigsäure oder Phenoxyessigsäure abspalten<sup>14</sup>.

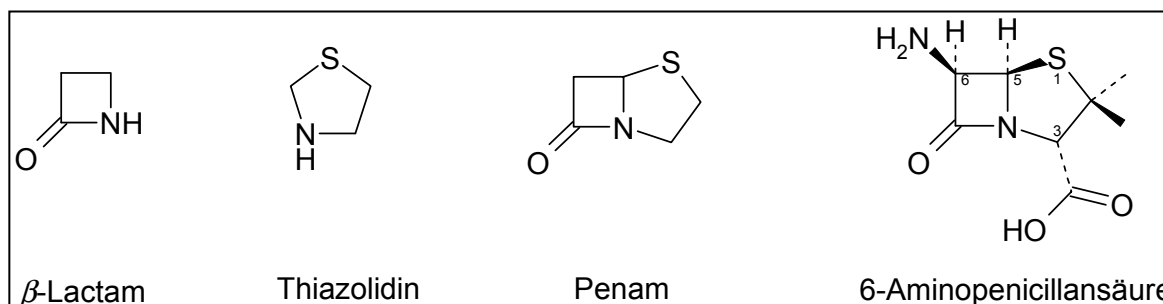


Abbildung 1: Strukturmerkmale der Penicilline.

In dem Penam-Skelett der 6-APA sind drei chirale Zentren vorhanden. Von den theoretisch-möglichen acht stereoisomeren Formen wird jedoch auf natürlichem Wege nur die 3*S*,5*R*,6*R*-Konfiguration, die für die antibakterielle Wirkung essentiell ist, gebildet<sup>15</sup>.

Die Strukturen der für lebensmittelliefernde Tiere innerhalb der EU zugelassenen Penicilline<sup>5</sup> sind in Abbildung 2 nach gemeinsamen Strukturmerkmalen zusammengefasst abgebildet.

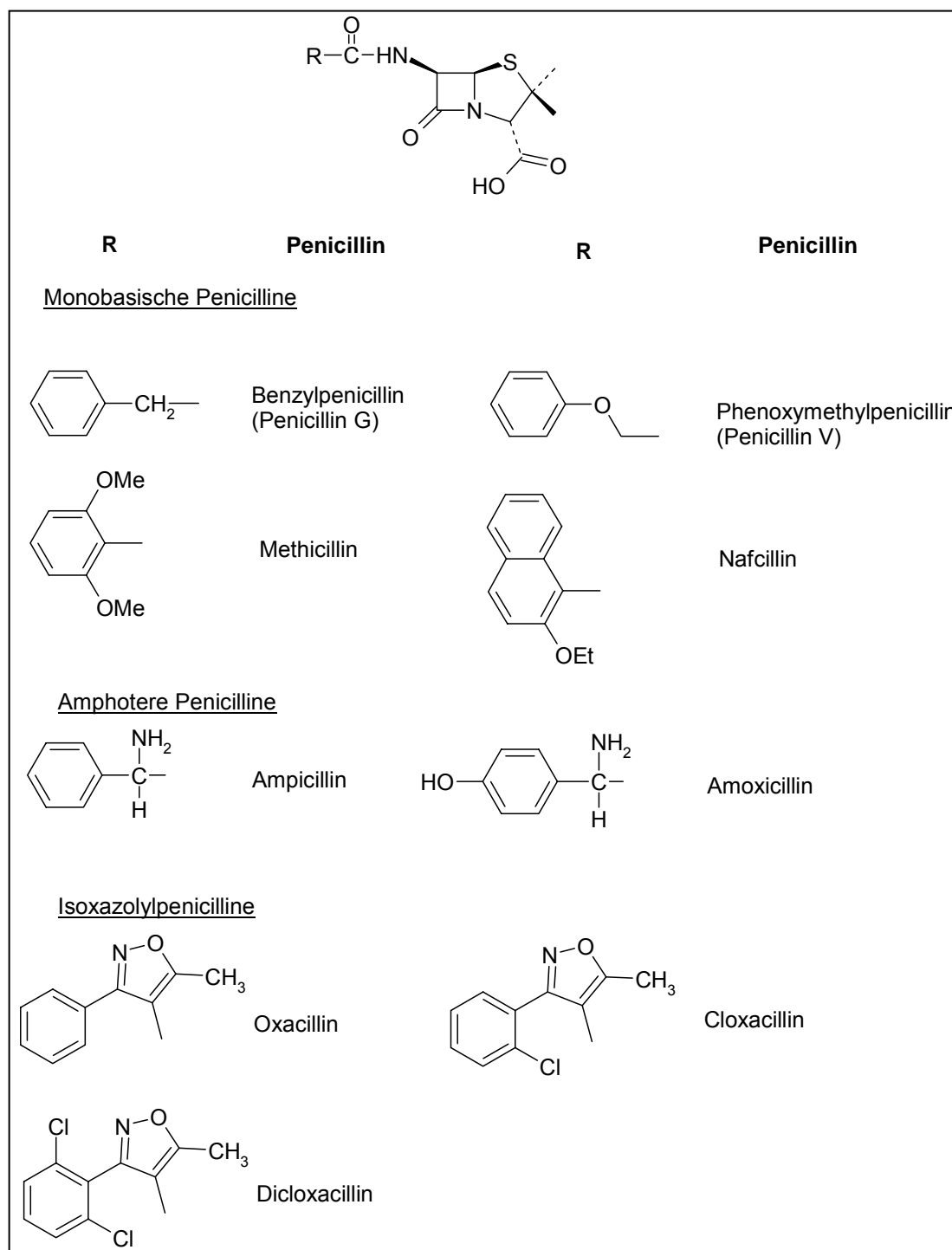


Abbildung 2: Penicilline, die innerhalb der EU für lebensmittelliefernde Tiere zugelassen sind<sup>5</sup>.

### Cephalosporine

Cephalosporine enthalten anstelle des Thiazolidin-Ringes einen Dihydrothiazin-Ring und der entsprechende Grundkörper wird als Cephem bezeichnet (Abbildung 3). Alle klinisch verwendeten Cephalosporine werden entweder chemisch ausgehend von Benzylpenicillin oder Phenoxymethylpenicillin durch Ringerweiterung<sup>16</sup> oder alternativ durch Modifikation der 7-Aminocephalosporansäure synthetisiert<sup>12</sup> (Abbildung 3). 7-Aminocephalosporansäure wird enzymatisch aus Cephalosporin C hergestellt<sup>17</sup>. Die C-Atome 6 und 7 im  $\beta$ -Lactam-Ring besitzen analog zu den C-Atomen 5 und 6 der Penicilline *R*-Konfiguration<sup>15</sup>.

Die für lebensmittelliefernde Tiere zugelassenen Cephalosporine zeigt Abbildung 4<sup>5</sup>.

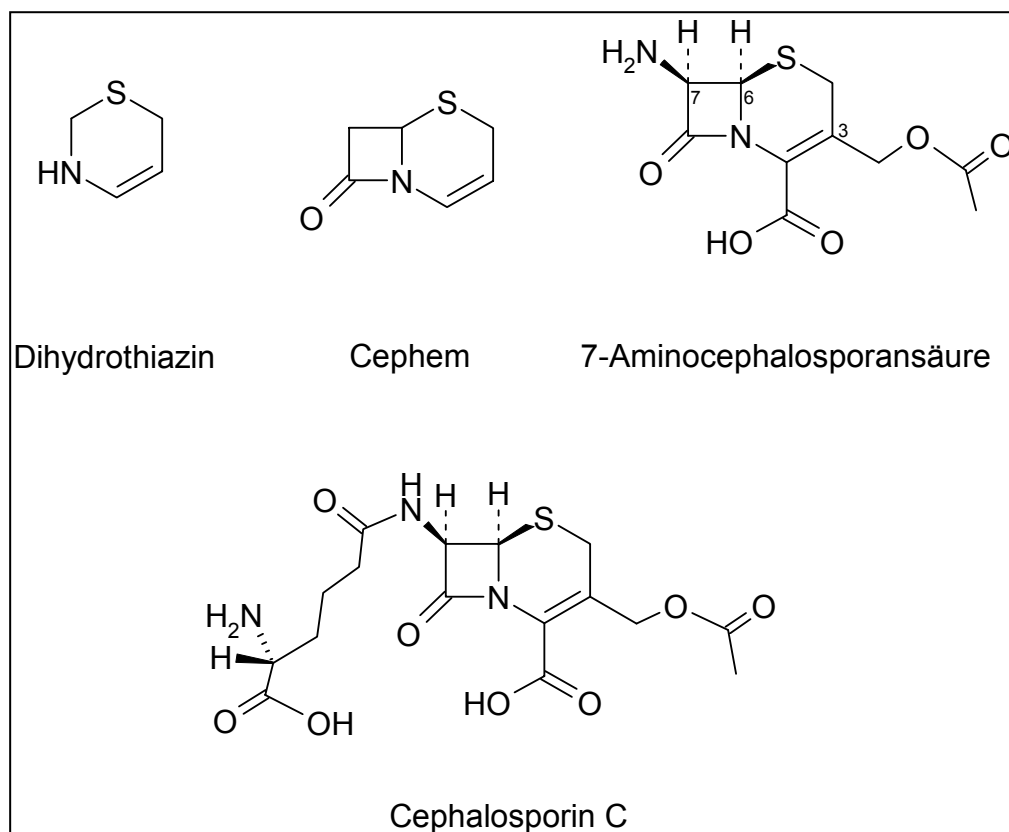


Abbildung 3: Grundkörper Cephalosporine.

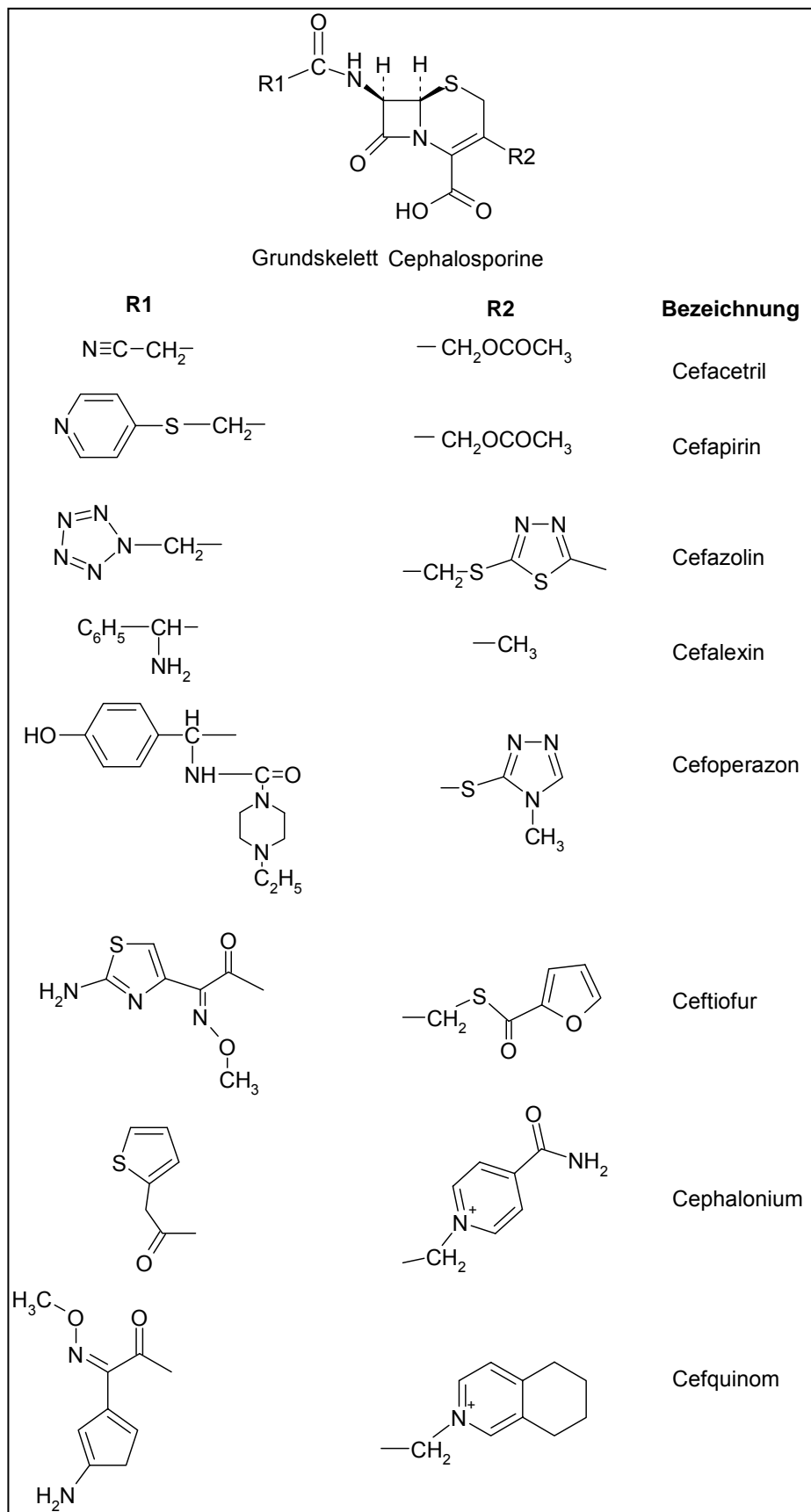


Abbildung 4: Cephalosporine, die innerhalb der EU für lebensmittelliefernde Tiere zugelassen sind<sup>5</sup>.

## 2.2 Reaktivität des $\beta$ -Lactam-Ringes

Sämtliche biochemische und chemische Vorgänge, an denen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika beteiligt sind, erfolgen unter Öffnung des  $\beta$ -Lactam-Ringes<sup>18</sup>.

Abbildung 5 gibt am Beispiel der Penicilline einen schematischen Überblick der dabei ablaufenden Reaktionen. Die chemische und enzymatische Hydrolyse führt zur Bildung von Penicilloinsäuren, die keine antibakterielle Wirkung besitzen (Abbildung 5 a, b). Die antibakterielle Wirkung der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika beruht auf der Acylierung von PBP (Abbildung 5 c). Allergische Reaktionen können bei sensibilisierten Personen während einer Penicillin-Therapie durch proteingebundene Penicillin-Derivate ausgelöst werden (Abbildung 5 d).

Da sowohl die biologische Aktivität als auch chemische und enzymatische Abbauvorgänge sowie das Auslösen allergischer Reaktionen eine Öffnung des  $\beta$ -Lactam-Ringes beinhalten, werden die wichtigsten Aspekte dieser Reaktion nachfolgend erläutert.

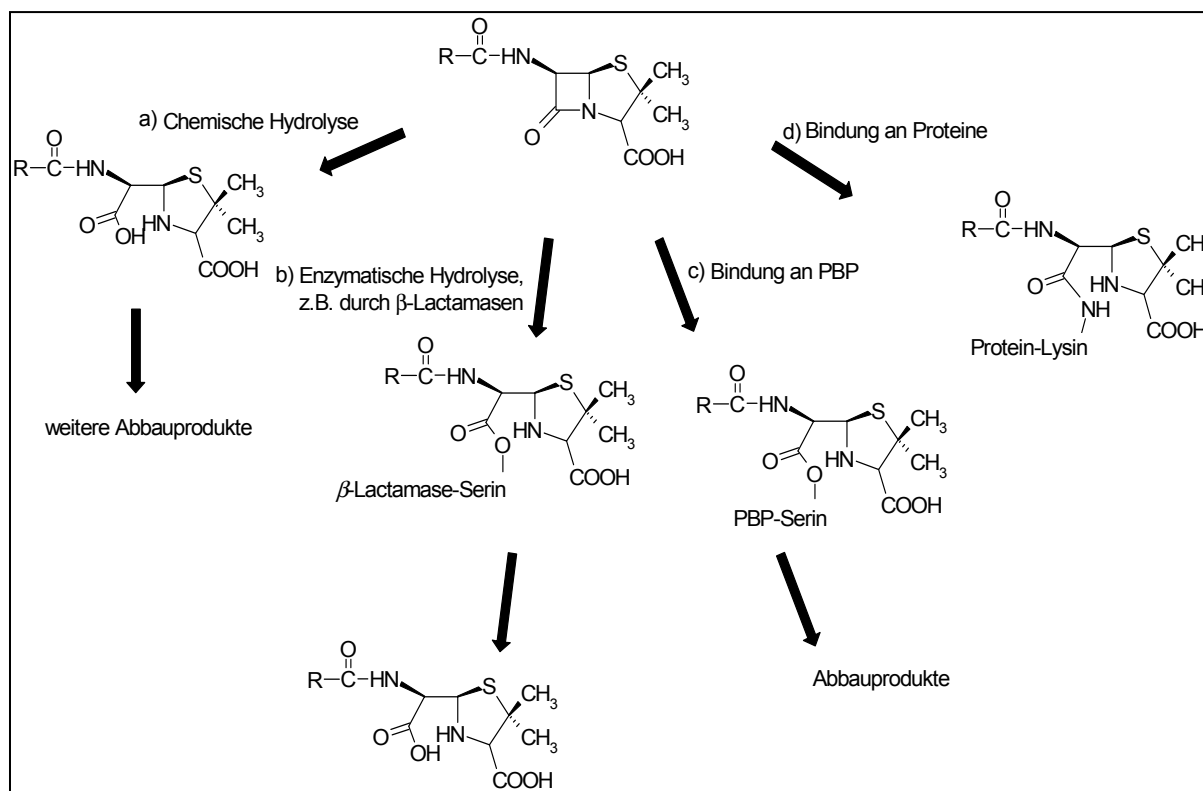


Abbildung 5: Reaktionen von Penicillinen, die zu einer Öffnung des  $\beta$ -Lactam-Ringes führen [modifiziert nach<sup>18</sup>].

### 2.2.1 Chemische Abbaureaktionen

Eine Öffnung des  $\beta$ -Lactam-Ringes erfolgt unter basischen, neutralen und sauren Bedingungen<sup>18,19</sup>.  $\beta$ -Lactame weisen darüber hinaus im Vergleich zu nicht-zyklischen Amiden eine erhöhte Reaktivität gegenüber Nucleophilen, wie primären und sekundären Aminen, Thiolen, Zuckern und Zuckeralkoholen, auf<sup>20,21</sup>.

Die hohe Reaktivität des  $\beta$ -Lactam-Ringes ist ein kritischer Faktor, der bei Analysen auf  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-Rückstände in Lebensmitteln besonders berücksichtigt werden muss, weil Abbaureaktionen vor und während der eigentlichen Analyse ablaufen können. Ein verstärkter Abbau findet insbesondere während der Gewinnung, Herstellung und Lagerung von Lebensmitteln statt, da Rückstände als Minorkomponenten in eine komplexe Matrix eingebettet sind und natürliche Lebensmittelbestandteile mit dem  $\beta$ -Lactam-Ring wie nachfolgend beschrieben reagieren können<sup>22,23</sup>.

#### Penicilline

Die Öffnung des  $\beta$ -Lactam-Ringes unter alkalischen Bedingungen und die Reaktion mit Nucleophilen erfolgt bei Penicillinen unter Bildung der entsprechenden Penicilloinsäuren bzw. der entsprechenden Penicilloyl-Derivate (Abbildung 6). Diese primären Abbauprodukte sind unter neutralen Bedingungen relativ stabil<sup>20,24</sup>. Aus den Penicilloinsäuren entstehen jedoch abhängig vom pH-Wert Penillosäuren oder Penamaldsäuren. Die Endprodukte der alkalischen Hydrolyse sind  $\text{CO}_2$ , Penilloaldehyd und Penicillamin.

Prinzipiell ist die beschriebene Reaktion von Penicillinen mit Nucleophilen Basis für die antibakterielle Wirkung aller  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Vergleichbar mit Hydroxid-Ionen im wässrigen Milieu wirkt die OH-Gruppe eines Serin-Restes im aktiven Zentrum von PBP als Nucleophil und spaltet die  $\beta$ -Lactam-Bindung (s. 2.3.2)<sup>7,18</sup>.

Die Hydrolyse des  $\beta$ -Lactam-Ringes unter sauren Bedingungen erfolgt bei Penicillinen durch Protonierung des  $\beta$ -Lactam-Stickstoffes und Spaltung der C-N-Bindung. Daraus resultiert ein positivgeladenes Acylium-Ion<sup>25,26</sup> (Abbildung 7). Die Bildung dieses Zwischenproduktes ist jedoch anders als bei der Hydrolyse im Alkalischen reversibel<sup>20</sup>. Das Acylium-Ion reagiert mit Wasser unter Bildung der Penicilloinsäure, aus der nach Decarboxylierung die Penillosäure entsteht. Durch intramolekulare Beteiligung der C-6-Acylamido-Seitenkette entstehen Oxazolylthiazolidine, aus denen Penillsäure, Penicillensäure, Penalmadsäure, Penicilloinsäure und Penillosäure entstehen<sup>18,20,26</sup>.



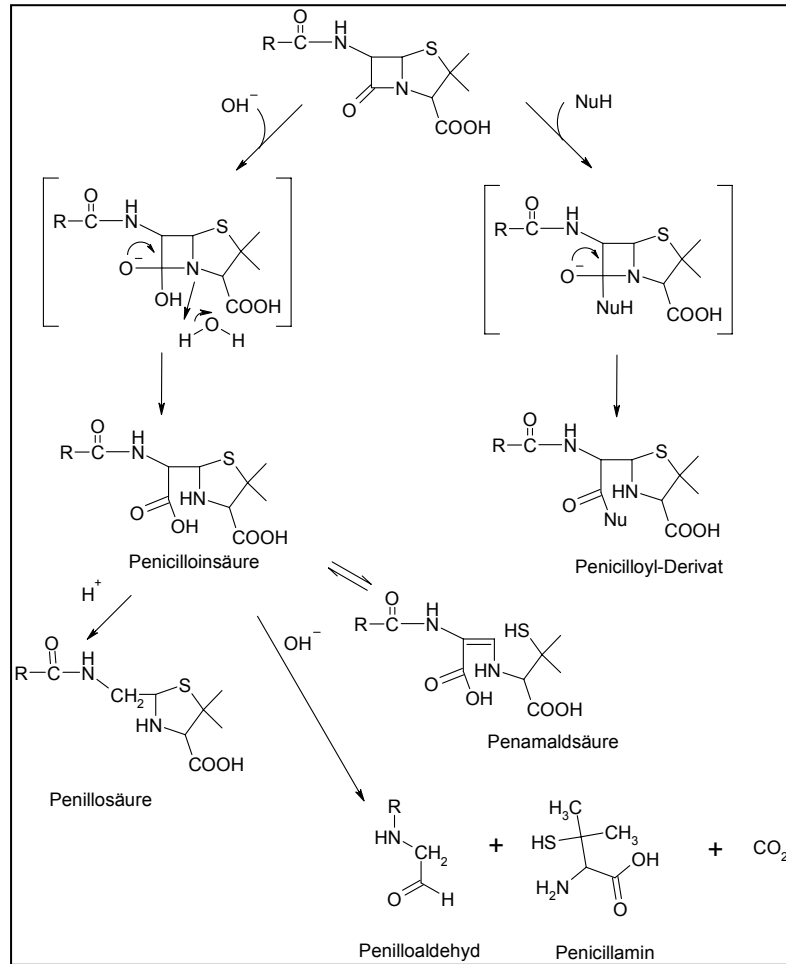


Abbildung 6: Abbau von Penicillinen durch nucleophilen Angriff<sup>20</sup>.

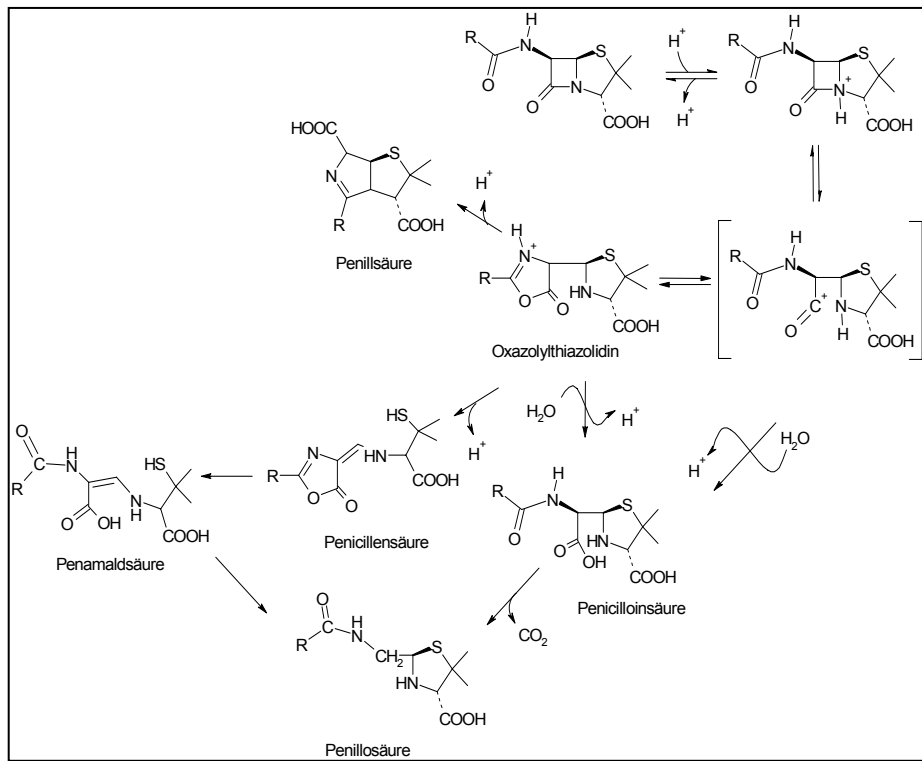


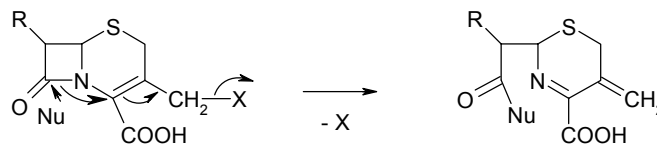
Abbildung 7: Abbau von Penicillinen im Sauren<sup>18</sup>.

Die Säurestabilität des  $\beta$ -Lactam-Ringes kann in Penicillinen durch elektronenziehende Gruppen in der *N*-Acyl-Seitenkette verbessert werden<sup>15,27</sup>. Beispiele hierfür sind Phenoxymethylpenicillin, Ampicillin und Cloxacillin, die aufgrund der erhöhten Säurestabilität insbesondere für eine Oraltherapie verwendet werden.

### Cephalosporine

Die Reaktionen der Cephalosporine im basischen und im sauren Milieu sowie die Reaktionen mit Nucleophilen sind vergleichbar mit denen der Penicilline<sup>26</sup>. Die entsprechenden Cephalosporosäuren sind jedoch im Gegensatz zu Penicilloinsäuren nicht stabil<sup>28</sup>.

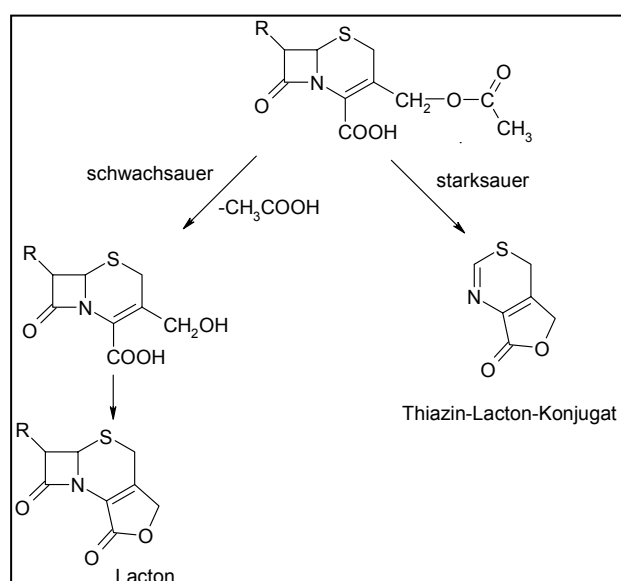
Bei Cephalosporinen, die an C-3 einen  $\text{CH}_2\text{-X}$ -Rest besitzen und der X-Rest eine Abgangsgruppe ist, wird in Gegenwart von Nucleophilen der X-Rest abgespalten (Abbildung 8)<sup>26,28</sup>.



**Abbildung 8: Reaktionen von Cephalosporinen mit Nucleophilen<sup>20</sup>.**

Cephalosporine sind im sauren Milieu stabiler als Penicilline. Ein weiterer Unterschied ist, dass die C-7-Acylamido-Seitenkette an Abbaureaktionen nicht beteiligt ist<sup>29</sup>.

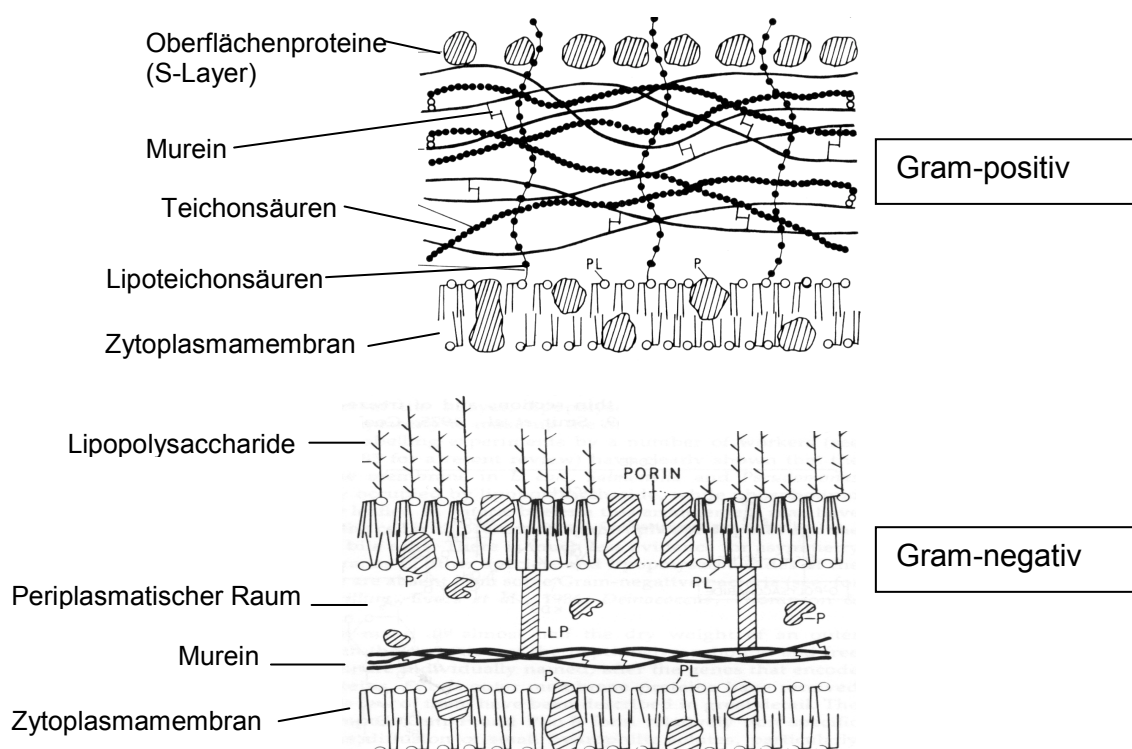
Bei Cephalosporinen mit einer  $\text{CH}_2$ -Acetoxy-Seitenkette wird unter schwachsauren Bedingungen Essigsäure abgespalten und intramolekular ein Lacton gebildet (Abbildung 9)<sup>20,24</sup>. Unter starksauren Bedingungen (10-25% Schwefelsäure) entsteht ein entsprechendes Thiazin-Derivat.



**Abbildung 9: Reaktionen von Cephalosporinen im Sauren<sup>20</sup>.**

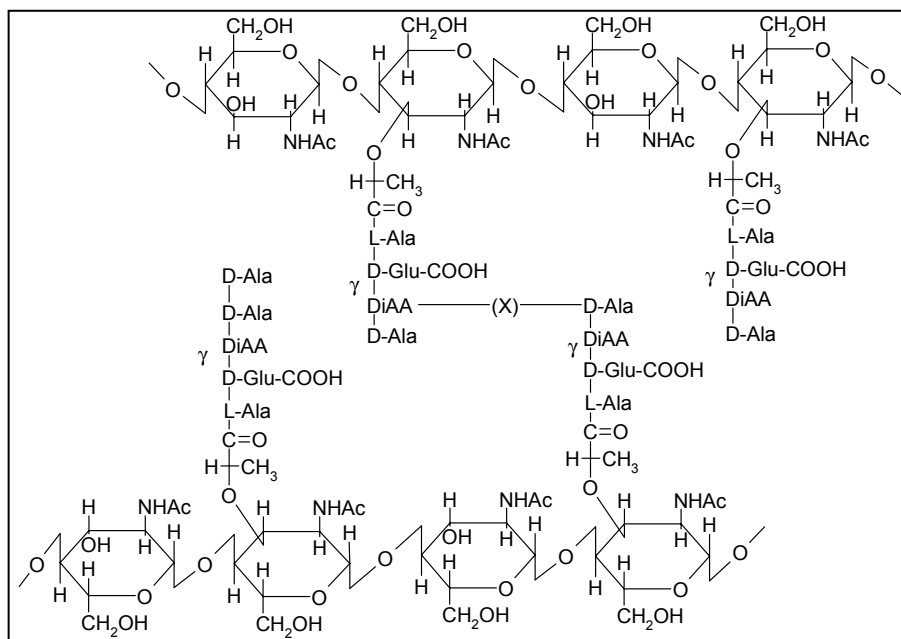
## 2.3 Wirkungsmechanismus

Die antibakterielle Wirkung der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika beruht auf der Inhibierung membrangebundener Enzyme (PBP, s. Abschnitte 2.3.2 und 2.4), die an der Peptidoglykan-Biosynthese der bakteriellen Zellwand beteiligt sind. Einen schematischen Überblick der Zellwände Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien zeigt Abbildung 10. Der Zytoplasmamembran Gram-positiver Bakterien ist eine mehrschichtige Schicht aus Peptidoglykan (Murein), die ferner Teichonsäuren, Proteine und geringe Mengen Lipide enthält, aufgelagert<sup>30</sup>. Diese Zellwand besteht bis zu 90 % aus Murein und ist für Stoffe mit einem MG < 55.000 Da durchlässig<sup>31</sup>. Die Peptidoglykan-Schicht ist bei Gram-negativen Bakterien dünner (5 - 15 % der Zellwand) und ihr ist eine weitere zweischichtige Membran aus Phospholipiden und Lipopolysacchariden (äußere Membran) aufgelagert<sup>32</sup>. Die äußere Membran ist mit Proteinporen (Porine) durchsetzt, durch die niedermolekulare Stoffe (MG < 600 Da) in den periplasmatischen Raum zwischen äußerer Membran und innerer Membran diffundieren können oder aktiv transportiert werden<sup>33</sup>. Die äußere Membran ist eine wesentliche Penetrationsbarriere, die z.B. den Zugang von Antibiotika begrenzt. Aus der Gruppe der Penicilline können z.B. nur die amphoteren Penicilline aktiv durch die Porinkanäle transportiert werden und ihre antibakterielle Wirkung entfalten<sup>15,32</sup>.



**Abbildung 10: Zellwände Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien<sup>34</sup>. PL: Phospholipid, LP: Lipoprotein, P: Protein. Erläuterungen siehe Text.**

Das Murein ist für die mechanische Stabilität der Bakterienzelle gegenüber dem hohen Turgordruck innerhalb der Zelle verantwortlich, da es als stabiles und gleichzeitig flexibles Polymer, vergleichbar einem Fischernetz, die Zytoplasmamembran vollständig umschließt<sup>31</sup>. Der Turgordruck wird in Gram-negativen Bakterien auf 2 bis 5 Atmosphären<sup>31,32</sup> und in Gram-positiven auf 25 Atmosphären<sup>30</sup> geschätzt. Murein besteht aus Polysaccharidsträngen, die über kurze Peptidseitenketten miteinander verknüpft sind (Abbildung 11). Bausteine der Polysaccharidstränge sind alternierende *N*-Acetyl-Glucosamin- $\beta(1\rightarrow4)$ -*N*-Acetyl-Muraminsäure-Disaccharid-Einheiten<sup>35</sup>. Die Lactyl-Gruppe der Muraminsäure ist mit dem Tetrapeptid L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-L-DiAA-D-Ala amidiert, wobei DiAA eine speziesspezifische Diaminosäure ist<sup>36</sup>. Während Gram-negative Bakterien und einige Gram-positive Arten die Diaminosäure meso-Diaminopimelinsäure im Murein haben, besitzen die meisten Gram-positiven Kokken die Diaminosäure L-Lysin<sup>32,33</sup>. Benachbarte Polysaccharidstränge sind über eine Amidbindung zwischen der Seiten-Aminogruppe der Diaminosäure eines Tetrapeptides und der Carboxylgruppe des terminalen D-Alanins eines anderen Tetrapeptides miteinander verbunden (Abbildung 11)<sup>37</sup>. Diese direkte Verknüpfung ist typisch für Gram-negative Bakterien<sup>34</sup>. Gram-positive Bakterien besitzen zusätzliche Aminosäuren oder Peptide (engl. cross-bridge), z.B. D-Aspartat in Milchsäurebakterien<sup>31</sup> oder Pentaglycin-Einheiten in *Staphylococcus aureus*, zwischen den zwei verknüpften Peptiden (Abbildung 11)<sup>30</sup>.



**Abbildung 11: Struktur Murein<sup>31,34</sup>.** Zwei Polysaccharidstränge aus  $\beta(1\rightarrow4)$  glykosidisch verknüpftem *N*-Acetyl-Glucosamin und *N*-Acetyl-Muraminsäure sind über Peptidseitenketten verknüpft. X: Peptidverbindungsstück (cross-bridge) bei Gram-positiven Bakterien.

### 2.3.1 Murein-Biosynthese

Die Murein-Biosynthese von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien erfolgt nach einem vergleichbaren Schema<sup>31,38,39,40,41</sup>. In einem ersten Schritt wird im Zytosol ausgehend von UDP\*-aktivierten Prekursoren und den oben aufgeführten Aminosäuren UDP-*N*-Acetylmuraminsäure-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-meso-DAP<sup>†</sup>(oder L-Lys)-D-Ala-D-Ala gebildet. Dieses *N*-Acetylmuraminsäure-Pentapeptid wird in weiteren Reaktionen über eine Phosphodiesterbindung an einen C<sub>55</sub>-isoprenoiden Alkohol (Undecaprenol) gebunden. Anschließend werden *N*-Acetyl-Glucosamin und *N*-Acetylmuraminsäure glykosidisch verknüpft. Im Zuge der Bildung dieses an das Undecaprenol-gebundenen Zwischenproduktes werden bei Gram-positiven Bakterien die Peptidverbindungsstücke an die Diaminosäure des Pentapeptides gebunden. Das eventuell modifizierte Undecaprenol-Phosphodiester-Disaccharid-Pentapeptid wird durch die Zytoplasmamembran in den periplasmatischen Raum transportiert.

Auf der Außenseite der Zytoplasmamembran finden die terminalen Reaktionen der Murein-Biosynthese statt. Diese sind a) die Polymerisation der Lipid-gebundenen Disaccharid-Einheiten zu Polysaccharidsträngen mit Pentapeptidseitenketten und b) die Quervernetzung dieser neu gebildeten Peptidoglykane mit bereits bestehendem Zellwandmaterial.

An diesen terminalen Reaktionen sind zwei Typen enzymatischer Aktivitäten beteiligt: Glykosyltransferasen katalysieren die Bildung der Polysaccharidstränge mit Pentapeptidseitenketten und DD-Transpeptidasen (s. Abschnitt 2.3.2) katalysieren die Bildung der Amidbindungen zwischen den Peptidseitenketten<sup>42,43</sup>. Da das Murein die Zytoplasmamembran vollständig umschließt, erfordert der Einbau neuer Peptidoglykan-Moleküle in die bereits existierende Zellwand, dass Bindungen im Murein durch Mureinhydrolasen gespalten werden<sup>44</sup>. Dabei herrscht zwischen Murein-aufbauenden und Murein-abbauenden Enzymen (Mureinhydrolasen) ein Gleichgewicht, um zu verhindern, dass der hohe Turgordruck die Zelle sprengt<sup>45</sup>. Die Murein-Biosynthese ist insbesondere bei der Septumbildung während der Zellteilung von Bedeutung, da die Tochterzellen durch spezielle Mureinhydrolasen (Autolysine) kontrolliert getrennt werden<sup>46</sup>.

$\beta$ -Lactam-Antibiotika sind Inhibitoren der DD-Transpeptidasen und greifen so in das empfindliche Gleichgewicht zwischen Murein-auf- und abbauenden Enzymen ein. Dies führt infolge der weiterhin vorhandenen Aktivität der Mureinhydrolasen zu einer Destabilisierung des Mureins. Da die Neusynthese von Zellwandmaterial durch  $\beta$ -Lactam-Antibiotika unterbrochen wird, sprengt der hohe Turgordruck an den destabilisierten Stellen letztendlich die Zellwand,

---

\* UDP, Uridindiphosphat

† meso-DAP, meso-Diaminopimelinsäure

und die Zelle stirbt<sup>30,47</sup>. Für eine weiterführende Darstellung der Murein-Biosynthese und der Grundlagen der bakteriziden Wirkung der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika sei auf die nachfolgenden Artikel<sup>31,38,40,47,48</sup> verwiesen.

### 2.3.2 DD-Transpeptidasen, Target der $\beta$ -Lactam-Antibiotika

Mit der Entdeckung der antibakteriellen Wirkung der Penicilline und Cephalosporine stellte sich die Frage nach den molekularen Grundlagen der Inhibierung der DD-Transpeptidasen durch die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Tipper und Strominger<sup>49</sup> postulierten 1965, dass Penicilline und andere  $\beta$ -Lactam-Antibiotika die D-Alanyl-D-Alanin-Sequenz des natürlichen Substrates der DD-Transpeptidasen und DD-Carboxypeptidasen (DD-Peptidasen) imitieren (Abbildung 12), so dass DD-Peptidasen neben ihren natürlichen Substraten auch  $\beta$ -Lactam-Antibiotika binden. Benzylpenicillin und D-Alanyl-D-Alanin-terminierte Peptide besitzen zusätzlich eine vergleichbare elektrostatische Oberfläche<sup>50,51</sup>. Neuere Konformationsanalysen und röntgenkristallographische Untersuchungen scheinen die von Waxman und Strominger aufgestellte These zu bestätigen<sup>52,53</sup>.

Die Quervernetzung der Peptidoglykane durch DD-Transpeptidasen erfolgt über einen zwei-stufigen Mechanismus (Abbildung 13)<sup>7,54,55,56</sup>. Zunächst wird das terminale D-Alanin eines D-Alanyl-D-Alanin-terminierten Donor-Pentapeptides abgespalten und es kommt zu einer Esterbindung mit der OH-Gruppe eines Serin-Restes im aktiven Zentrum der DD-Transpeptidasen. In einem zweiten Schritt erfolgt ein nucleophiler Angriff der Seiten-Aminogruppe eines Akzeptor-Peptides auf den Carbonyl-Kohlenstoff des zuvor entstandenen Serinesters. Das Enzym wird nach Bildung der Amidbindung wieder freigesetzt. Die beteiligten Enzyme werden als DD-Transpeptidasen klassifiziert, da diese Transferreaktion die Spaltung einer D-Alanyl-D-Alanin-Bindung beinhaltet. Strukturelle Voraussetzung für die Quervernetzung der Peptidoglykane ist, dass das Donor-Peptid ein Pentapeptid mit terminaler D-Alanyl-D-Alanin-Sequenz ist. Die Aminogruppe im Akzeptor-Peptid kann hingegen von einem L-Lysin-Rest, meso-Diaminopimelinsäure-Rest oder Peptidverbindungsstück stammen.

Der Vernetzungsgrad des Mureins wird wahrscheinlich durch DD-Carboxypeptidasen reguliert. DD-Carboxypeptidasen katalysieren die hydrolytische Abspaltung des terminalen D-Alanins eines Donor-Pentapeptides zu einem Tetrapeptid und verhindern so eine weitere Quervernetzung durch DD-Transpeptidasen<sup>7</sup>. Auch DD-Carboxypeptidasen besitzen einen Serin-Rest im aktiven Zentrum und die Reaktion verläuft über eine kovalente Bindung des Peptides an OH-Gruppe der Aminosäure. Das angreifende Nucleophil ist in diesem Fall jedoch ein Wassermolekül.

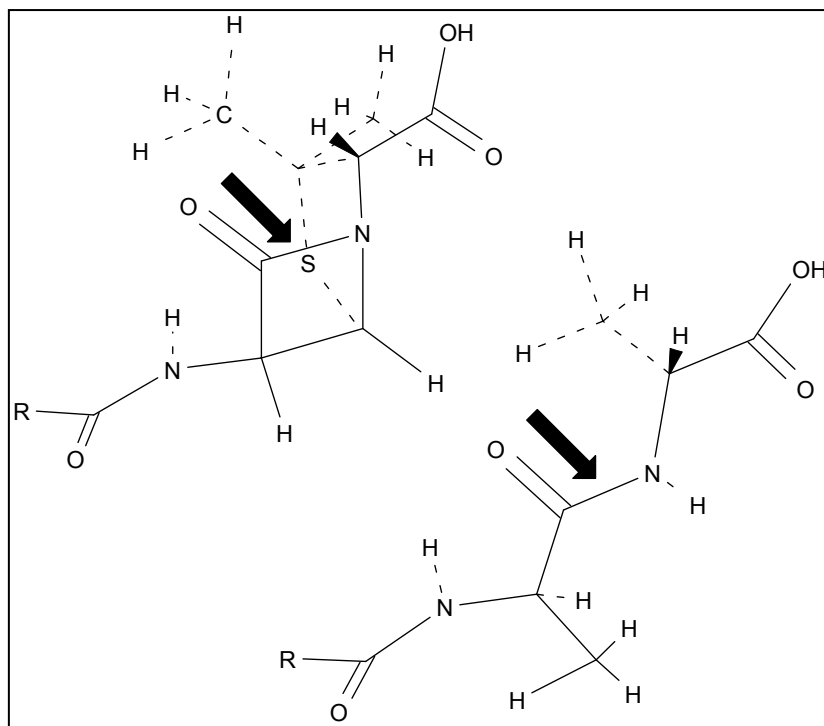


Abbildung 12: Vergleich von Penicillinen und D-Alanyl-D-Alanin-terminierten Peptiden. Die Pfeile zeigen auf die durch DD-Transpeptidasen gespaltenen Bindungen [<sup>15</sup> modifiziert].

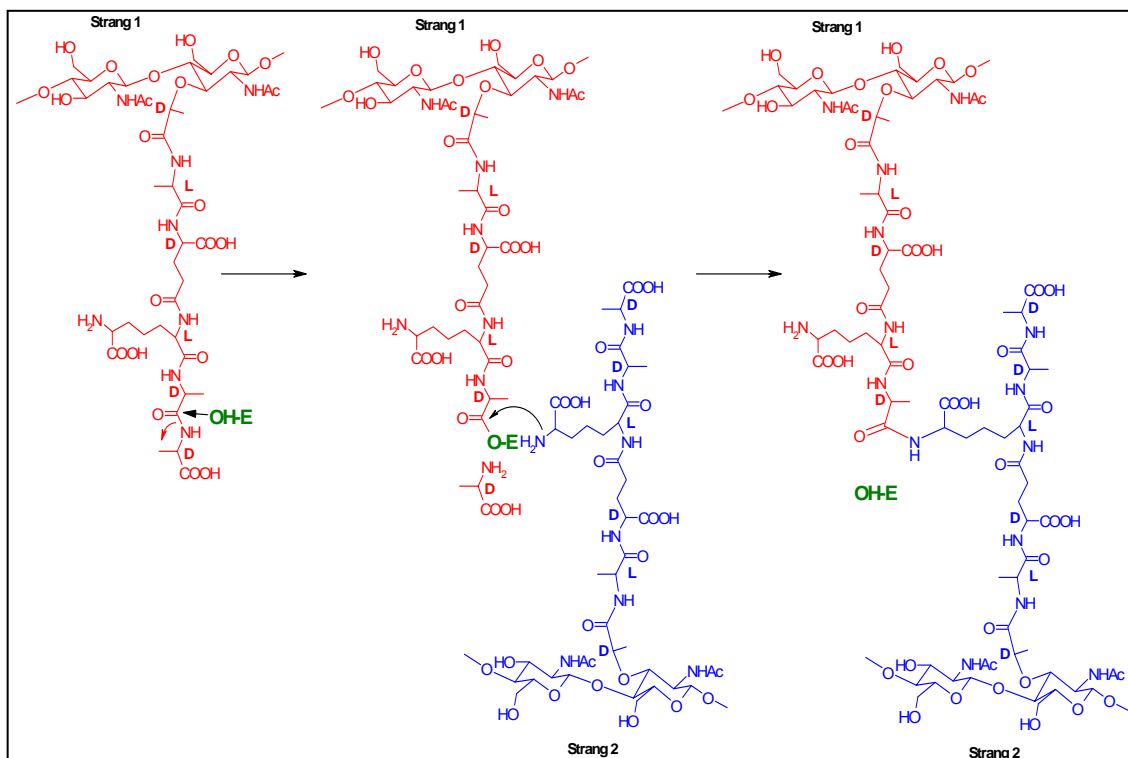
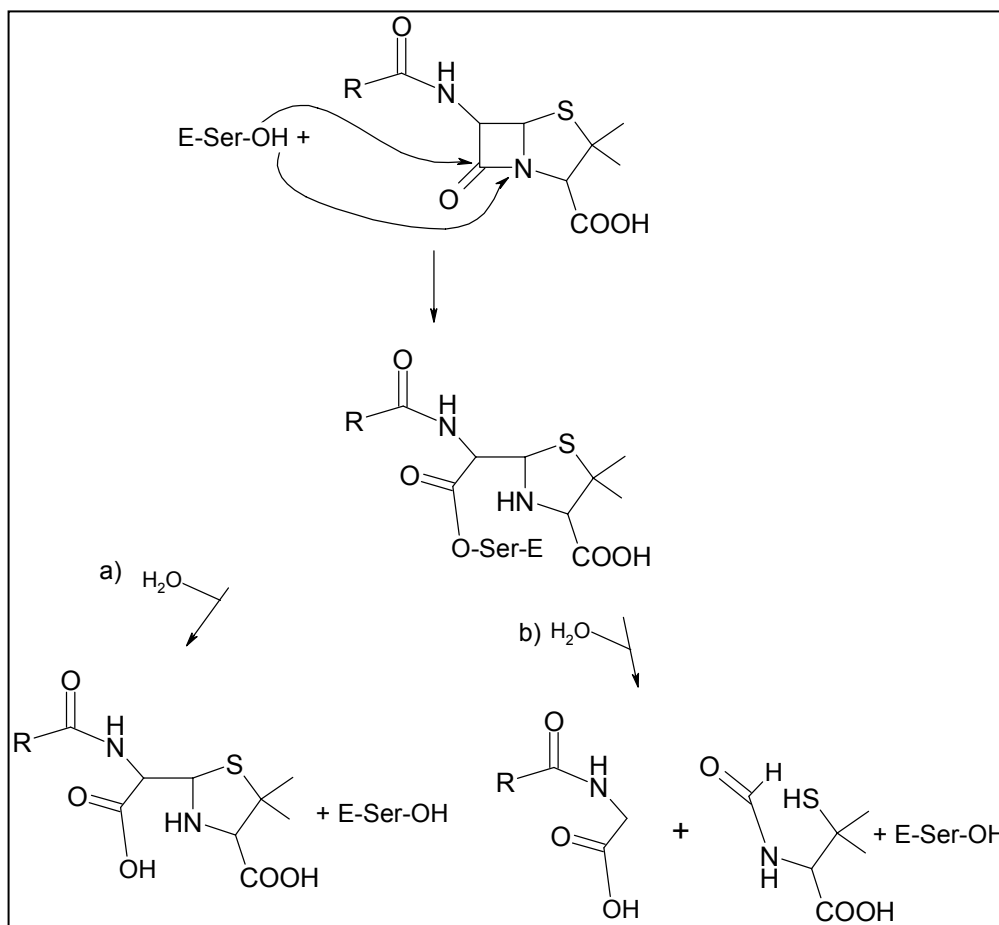


Abbildung 13: Quervernetzung (cross-linking) benachbarter Peptidoglykane durch DD-Transpeptidasen<sup>57</sup>. E-OH: DD-Transpeptidase

Bei der Reaktion der DD-Transpeptidasen mit  $\beta$ -Lactam-Antibiotika greift die OH-Gruppe des Serin-Restes, analog zur Reaktion mit einem D-Alanyl-D-Alanin-terminierten Peptid, den Carbonyl-Kohlenstoff der Amidbindung des  $\beta$ -Lactam-Ringes an, was zur Bildung eines Penicilloyl- oder Cephalosporoyl-Enzym-Konjugates führt (Abbildung 14). Eine Übertragung der gebundenen  $\beta$ -Lactame auf eine Aminogruppe eines Akzeptor-Peptides findet jedoch nicht statt, da der Zugang von Akzeptor-Molekülen durch das gebundene  $\beta$ -Lactam sterisch verhindert wird<sup>54</sup>. Lediglich ein Wassermolekül hat Zugang zum aktiven Zentrum und kann als Nucleophil den Carboxylkohlenstoff des Serinesters angreifen, so dass Abbauprodukte des gebundenen  $\beta$ -Lactam-Antibiotikums freigesetzt werden können (Abbildung 14). Das freigesetzte Enzym ist anschließend weiterhin enzymatisch aktiv.

Das gebildete DD-Peptidase/ $\beta$ -Lactam-Antibiotikum-Konjugat weist eine beachtliche Stabilität auf. Die Halbwertszeiten der Konjugate betragen, abhängig vom jeweiligen Enzym und des Penicillins oder Cephalosporins, wenige Minuten bis zu mehrere Tage. Die enzymatische Aktivität der DD-Peptidasen wird durch  $\beta$ -Lactam-Antibiotika über einen längeren Zeitraum inhibiert wird, was letztendlich zum Zelltod führt<sup>58,59,60</sup>.



**Abbildung 14: Reaktionsschema der Bindung von Penicillinen an DD-Transpeptidasen und DD-Carboxypeptidasen. Penicilline acylieren die Enzyme unter Bildung von Penicilloyl-Enzym-Konjugaten. Abhängig vom Enzym wird hydrolytisch a) die Penicilloinsäure freigesetzt oder b) das gebundene Penicillin wird zwischen C5 und C6 gespalten. Die Fragmentierung liefert *N*-Acyl-Glycin-Derivate und *N*-Formyl-D-Penicillamin<sup>56,61</sup>.**



## 2.4 Penicillin-bindende Proteine (PBP)

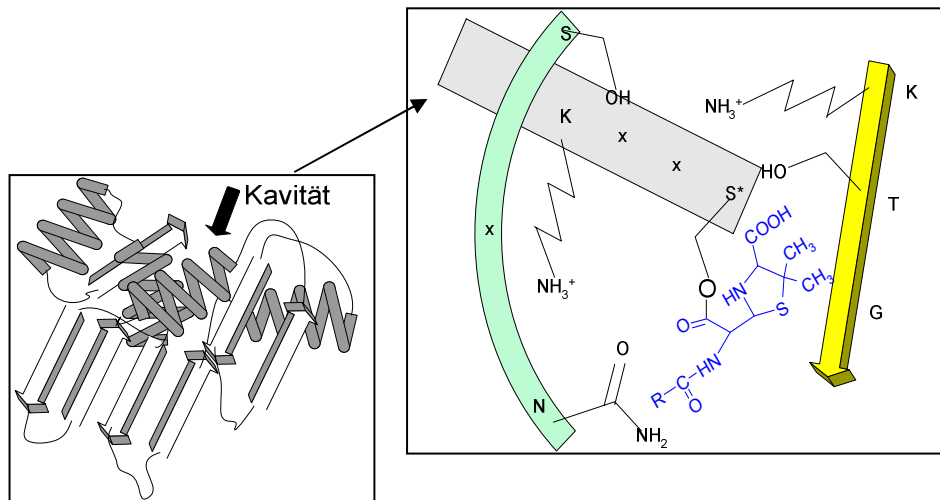
DD-Transpeptidasen, DD-Carboxypeptidasen und andere Enzyme der Mureinbiosynthese, die Penicilline und andere  $\beta$ -Lactam-Antibiotika kovalent binden, werden generell als PBP bezeichnet<sup>56</sup>. PBP sind membrangebundene Proteine, die nach Inkubation mit radioaktiv markierten  $\beta$ -Lactam-Antibiotika und anschließender SDS\*-Gelelektrophorese als PBP visualisiert werden können<sup>62</sup>. Die unterschiedlichen Bakterien zeigen dabei ein charakteristisches Proteinmuster, wobei die Anzahl der PBP (fünf bis zehn) von Organismus zu Organismus schwankt. PBP werden anhand des Proteinmusters in absteigender Reihenfolge ihres Molekulargewichtes (ca. 140 kDa – 40 kDa) nummeriert (z.B. PBP 1 100 kDa, PBP 2 80 kDa usw.)<sup>56</sup>. Enthält ein Bakterium mehrere PBP mit einem vergleichbaren Molekulargewicht, werden die PBP zusätzlich mit einem Buchstaben unterteilt (z.B. PBP 2b und PBP 2x).

Wie bereits unter 2.3.2 aufgeführt, sind PBP Enzyme mit einem Serin-Rest im aktiven Zentrum. Nach Goffin und Ghuysen<sup>7</sup> gehören PBP zur Gruppe der Serin-x-x-Lysin-Acyltransferasen. Mit x als variable Aminosäure sind die drei konservierten Aminosäuresequenzen (Motive) Serin-x-x-Lysin (SxxK, Motiv 1), Serin-x-Asparagin (SxN, Motiv 2) und Lysin-Threonin-Glycin (KTG, Motiv 3) in der Mehrzahl der PBP vorhanden<sup>55</sup>. Die drei Motive kommen in der Primärstruktur der Polypeptidkette in der aufgeführten Reihenfolge vor, werden durch die Proteinfaltung räumlich zusammengebracht und bilden eine katalytisch aktive Kavität (Abbildung 15)<sup>63</sup>. Substrate und  $\beta$ -Lactam-Antibiotika werden an das Serin im Motiv 1 gebunden<sup>64,65</sup>. Stellenspezifische Mutationen im aktiven Zentrum haben gezeigt, dass das Serin im Motiv 1 für die enzymatische Aktivität und die Interaktion mit  $\beta$ -Lactam-Antibiotika essentiell ist<sup>66</sup>.

Die enzymatischen Aktivitäten der PBP korrelieren häufig mit deren Molekulargewicht, so dass PBP in Abhängigkeit vom Molekulargewicht in zwei Gruppen eingeteilt werden<sup>55</sup>. PBP mit einem niedrigen Molekulargewicht besitzen DD-Carboxypeptidase-Aktivität und gelegentlich DD-Endopeptidase-Aktivität. PBP mit einem hohen Molekulargewicht (HMW PBP) besitzen DD-Transpeptidase-Aktivität. Die Gruppe der HMW PBP wird zusätzlich in HMW PBP der Klasse A und B eingeteilt. HMW PBP der Klasse A besitzen neben DD-Transpeptidase-Aktivität auch Glykosyltransferase-Aktivität und haben die Funktion von Mureinpolymerasen (s. Abschnitt 2.3.2)<sup>41,67</sup>. HMW PBP der Klasse B besitzen nur DD-Transpeptidase-Aktivität und eine weitere Domäne in der Struktur, der bisher keine enzymatische Aktivität zugeordnet werden konnte.

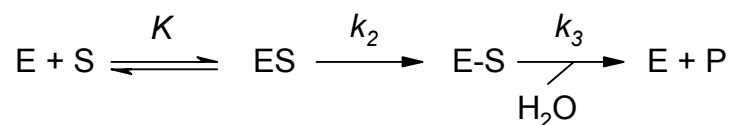
---

\* SDS, Natriumdodecylsulfat



**Abbildung 15: Schematische Darstellung der katalytisch aktiven Kavität eines hypothetischen PBP. Der rechte Teil der Abbildung zeigt die drei konservierten Motive der PBP. An den Serin-Rest im Motiv 1 ist eine Penicilloyl-Gruppe gebunden [<sup>7,55</sup> modifiziert].**

Die enzymatische Reaktion zwischen PBP und  $\beta$ -Lactam-Antibiotika kann durch folgende Reaktionsgleichung beschrieben werden<sup>68,69</sup>:



PBP (E) und  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum (S) bilden in einer ersten reversiblen Reaktion einen Komplex (ES), dessen Dissoziation durch die Konstante  $K$  [ $\text{mol l}^{-1}$ ] beschrieben wird. In einem zweiten Reaktionsschritt wird das PBP acyliert. Die Bildung des PBP/ $\beta$ -Lactam-Antibiotikum-Konjugates (E-S) wird durch die Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  [ $\text{s}^{-1}$ ] beschrieben. Die Deacylierung des Enzyms unter Freisetzung der Abbauprodukte des  $\beta$ -Lactam-Antibiotikums (P) wird durch die Geschwindigkeitskonstante  $k_3$  [ $\text{s}^{-1}$ ] beschrieben. PBP besitzen generell eine niedrige Affinität gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, weil die Dissoziationskonstante  $K$ , welche die reversible Bildung des PBP/ $\beta$ -Lactam-Komplexes beschreibt, im millimolaren Bereich liegt, so dass  $\beta$ -Lactam-Antibiotika nach der Schlüssel-Schloss-Hypothese nicht gut in die katalytisch aktive Kavitäten der PBP passen<sup>70</sup>. Die Effizienz eines Penicillins oder Cephalosporins ein PBP zu inhibieren, wird durch die Konstante  $k_2/K$  [ $\text{l mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ ] beschrieben. Typische Werte für  $k_2/K$  liegen im Bereich von 200 - 100.000  $\text{l mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ <sup>71,72,73,74</sup>. Generell gilt, je größer  $k_2/K$  und je kleiner  $k_3$  desto effizienter wird ein PBP durch ein  $\beta$ -Lactam inhibiert. Die hohe Stabilität der PBP/ $\beta$ -Lactam-Konjugate beruht auf den niedrigen Werten für  $k_3$  ( $\approx 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  und geringer)<sup>83</sup>.

## 2.5 Resistenz

Ein Nebeneffekt der Verwendung von Antibiotika ist, dass Bakterien die Fähigkeit erwerben können, der Wirkung eines Antibiotikums zu widerstehen (Resistenz), gegen das sie normalerweise empfindlich sind. Die breite Anwendung von Penicillinen und Cephalosporinen hat zu der raschen Entwicklung  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-resistenter, pathogener Bakterien geführt<sup>75,76,77</sup>. Bakterien, die nicht von Natur aus resistent gegen bestimmte  $\beta$ -Lactam-Antibiotika sind, haben über verschiedene Mechanismen Resistenzen gegen Penicilline und Cephalosporine entwickelt. Die bedeutendsten Mechanismen sind die Expression von  $\beta$ -Lactamasen und die strukturelle Modifikation der Target-Proteine zu PBP mit geringer Affinität gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika („resistente“ PBP). Andere Mechanismen beruhen auf der Expression mutierter Porine, die den Zugang von Antibiotika in die Zelle verwehren, und/oder der vermehrten Expression von Efflux-Pumpen, die eingedrungene Antibiotika aus der Zelle exportieren<sup>78</sup>.

### 2.5.1 $\beta$ -Lactamasen

$\beta$ -Lactamasen sind Enzyme, die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika zu Produkten, die keine antibakterielle Wirkung besitzen, abbauen, indem sie die Amidbindung des  $\beta$ -Lactam-Ringes hydrolytisch spalten<sup>79</sup>.  $\beta$ -Lactamasen wurden fast zeitgleich mit der Entdeckung des Penicillins entdeckt<sup>80</sup>. Gram-positive Bakterien sezernieren  $\beta$ -Lactamasen als lösliche Proteine in ihre Umgebung und reduzieren so die lokale Konzentration an biologisch wirksamen Antibiotika. Gram-negative Bakterien sezernieren  $\beta$ -Lactamasen in den periplasmatischen Raum und verhindern, dass die Antibiotika ihr Target erreichen und die Murein-Biosynthese inhibieren.  $\beta$ -Lactamasen werden auf der Basis homologer Sequenzen in der Primärstruktur in vier Klassen (A, B, C und D) eingeteilt<sup>81,82</sup>.  $\beta$ -Lactamasen der Klassen A, C und D sind Enzyme mit einem Serin-Rest im aktiven Zentrum.  $\beta$ -Lactamasen der Klasse B sind  $Zn^{2+}$ -abhängige Enzyme, die durch EDTA inhibiert werden<sup>83</sup>. Sowohl PBP als auch Serin- $\beta$ -Lactamasen gehören zur Gruppe der mit Penicillinen interagierenden Enzyme mit einem Serin-Rest im aktiven Zentrum. Das aktive Zentrum der Serin- $\beta$ -Lactamasen wird ebenfalls von den drei konservierten Motiven (s. vorigen Abschnitt) gebildet. Auch Serin- $\beta$ -Lactamasen binden  $\beta$ -Lactam-Antibiotika kovalent an das Serin im Motiv 1<sup>55,84</sup>. Aufgrund dieser strukturellen Gemeinsamkeiten wird vermutet, dass PBP und Serin- $\beta$ -Lactamasen von einem „Ur-PBP“ abstammen und phylogenetisch verwandt sind<sup>85,86,87</sup>. Im Unterschied zu PBP zeigen  $\beta$ -Lactamasen jedoch eine wesentlich höhere Effizienz  $\beta$ -Lactam-Antibiotika umzusetzen, da die Geschwindigkeitskonstante  $k_3$  einen Wert von größer  $5.000\text{ s}^{-1}$  (Halbwertszeit  $2,3 \times 10^{-6}\text{ min}$ ) erreichen kann und die Konstante  $k_2/K$  sich dem Wert nähert, mit der ein Molekül in das aktive Zentrum eines Enzyms diffundieren kann ( $\approx 10^8\text{ l mol}^{-1}\text{ s}^{-1}$ )<sup>83,88</sup>.

### 2.5.2 PBP mit geringer Affinität gegenüber $\beta$ -Lactam-Antibiotika

Resistenzen gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, die durch modifizierte PBP mit geringer Affinität gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika vermittelt werden, kommen insbesondere bei Gram-positiven Bakterien vor<sup>89</sup>. Bei *Streptococcus pneumoniae* (Erreger von Lungenentzündungen) und *Neisseria gonorrhoeae* (Gram-negativer Erreger der Geschlechtskrankheit Gonorrhöe) beruht die Resistenz gegen Penicilline und Cephalosporine auf Mutationen chromosomal codierter PBP<sup>90,91,92</sup>, insbesondere in der Nähe der konservierten Motive in der Penicillin-bindenden Domäne eines PBP<sup>93,94,95</sup>. Andere Bakterien, wie z.B.  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-resistente Enterokokken und Methicillin-resistente Stämme von *Staphylococcus aureus* (Erreger von eitrigen Entzündungen äußerer und innerer Organe), produzieren zusätzliche PBP, die von sensitiven Stämmen nicht oder nur in geringen Mengen exprimiert werden und die eine geringe Affinität gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika besitzen<sup>89,96,97,98</sup>. PBP mit geringer Affinität unterscheiden sich von „sensitiven“ PBP in der Effizienz mit der ein PBP durch ein Penicillin oder Cephalosporin acyliert wird und damit die natürliche enzymatische Funktion des PBP inhibiert. Die  $k_2/K$ -Werte von PBP mit geringer Affinität zu  $\beta$ -Lactam-Antibiotika sind um den Faktor 3 – 1.000 kleiner als die der PBP von sensitiven Bakterien<sup>95,70,99,100</sup>.

### 2.5.3 Therapiemaßnahmen gegen $\beta$ -Lactamase-produzierende Bakterien

Zur Behandlung von Infektionen, die durch  $\beta$ -Lactamase-produzierende Bakterien verursacht werden, stehen prinzipiell zwei Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Zum einen werden  $\beta$ -Lactamase-stabile Penicilline oder Cephalosporine, die von  $\beta$ -Lactamasen in geringerer Anzahl pro Zeiteinheit umgesetzt werden, eingesetzt<sup>13</sup>. Zum anderen werden Penicilline mit breitem Wirkungsspektrum zusammen mit  $\beta$ -Lactamase-Inhibitoren verabreicht, um sicherzustellen, dass eine ausreichende Anzahl biologisch aktiver Penicilline zur Inhibierung der PBP zur Verfügung stehen<sup>101</sup>.  $\beta$ -Lactamase-Inhibitoren, z.B. Clavulansäure und Sulbactam, sind ebenfalls  $\beta$ -Lactame, die jedoch keine ausgeprägte, antibakterielle Wirkung besitzen.

## 2.6 Einsatz in der Veterinärmedizin

Keine andere Antibiotikagruppe ist so umfangreich halbsynthetisch modifiziert worden wie die der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika<sup>15</sup>. Daher stehen für eine Therapie zahlreiche Derivate, die sowohl gegen Gram-positive als auch Gram-negative Krankheitserreger wirken, zur Verfügung. Typische veterinärmedizinische Indikationsgruppen sind Euterentzündungen (Mastitiden), respiratorische Erkrankungen, bakterielle Diarrhöen, Klauenentzündungen und das MMA-Syndrom\*, wobei Penicilline und Cephalosporine aufgrund ihrer geringen Toxizität und ihrer guten bakteriziden Wirksamkeit als Mittel der ersten Wahl verwendet werden<sup>9,102</sup>. Bei

---

\* Mastitis (Euterentzündung), Metritis (Gebärmutterentzündung), Agalaktie (Milchmangel)

Milchvieh ist das Hauptanwendungsgebiet der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika die Prophylaxe und Behandlung von Mastitiden, die z.B. durch *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus* und coliforme Keime hervorgerufen werden<sup>103</sup>. Im Rahmen der Mastitis-Behandlung werden hoch dosierte Formulierungen direkt in den Euter injiziert (intramammär). Dies hat jedoch zur Folge, dass die Wirkstoffe auch in hohen Konzentrationen mit der Milch ausgeschieden werden.

### 2.6.1 Pharmakokinetik und Metabolismus

Verabreichte Antibiotika werden aus einem Organismus mehr oder weniger schnell ausgeschieden, wobei die wirkstoffspezifische Eliminationskinetik für die Ermittlung der Wartezeit herangezogen wird<sup>104</sup>. Die Konzentration des Wirkstoffes im Organismus geht mit zunehmender Wartezeit gegen Null bzw. sinkt unterhalb des festgesetzten MRL-Wertes.

$\beta$ -Lactam-Antibiotika werden nach Applikation in unterschiedlichem Maße reversibel an Plasma-Proteine des Blutes gebunden<sup>105</sup>, z.B. Ampicillin zu 17 % und Cloxacillin zu 97 %<sup>106</sup>. Parenteral und oral verabreichte Penicilline und Cephalosporine werden überwiegend über die Nieren ausgeschieden und zu einem Teil (10 – 55 %) metabolisiert<sup>8,106</sup>. Metabolite der Penicilline sind die entsprechenden Penicilloinsäuren und Penillosäuren<sup>107,108</sup>. Cephalosporine, die an C-3 einen  $\text{CH}_2$ -Acetoxy-Rest besitzen, werden in Milch und Muskelgewebe zu Desacetylverbindungen umgewandelt<sup>109,110</sup>. Weitere Abbauprodukte in Milch sind intramolekular gebildete Lactone (Abbildung 9) und Cephalosporin-Derivate mit hydrolysiertem  $\beta$ -Lactam-Ring<sup>110</sup>.

### 2.6.2 Toxizität und allergische Reaktionen

Penicilline und Cephalosporine sind Antibiotika, die im Allgemeinen gut vertragen werden. Bestimmte Cephalosporine unterscheiden sich jedoch von Penicillinen hinsichtlich ihres nephrotoxischen\* Potentials<sup>111</sup>. Insbesondere bei Kombination von bestimmten Cephalosporinen mit nephrotoxischen Aminoglykosid-Antibiotika kann es zu synergistischen Effekten kommen<sup>10</sup>.

Die häufigste Nebenwirkung der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika ist jedoch das Auftreten von allergischen Reaktionen, wobei Penicillin-Allergien überwiegen<sup>112</sup>.  $\beta$ -Lactam-Antibiotika können auf Grund ihres Molekulargewichtes keine Sensibilisierung induzieren. Antigene Determinanten sind proteingebundene Antibiotika, die während einer Therapie entstehen<sup>106</sup>. Die verabreichten Antibiotika binden kovalent an körpereigene Serum-Proteine<sup>113</sup>. Die bedeutendsten Immunogene sind Penicilloyl-Protein-Konjugate<sup>114,115</sup>, insbesondere mit Serumalbumin<sup>116</sup>. Die irreversible Bindung der Penicilline an Serumalbumin erfolgt, wie unter 2.2 beschrieben, unter Öffnung des  $\beta$ -Lactam-Ringes und der Bindung an  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysin-Resten.

---

\* nierentoxisch

Andere antigene Determinanten sind Penicillenyl- und Penicillamin-Protein-Konjugate, die in geringeren Konzentrationen gebildet werden<sup>117</sup>. Letztere entstehen aus Penicillensäuren und Penicillamin, die mit Thiol-Gruppen von Proteinen Disulfidbindungen ausbilden. Bei sensibilisierten Personen kann ein erneuter Kontakt mit proteingebundenen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika zu Überempfindlichkeitsreaktionen führen<sup>118</sup>. Penicilloyl-spezifische IgG\* und IgE wurden in Patienten mit Penicillin-Allergie zu 38 % bzw. 18 % nachgewiesen<sup>119</sup>. Serologische und immunologische Untersuchungen haben gezeigt, dass Antikörper in Seren von verschiedenen allergischen Individuen unterschiedliche Strukturen eines  $\beta$ -Lactam-Moleküls erkennen. Die Antikörper können die Seitenkette spezifisch erkennen oder sowohl das Penicillin-Molekül als auch das Penicilloyl-Molekül binden<sup>120,121</sup>. Kreuzreaktivitäten zwischen Penicillinen und Cephalosporinen können auf Grund gemeinsamer Strukturmerkmale ebenfalls auftreten<sup>122,123</sup>.

Rückstände von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Lebensmitteln können bei sensibilisierten Personen allergische Reaktionen auslösen. Abhängig vom individuellen Grad der Sensibilisierung reichen die Reaktionen von Hautausschlag (Urtikaria) bis hin zum anaphylaktischen Schock<sup>124,125</sup>. Derartige Fälle sind jedoch sehr selten und scheinen lediglich extrem sensitive Individuen zu betreffen, so dass das Auslösen von allergischen Reaktionen durch Antibiotika-Rückstände im Konzentrationsbereich der festgesetzten MRL-Werte (z.B. je nach  $\beta$ -Lactam 4 - 125  $\mu$ g pro kg Milch), die im Vergleich zu therapeutischen Dosen (ca. 1 - 2 g pro Individuum) extrem niedrig sind, als wenig wahrscheinlich gilt<sup>126,127</sup>. Trotz der geringen Anzahl an betroffenen Personen verdeutlichen die aufgetretenen Fälle an allergischen Reaktionen die Notwendigkeit, Lebensmittel regelmäßig auf Penicillin- und Cephalosporin-Rückstände zu untersuchen.

### 2.6.3 Rechtliche Regelungen für Tierarzneimittelrückstände

Tierarzneimittel dürfen bei lebensmittelliefernden Tieren nur angewendet werden, wenn die darin enthaltenen pharmakologisch wirksamen Stoffe in den Anhängen I bis III der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates „Zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs“ aufgeführt sind<sup>5</sup>. Für die Stoffe im Anhang I wurden auf der Basis einer wissenschaftlichen, toxikologischen Bewertung Rückstandshöchstmengen, MRL-Wert (s. S. 1), festgelegt, bei denen sichergestellt ist, dass die Rückstände keinerlei Gefahr für die menschliche Gesundheit darstellen. Stellt sich nach der Prüfung eines pharmakologisch wirksamen Stoffes heraus, dass es im Interesse des Schutzes der öffentlichen Gesundheit nicht notwendig ist, einen MRL-Wert festzusetzen, so wird dieser Stoff in das Verzeichnis des An-

---

\* Ig, Immunglobulin

hangs II aufgenommen. Für Stoffe im Anhang III wurden aufgrund unvollständiger Datenlage vorläufige MRL-Werte festgelegt, die maximal fünf Jahre gelten. Während dieser Zeitspanne muss weiteres Material für eine abschließende Bewertung vorgelegt werden. Die Verordnung enthält noch einen Anhang IV, in dem Stoffe aufgelistet sind, für die keine MRL-Werte festgelegt werden können, da Rückstände des betreffenden Stoffes in Lebensmitteln tierischen Ursprungs in jeder Konzentration eine potentielle Gefahr für die Gesundheit des Verbrauchers darstellen. Die Anwendung dieser pharmakologisch wirksamen Stoffe ist bei lebensmittelliefernden Tieren innerhalb der EU verboten ebenso wie der Import von Lebensmitteln, die entsprechende Rückstände enthalten.

In Tabelle 1 sind die MRL-Werte für Milch der in dieser Arbeit verwendeten Penicilline und Cephalosporine aufgelistet. Penicilline und Cephalosporine sind aufgrund ihrer geringen Toxizität Beispiele für pharmakologisch wirksame Stoffe, deren MRL-Werte nicht ausschließlich auf der Basis toxikologischer Daten festgelegt wurden<sup>128</sup>. Da bereits geringe Penicillin-Konzentrationen das Wachstum von Bakterien, die für die Herstellung von fermentierten Milchprodukten verwendet werden, hemmen, stand der Einfluss auf lebensmitteltechnologische Produktionsabläufe im Vordergrund<sup>128</sup>. Bei den Cephalosporinen wurden die MRL-Werte auf der Basis der mikrobiologisch annehmbaren Tagesdosis, die sich auf mögliche antimikrobielle Wirkung gegenüber der menschlichen Darmflora bezieht, berechnet<sup>129,130</sup>. Enthalten vom Tier gewonnene Lebensmittel Rückstände oberhalb der festgelegten MRL-Werte, dürfen diese nach § 15 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenstandegesetzes (LMBG) gewerbsmäßig nicht in den Verkehr gebracht werden<sup>131</sup>. Weiterhin schreibt § 15 LMBG vor, dass vom Tier gewonnene Lebensmittel gewerbsmäßig nur gewonnen und in den Verkehr gebracht werden dürfen, wenn die festgelegten Wartezeiten eingehalten worden sind.

**Tabelle 1: MRL-Werte der in dieser Arbeit eingesetzten Penicilline und Cephalosporine<sup>5,132</sup>.**

Antibiotikum	Tierart	Zielgewebe	MRL-Wert [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
Benzympenicillin	Alle zur Lebensmittelerzeugung genutzten Arten	Milch	4
Ampicillin	Alle zur Lebensmittelerzeugung genutzten Arten	Milch	4
Amoxicillin	Alle zur Lebensmittelerzeugung genutzten Arten	Milch	4
Cloxacillin	Alle zur Lebensmittelerzeugung genutzten Arten	Milch	4
Cephalexin	Rinder	Milch	100
Cefoperazon	Rinder	Milch	50

### 3 Analytik von $\beta$ -Lactam-Antibiotika-Rückständen

Das erste veterinärmedizinische Anwendungsgebiet der Penicilline war die Behandlung von Mastitiden bei milchliefernden Kühen<sup>133,134</sup>. Da Penicillin-Rückstände in der Milch das Wachstum der für die Herstellung von Milchprodukten verwendeten Starterkulturen hemmten, erkannte die milchverarbeitende Industrie in den 50er Jahren die Notwendigkeit Milch auf Antibiotika-Rückstände zu untersuchen<sup>4</sup>. Für den Nachweis wurden mikrobiologische Hemmstofftests verwendet<sup>135</sup>. Seitdem sind eine Vielzahl von Analyseverfahren zum Nachweis oder für eine quantitative Bestimmung von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-Rückständen in Lebensmitteln entwickelt worden<sup>136,137</sup>. Diese können in zwei Kategorien eingeteilt werden. Zum einen gibt es Screening-Verfahren, die eine Ja/Nein-Entscheidung erlauben, ob in einer Probe Rückstände oberhalb einer bestimmten Konzentration vorhanden sind oder nicht. Bestimmte Screening-Verfahren erlauben zusätzlich eine Identifizierung der Wirkstoffklasse. Zum anderen gibt es quantitative Analyseverfahren, die eine Identifizierung und Quantifizierung der Wirkstoffe erlauben. Eine eindeutige Identifizierung der Wirkstoffe kann jedoch nur mit chemisch-physikalischen Analyseverfahren erfolgen.

#### 3.1 Screening-Verfahren

Screening-Verfahren für Antibiotika-Rückstände basieren auf Wechselwirkungen zwischen den Analyt-Molekülen und bakteriellen Zellen (Hemmstofftests) oder spezifischen Bindungskomponenten, wie Antikörpern, Enzymen und Rezeptoren. Während bei Hemmstofftests das Wirkungsprinzip in den Vordergrund tritt, d.h. die Hemmung des Wachstums von Bakterien und damit der Nachweis von Rückständen kann sowohl auf spezifische Wechselwirkungen eines Wirkstoffes mit seinem Target, z.B. Inhibierung der DD-Transpeptidasen durch  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, als auch auf unspezifische Wirkungen, z.B. Denaturierung von Proteinen durch Desinfektionsmittel, überwiegt bei den anderen Screening-Tests, wie immunchemische Tests etc., das Wirkstoffprinzip. Bei letzteren basiert der Nachweis ausschließlich auf Reaktionen zwischen den Analyt-Molekülen und den spezifischen Bindungskomponenten, die durch ein geeignetes Verfahren oder eine chemische Reaktion sichtbar gemacht werden müssen.

##### 3.1.1 Mikrobiologische Hemmstofftests

Mikrobiologische Hemmstofftests sind auch heute noch die bedeutendsten Screening-Verfahren für den Nachweis von Antibiotika-Rückständen und anderer Hemmstoffe in Lebensmitteln tierischer Herkunft. Für den Nachweis in Milch und Fleisch sind zahlreiche Testsysteme kommerziell erhältlich, wie der BRT-Hemmstofftest<sup>138</sup>, Delvotest<sup>139</sup>, Copan Milk Test<sup>140</sup>, Eclipse<sup>141</sup> und BR-Test<sup>142</sup> für Milch und der PremiTest<sup>143</sup> für Fleisch. In einem Hemmstofftest wird die zu untersuchende Probe, z.B. Milch oder Fleischsaft, auf ein mit Bak-



terien beimpftes Nährmedium gegeben. Je nach Testsystem wird die Probe direkt zugegeben oder in Form eines Filterpapierblättchens, das zuvor in die Probe getaucht wurde<sup>144</sup>. Anschließend wird das mit den Proben beschickte Nährmedium bebrütet, wobei sich die Bakterien vermehren und eine Trübung des Nährmediums bewirken. Sind Antibiotika-Rückstände oder andere Hemmstoffe in der Probe vorhanden, so unterbleibt das Wachstum der Bakterien, was visuell detektiert werden kann. Bei klassischen Hemmstofftests, wie dem Blättchentest in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG<sup>144</sup>, bildet sich um Hemmstoff-positive Proben eine klare Zone (Hemmzone oder Hemmhof). Die Breite des Hemmhofes hängt unter anderem von Konzentration und Art des Hemmstoffes ab.

Bei den kommerziell erhältlichen Hemmstofftests wird dem Nährmedium ein Farbindikator zugesetzt, der durch Stoffwechselprodukte der Bakterien in eine andere Farbe überführt wird. Der bekannteste Vertreter derartiger Testsysteme ist der Brillantschwarz-Reduktionstest, der den Redoxindikator Brillantschwarz enthält<sup>145</sup>. Wenn die Probe Hemmstoffe enthält, werden die Bakterien im Wachstum gehemmt und der Redoxindikator behält seine blau-schwarze Farbe. Enthält die Probe keine Hemmstoffe, so wird der Redoxindikator durch Stoffwechselprodukte der Bakterien zur gelben Stufe reduziert. Ein weiteres Beispiel für Testsysteme mit Farbindikatoren ist der Delvotest, der den pH-Indikator Bromkresolpurpur enthält<sup>146</sup>. Ist die Probe frei von Hemmstoffen, so ist aufgrund der mit dem Wachstum der Bakterien einhergehenden Säuerung des Mediums, ein Farbumschlag von violett nach gelb zu beobachten.

Mikrobiologische Hemmstofftests haben je nach analytischer Fragestellung diverse Vor- und Nachteile. Vorteile sind, dass diese Tests einfach durchgeführt werden können, eine große Anzahl an Wirkstoffen erfasst wird und größere Probenserien untersucht werden können. Nachteilig ist jedoch, dass kritische Nachweislücken bestehen und eine Identifizierung einer Wirkstoffklasse nur unter Einsatz von verschiedenen Bakterienstämmen und Nährböden möglich ist.  $\beta$ -Lactam-Antibiotika können eventuell durch den Zusatz von  $\beta$ -Lactamasen von anderen Hemmstoffen unterschieden werden<sup>147</sup>. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Nährmedien mehrere Stunden bebrütet werden müssen bevor eine Auswertung erfolgen kann.

### 3.1.2 Immunchemische Tests

Antikörper werden, aufgrund ihrer Fähigkeit spezifische Strukturen eines Moleküls (Antigen) nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip zu erkennen und zu binden, in immunchemischen Tests als analytische Reagenzien verwendet<sup>148</sup>. Die gebildeten Antigen/Antikörper-Komplexe werden durch markierte Reagenzien sichtbar gemacht. Je nach Testsystem werden entweder Antikörper oder Antigene markiert. Als Marker werden radioaktive Isotope (Radioimmunoassay, RIA), Enzyme (Enzymimmunoassay, EIA) oder fluoreszierende Substanzen verwendet.

Vorraussetzung für eine exakte Messung der gebildeten Antigen/Antikörper-Komplexe ist, dass markierte Antigene oder Antikörper, die keinen Komplex gebildet haben, abgetrennt werden ohne damit den Gleichgewichtszustand zu beeinflussen. Bei RIA mit radioaktivmarkierten Antigenen kann dies z.B. durch Immunpräzipitation erfolgen<sup>149</sup>. Wird einer der Reaktionspartner an ein Trägermaterial immobilisiert, z.B. an Mikrotiterplatten wie beim Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), können überschüssige Reagenzien durch einen einfachen Waschschrift abgetrennt werden<sup>150</sup>. Für eine ausführliche Darstellung allgemeiner Prinzipien von enzymimmunchemischen Analysenverfahren für antibakteriell wirksame Substanzen sei auf die zitierte Literatur<sup>4,151</sup> verwiesen. Eine Zusammenstellung der von 1983 bis 2000 publizierten Arbeiten, welche die Gewinnung von Antikörpern gegen Antibiotika beschreiben, wurde von Beier und Stanker<sup>152</sup> veröffentlicht.

Das Immunsystem von Mensch und Tier antwortet mit der Produktion von Antikörpern, wenn ein Molekül eine gewisse Komplexität und molekulare Mindestgröße von 6.000 Da besitzt<sup>153</sup>. Das Molekulargewicht der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika ist kleiner als 1.000 Da, so dass sie an ein Trägerprotein gebunden werden müssen, um immunogen zu wirken. Die Empfindlichkeit des  $\beta$ -Lactam-Ringes gegenüber Nucleophilen stellt bei der Entwicklung von Immunoassays für Penicilline ein Problem dar, weil es bereits während der Herstellung der Penicillin/Protein-Konjugate sowie nach der Immunisierung der Versuchstiere zu chemischen Abbaureaktionen der Penicilline kommen kann (s. 2.2 ff). Da insbesondere Penicilloyl/Protein-Konjugate im Vergleich zu Penicillin/Protein-Konjugaten stärker immunogen sind, können die gewonnenen Antikörper eine höhere Affinität zu Penicillinen mit geöffnetem  $\beta$ -Lactam-Ring zeigen<sup>154,155,156</sup>. Für den Nachweis von Penicillinen in Lebensmitteln werden jedoch Antikörper benötigt, die „intakte“ Penicilline erkennen, weil die MRL-Werte für letztere festgelegt sind.

Einigen Arbeitsgruppen ist es jedoch gelungen Penicillin-spezifische Antikörper zu gewinnen. Die von Usleber *et al.*<sup>157</sup>, Dietrich *et al.*<sup>158</sup> und Strasser<sup>159</sup> beschriebenen Antikörper zeigen hohe Kreuzreaktivitäten gegenüber einer Vielzahl veterinärmedizinisch-relevanter Penicilline und keine Kreuzreaktivitäten gegenüber Penicilloyl-Derivaten. Mit einem von Strasser<sup>159</sup> entwickelten sehr sensitiven direkten ELISA für Penicilline konnten insbesondere Benzylpenicillin, Ampicillin, Amoxicillin, Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin und Nafcillin in Milch ab einem Konzentrationsbereich von 1 – 6 ng/ml nachgewiesen werden. Für einen Nachweis von sowohl Penicillinen als auch Cephalosporinen können Penicillin-spezifische Antikörper jedoch nicht verwendet werden, weil sie in der Regel keine bzw. geringe Kreuzreaktivitäten gegenüber Cephalosporinen zeigen<sup>158,160</sup>.

Beispiele für kommerziell erhältliche immunochemische Analysenverfahren für den Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Milch sind der Parallax- (Idexx Laboratories Inc., Maine, USA) und der Fluorophos BetaScreen-Test (John Morris Scientific Pty. Ltd., Willoughby, Australien). Beim Parallax-Test handelt es sich um einen festphasengebundenen Fluoreszenz-Immunoassay<sup>161</sup>. Beim Fluorophos BetaScreen handelt es sich um einen enzymimmunochemischen Röhrchenschnelltest, bei welchem Anti-Penicillin-Antikörper in einem Röhrchen immobilisiert sind<sup>162</sup>. Penicilline aus der Probe konkurrieren mit enzymmarkierten Penicillinen um die Bindestellen der immobilisierten Antikörper. Nach Zugabe einer Substratlösung wird durch die Antikörper-gebundenen, enzymmarkierten Penicilline eine fluoreszierende Substanz gebildet, die fluorimetrisch bestimmt wird.

### 3.1.3 Tests mit PBP

Die in Tabelle 2 aufgeführten Screening-Tests verwenden PBP als spezifische Bindungskomponenten, um Penicillin- und Cephalosporin-Rückstände in Lebensmitteln tierischer Herkunft nachzuweisen (Protein-Bindungstests).

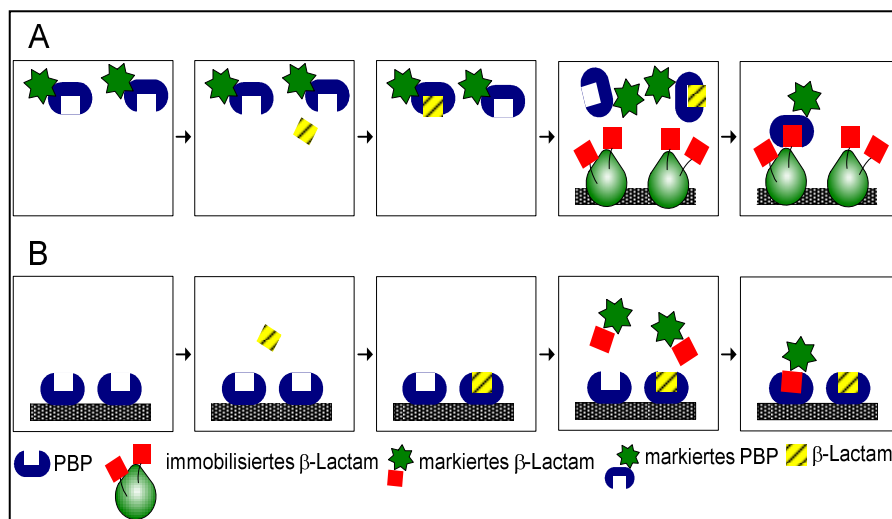
**Tabelle 2: Protein-Bindungstests für den Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Milch.**

Bezeichnung	Format	Detektionsprinzip	Lit.
$\beta$ -Star*	Streifenfest	Gold-markiertes PBP, immobilisiertes $\beta$ -Lactam	163
Charm II*	Vgl. RIA	Radioaktiv-markiertes Penicillin, immobilisierte Bakterienpräparationen	164
Delvo-X-Press*	Röhrchenschnelltest	Enzym-markiertes PBP, immobilisiertes $\beta$ -Lactam	4,165
-	Partikel-Filtrations-Assay	Fluorescein-markiertes PBP, immobilisiertes $\beta$ -Lactam	166
Snap*	Filtrationstest	Enzym-markiertes PBP, immobilisiertes $\beta$ -Lactam	4,167

\*Bei den gekennzeichneten Tests handelt es sich um kommerziell erhältliche Screening-Tests

Basis für Protein-Bindungstests ist, dass PBP und  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, wie unter 2.4 beschrieben, Konjugate bilden, die aufgrund ihrer Stabilität relativ einfach mit markierten PBP oder markierten  $\beta$ -Lactam-Antibiotika nachgewiesen werden können. Prinzipiell entsprechen Aufbau und Durchführung von Protein-Bindungstests den bekannten immunochemischen Verfahren, wie ELISA oder RIA. Da Protein-Bindungstests jedoch keine Antikörper verwenden, werden sie nicht den immunochemischen Verfahren zugeordnet. Bei den Bindungstests konkurrieren a) Rückstände in der Probe und markierte  $\beta$ -Lactam-Antibiotika um die „Penicil-

lin-Bindestellen“ immobilisierter PBP, oder b) Rückstände und immobilisierte  $\beta$ -Lactam-Antibiotika konkurrieren um die „Penicillin-Bindestellen“ markierter PBP (Abbildung 16). Charakteristisch für Protein-Bindungstests ist, dass die zu analysierende Probe und PBP in einem ersten Inkubationsschritt zusammengegeben werden. Sind in der Probe Antibiotika-Rückstände vorhanden, so werden diese von den PBP gebunden und die PBP können im zweiten Inkubationsschritt keine weiteren  $\beta$ -Lactam-Antibiotika binden. Detektiert werden immer nur die PBP, die im ersten Inkubationsschritt keine  $\beta$ -Lactam-Antibiotika gebunden haben. Allgemein wird ein derartiges Testformat auch als nicht-kompetitiver Inhibierungs-Assay bezeichnet.



**Abbildung 16: Prinzipieller Aufbau von Protein-Bindungstests für den Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. A: Test mit markierten PBP und immobilisierten  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, B: Test mit immobilisierten PBP und markierten  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Erläuterungen siehe Text.**

Einen Sonderfall unter den Protein-Bindungstests stellt der Penzym-Test dar, da es sich um einen enzymatischen Test handelt<sup>168</sup>. Während die in Tabelle 2 aufgeführten Protein-Bindungstests auf der Visualisierung der PBP/ $\beta$ -Lactam-Antibiotikum-Konjugate beruhen, basiert der Penzym-Test auf dem Nachweis der enzymatischen Aktivität einer DD-Carboxypeptidase. Vergleichbar mit der Reaktion *in vivo* (s. 2.3.2), katalysiert die DD-Carboxypeptidase die hydrolytische Abspaltung des terminalen D-Alanins aus dem als Substrat zugesetztem Tripeptid  $N\alpha, N\epsilon$ -(Acetyl)<sub>2</sub>-L-Lys-D-Ala-D-Ala. Das freigesetzte D-Alanin wird in einer zweiten enzymatischen Reaktion durch eine D-Aminosäureoxidase zu Wasserstoffperoxid und Pyruvat umgesetzt. Eine Peroxidase setzt in einer dritten enzymatischen Reaktion das gebildete Wasserstoffperoxid und ein chromogenes Substrat zu einem orangegefärbten Farbstoff um. Wird die DD-Carboxypeptidase durch  $\beta$ -Lactam-Antibiotika inhibiert, so wird kein D-Alanin freigesetzt, und die weiteren enzymatischen Reaktionen unterbleiben. Als Konsequenz wird in Rückstands-positiven Proben kein Farbumschlag beobachtet.

### 3.1.4 Tests mit $\beta$ -Lactamasen

Ein interessanter Ansatz für die Entwicklung von Screening-Tests für den Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika ist die Verwendung von  $\beta$ -Lactamasen als spezifische Bindungskomponenten. Chambers *et al.*<sup>169</sup> haben einen kompetitiven Assay im Mikrotiterplatten-Format entwickelt, bei welchem  $\beta$ -Lactamasen in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte immobilisiert waren und  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in der Probe mit Antikörpern, die an das aktive Zentrum der  $\beta$ -Lactamasen gebunden haben, um die  $\beta$ -Lactam-spezifischen Bindestellen der  $\beta$ -Lactamasen konkurrierten. Mit diesem Assay konnten  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, die einen stabilen Enzym/Substrat-Komplex bilden, nachgewiesen werden.

### 3.1.5 Vorteile von Screening-Tests

Screening-Tests finden eine breite Anwendung in rückstandsanalytischen Labors, insbesondere für ein Screening größerer Probenserien. Sie sind relativ einfach durchzuführen und in der Lage, geringe Rückstandsmengen qualitativ nachzuweisen. Milchproben können z.B. ohne Probenvorbereitung untersucht werden<sup>162,165</sup>, während Rückstände aus Fleischproben extrahiert werden müssen. Der Arbeitsaufwand für Fleischproben hält sich jedoch im Vergleich zu chemisch-physikalischen Analysenverfahren in Grenzen (s. u.), wie beim PremiTest, bei welchem es ausreicht Fleischsaft mittels einer Knoblauchpresse zu gewinnen<sup>170</sup> oder beim Charm II-Test für den Nachweis von Chloramphenicol in Fleisch, bei welchem es ausreicht eine Probe mit einem Puffer zu extrahieren<sup>171</sup>.

Die Arbeitsgruppe „Pharmakologisch wirksame Stoffe“ der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker) hat die kommerziell erhältlichen Screening-Verfahren für den Nachweis von Antibiotika und anderer Tierarzneimittel in einer Broschüre zusammengestellt<sup>172</sup>. Interessanterweise ist kein Screening-Test für  $\beta$ -Lactam-Antibiotika im Mikrotiterplatten-Format, mit dem bis zu 96 Proben parallel untersucht werden können, kommerziell erhältlich.

## 3.2 Chemisch-physikalische Analysenverfahren

Wie im vorigen Kapitel erläutert, erlauben Screening-Verfahren in Proben mit unbekanntem Rückstandsgehalt einen Nachweis von Hemmstoffen oder einen gruppenspezifischen Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Eine Identifizierung und Quantifizierung eines bestimmten Penicillins oder Cephalosporins ist jedoch nicht möglich. Letzteres ist aber bei Analysen, die rechtliche Konsequenzen für einen Hersteller, Importeur etc. von Lebensmitteln haben, unerlässlich, z.B. bei Proben, die im Rahmen der amtlichen Überwachung untersucht werden. Innerhalb der EU sind die amtlichen Kontrolllaboratorien dazu verpflichtet, positive Screening-Befunde durch Bestätigungsmethoden abzusichern<sup>173</sup>. Bestätigungsmethoden müssen Aufschluss über die chemische Struktur der organischen Rückstände geben, wobei spektrometrische Methoden nur nach chromatographischer Trennung in Betracht kommen<sup>173</sup>.

Die „ideale“ Methode sollte möglichst alle Vertreter einer Wirkstoffgruppe vollständig erfassen können (Multimethode). Die unterschiedlichen chemisch-physikalischen Eigenschaften (Löslichkeit, Polarität, reversible Bindung an Proteinen) der einzelnen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika erschweren die gleichzeitige und vollständige oder zumindest reproduzierbare Extraktion aller veterinärmedizinisch relevante Penicilline und Cephalosporine, die Voraussetzung für eine exakte Quantifizierung.

Die am häufigsten verwendete Methode zur Quantifizierung der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika ist die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, engl. high performance liquid chromatography)<sup>136,174</sup>. Die etablierten HPLC-Verfahren mit UV-, Diodenarray- oder Fluoreszenzdetektion (klassische HPLC-Verfahren) werden immer mehr von flüssigkeitschromatographischen Verfahren mit massenspektrometrischer Detektion (LC/MS) verdrängt<sup>175</sup>. Der Vorteil der LC/MS liegt in der Möglichkeit Moleküle ohne vorausgehende Derivatisierung sehr empfindlich und sehr selektiv nachweisen zu können. Im nachfolgenden wird daher vornehmlich auf die LC/MS eingegangen. Hinsichtlich klassischer HPLC-Verfahren<sup>176,177,178,179,180,181,182,183</sup> und anderer Methoden auf der Basis der Gaschromatographie<sup>184</sup>, Dünnschichtchromatographie<sup>185</sup> und Elektrophorese<sup>186</sup> sei auf die zitierte Literatur und die Übersichtsartikel<sup>174,187</sup> verwiesen.

### 3.2.1 Probenvorbereitung

Bevor eine Probe analysiert werden kann, ist eine mehr oder weniger aufwendige Probenvorbereitung nötig. Während feste Proben zunächst mechanisch zerkleinert werden, werden flüssige Proben gut durchgemischt. In einer typischen Probenvorbereitung werden die Antibiotika anschließend aus der Probenmatrix extrahiert, Proteine und Fette abgetrennt und die extrahierten Rückstände mittels Festphasenextraktion angereichert<sup>175</sup>.

Als Extraktionsmittel für  $\beta$ -Lactam-Antibiotika hat sich in der Rückstandsanalytik Acetonitril bewährt, da es gleichzeitig zur Extraktion der Analyten und zur Abtrennung von Proteinen verwendet werden kann<sup>184,188,189,190,191</sup>. Ein weiterer Vorteil von Acetonitril ist, dass es als „releasing solvent“ Penicilline, die an Proteinen adsorbiert sind, freisetzen kann, so dass sowohl reversibel an Proteine gebundene Rückstände als auch Rückstände, die nicht an Proteine gebunden sind, extrahiert werden können<sup>178,192</sup>. Eine Entfettung kann durch organische Lösungsmittel wie Hexan<sup>193</sup>, Isooctan<sup>194</sup> und Ethylacetat<sup>195</sup> erfolgen. Für die Festphasenextraktion werden vornehmlich C<sub>18</sub>-modifizierte Kieselgele verwendet<sup>179,190,191,193,196</sup>, aber auch andere Festphasen wie Ionenaustauscher<sup>184,197</sup> oder Restricted-Access-Materials<sup>178</sup> haben sich bewährt. Restricted-Access-Materials bieten den Vorteil, dass in einem Schritt die Analyten durch Verteilungschromatographie angereichert und Matrixkomponenten durch Ausschlusschromatographie abgetrennt werden können.

### 3.2.2 LC-Verfahren mit massenspektrometrischer Detektion (LC/MS)

In Tabelle 3 sind neuere in der Literatur beschriebene Multi-Methoden für die quantitative Bestimmung von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika mittels LC/MS aufgeführt. Mit Ausnahme der von Becker *et al.*<sup>198</sup> beschriebenen Methode, in der eine Phenyletherphase eingesetzt wird, werden C<sub>18</sub>-modifizierte Kieselgele als stationäre Phasen für die flüssigchromatographische Trennung der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika verwendet. Als Ionisationstechnik wird fast ausschließlich die Electrospray Ionization (ESI) verwendet, um zunächst Quasimolekülonen zu erzeugen. Als Massenanalytoren werden in der Mehrzahl Triple-Quadrupol-Geräte verwendet, wobei das erste Quadrupol zur Massenanalyse der Quasimolekülonen verwendet wird. Das zweite Quadrupol dient als Kollisionskammer, um aus den Quasimolekülonen Fragment-Ionen zu erzeugen, die für eine Identifizierung der  $\beta$ -Lactame herangezogen werden. Das dritte Quadrupol dient zur Massenanalyse der Fragment-Ionen. Als Massenanalysator findet die Ionen-Falle (Ion-Trap) ebenfalls Verwendung.

**Tabelle 3: LC/MS-Bestätigungsverfahren für  $\beta$ -Lactam-Antibiotika.**

Analyt <sup>#</sup>	Matrix	Detektion	Lit.
Desacetylcephapirin, Cephapirin, AMOXI, Pen G, OXA, CLOXA, NAF, DICLOXA, DCCD	Niere	ESI- MS <sup>n</sup> (Ion-Trap)	<sup>196</sup>
AMPI, Cephapirin, Cephalexin, Cefquinom, Cefazolin, Pen G, Pen V, OXA, CLOXA, DICLOXA, NAF	Muskelfleisch, Niere	ESI-MS-MS (TQ)	<sup>198</sup>
AMOXI, Cephapirin, Cephalin, AMPI, Ceftiofur, Pen G, Pen V, OXA, CLOXA, DICLOXA, NAF	Milch	ESI-MS (Q)	<sup>199</sup>
Pen G, Pen V, OXA, CLOXA, NAF, DICLOXA	Leber, Niere, Muskelfleisch	ESI-MS-MS (TQ)	<sup>197</sup>
AMOXI, AMPI, CLOXA, OXA, Pen G, Cephalonium	Milch	ESI-MS-MS (TQ)	<sup>193</sup>
Cephalexin, AMPI, AMOXI, CEPHA, Cefazolin, Ceftiofur, Pen G, OXA, CLOXA, NAF, DICLOXA	Milch	ESI-MS-MS (TQ)	<sup>190</sup>
Pen G, AMPI, AMOXI, CLOXA, Cephapirin, Ceftiofur, Cefazolin	Milch	ESI-MS <sup>n</sup> (Ion-Trap)	<sup>191</sup>

<sup>#</sup>Abkürzungen: AMPI: Ampicillin, AMOXI: Amoxicillin, Pen G: Benzylpenicillin, OXA: Oxacillin, CLOXA: Cloxacillin, NAF: Nafcillin, DICLOXA: Dicloxacillin, DCCD: Desfuroylceftiofurcysteindisulfid, Pen V: Phenoxymethylpenicillin, API: Atmospheric Pressure Ionization, ESI: Electrospray Ionization, TQ: Triple-Quadrupol, Q: Quadrupol

## 4 Biosensor-Analysen

Bestandteile eines Biosensors sind biomolekulare Bindungspartner, die a) an einen Messwandler (Transducer) gebunden sind und b) den Analyt spezifisch binden<sup>200</sup>. Typische biomolekulare Bindungspartner sind z.B. Antikörper, Enzyme, Nucleinsäuren sowie pflanzliche, tierische oder bakterielle Zellen<sup>201</sup>. Bindet der biomolekulare Bindungspartner den Analyt, so wandelt der Transducer dieses „biologische Signal“ in ein messbares, elektrisches Signal um. Für bioanalytische Fragestellungen werden z.B. elektro-chemische, thermische, akustische und optische Transducer eingesetzt<sup>201</sup>. Der Vorteil von Biosensoren ist, dass Rezeptor/Ligand-Wechselwirkungen, wie biomolekulare Wechselwirkungen zwischen Antigenen und Antikörpern, Enzymen und Inhibitoren, Proteinen und DNA etc., verfolgt werden können, ohne einen der beteiligten Reaktionspartner markieren zu müssen<sup>202,203</sup>.

Biosensoren werden seit einigen Jahren vermehrt in der Lebensmittelanalytik eingesetzt, da Proben, die z.B. im Rahmen der Prozesskontrolle während der Herstellung eines Lebensmittels entnommen werden, ohne eine aufwendige Probenvorbereitung und chemische Derivatisierung der Analyten untersucht werden können<sup>204</sup>. Für den Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-Rückständen sind ebenfalls Biosensor-Assays entwickelt worden, wie der von Setlof *et al.*<sup>205</sup> entwickelte amperometrische Biosensor-Assay mit PBP, die auf einer Elektrode immobilisiert waren.

### 4.1 Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Biosensoren (SPR-Biosensoren)

Seit einigen Jahren werden optische Biosensoren auf der Basis der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR, engl. surface plasmon resonance) vermehrt auf dem Gebiet der Tierarzneimittelrückstandsanalytik eingesetzt<sup>206,207,224</sup>. Wie andere Biosensor-Techniken, erlauben SPR-Biosensoren einen markierungsfreien Nachweis von Rezeptor/Ligand-Wechselwirkungen. Bei einem SPR-Biosensor handelt es sich, vereinfacht dargestellt, um einen massensensitiven Brechungsindex-Detektor.

#### 4.1.1 Grundlagen der SPR

Oberflächen-Plasmone (SP, engl. surface plasmon) sind elektromagnetische Oberflächenwellen des Elektronengases in der Grenzfläche zwischen einem Metall und einem Dielektrikum<sup>\*208</sup>. Das Quant derartiger Plasmaschwingungen wird als Plasmon bezeichnet<sup>209</sup>. SP-Wellen können sowohl durch Licht als auch durch Elektronen angeregt werden, wobei mit der Anregung durch Licht eine Verstärkung des elektromagnetischen Feldes (Resonanzverstärkung) in der Grenzfläche verbunden ist. Im nachfolgenden wird nur die von Kretschmann und Raether<sup>210</sup> entwickelte experimentelle Anordnung zur Anregung von SP-Wellen durch Licht näher beschrieben (Kretschmann-Raether-Konfiguration), da der in dieser Arbeit

---

\* Ein Dielektrikum ist ein Stoff, der keine Elektrizität leitet.



verwendete SPR-Biosensor auf der Kretschmann-Raether-Konfiguration basiert. Hinsichtlich der anderen Möglichkeiten SP-Wellen anzuregen<sup>208,211</sup> und einer Zusammenstellung kommerziell-erhältlicher SPR-Biosensoren<sup>212</sup> sei auf die zitierte Literatur verwiesen.

Basis für die Anregung von SP-Wellen in der Kretschmann-Raether-Konfiguration ist das optische Phänomen der Totalreflexion in einem Prisma (Abbildung 17)<sup>208,213</sup>. Auf das Prisma ist eine dünne Metallschicht (Gold oder Silber) von ca. 50 nm aufgedampft und die Metallschicht steht im Kontakt mit einem Dielektrikum, mit geringerer optischer Dichte als der des Prismas (Wasser oder Luft). Als Metall wird in der Regel Gold eingesetzt, da es im Vergleich zu Silber weniger oxidationsempfindlich ist. Wird Licht oberhalb eines kritischen Winkels, dem Grenzwinkel der Totalreflexion, in das Prisma eingestrahlt, so wird das Licht an der Grenzfläche zur Metallschicht total reflektiert. Ein Teil des eingestrahnten Lichts geht jedoch in Form einer abklingenden Welle (evaneszenten Welle) in die Metallschicht über (Abbildung 17, gestrichelte Linie). Evaneszente Wellen sind Wellen, die ihre Feldmaxima in der Grenzfläche zwischen zwei Medien mit unterschiedlicher optischer Dichte haben und deren elektromagnetische Felder senkrecht zur Grenzfläche exponentiell abnehmen<sup>213</sup>. Ist das eingestrahlte Licht monochromatisch und p-polarisiert (Polarisationsebene parallel zur Einfallsebene), so kann unter einem bestimmten Einfallswinkel die evaneszente Welle mit dem Elektronengas der Goldschicht in Wechselwirkung treten und die SP-Wellen durch Resonanz anregen<sup>208</sup>. Diese angeregten SP-Wellen sind ebenfalls evaneszente Wellen, die in der Größenordnung einer halben Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes in das Dielektrikum „hineinstrahlen“ (Abbildung 17, blaue Linie)<sup>214</sup>.

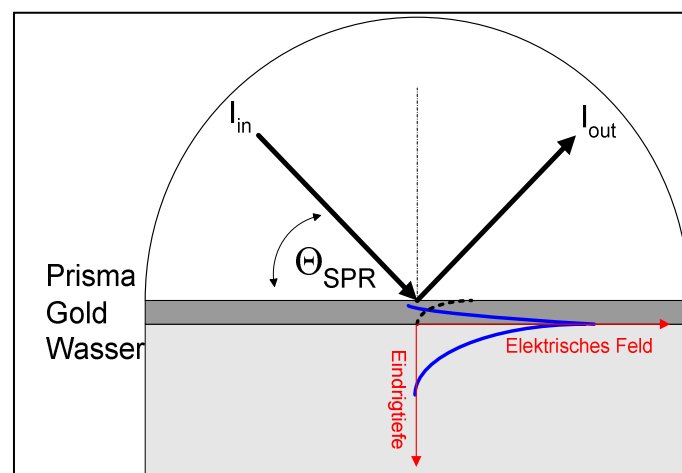


Abbildung 17: Kretschmann-Raether-Konfiguration zur Anregung von SP-Wellen unter den Bedingungen der Totalreflexion<sup>208</sup>. Die gestrichelte Linie deutet die evaneszente Welle an, die in die Metallschicht hineindringt und SP-Wellen durch Resonanz anregt<sup>215</sup>. Das exponentiell abklingende elektrische Feld der angeregten SP-Welle an der Grenzfläche Metall/Dielektrikum ist ebenfalls angedeutet. Da die SP-Wellen durch Resonanz angeregt werden, ist das elektrische Feld an der Metall/Dielektrikum-Grenzfläche verstärkt.

Da die SP-Wellen durch Resonanz angeregt werden, d.h. Energie und Impuls der Photonen werden auf die Plasmonen übertragen, verringert sich die Intensität des reflektierten Lichtes<sup>208</sup>. Die Verringerung der Intensität kann als Minimum im Intensitätsspektrum des reflektierten Lichtes detektiert werden, wenn der Reflexionsgrad (reflektierte Strahlungsintensität/ eingestrahlte Strahlungsintensität) in Abhängigkeit vom Einfallswinkel bestimmt wird (Abbildung 18). Am Grenzwinkel der Totalreflexion ( $\Theta_T$ ) wird das einfallende Licht an der Grenzfläche zur Metallschicht vollständig reflektiert. Unterhalb von  $\Theta_T$  wird das Licht teilweise reflektiert und teilweise von der Goldoberfläche adsorbiert. Oberhalb von  $\Theta_T$  wird das einfallende Licht von der Goldschicht absorbiert, wobei der Reflexionsgrad sinkt, ein Minimum erreicht und anschließend wieder ansteigt. Der zum Minimum gehörende Winkel  $\Theta_{SPR}$ , der größer als der Grenzwinkel der Totalreflexion ist, wird als SPR-Winkel bezeichnet, da eine Anregung von SP-Wellen nur unter diesem Winkel erfolgt.

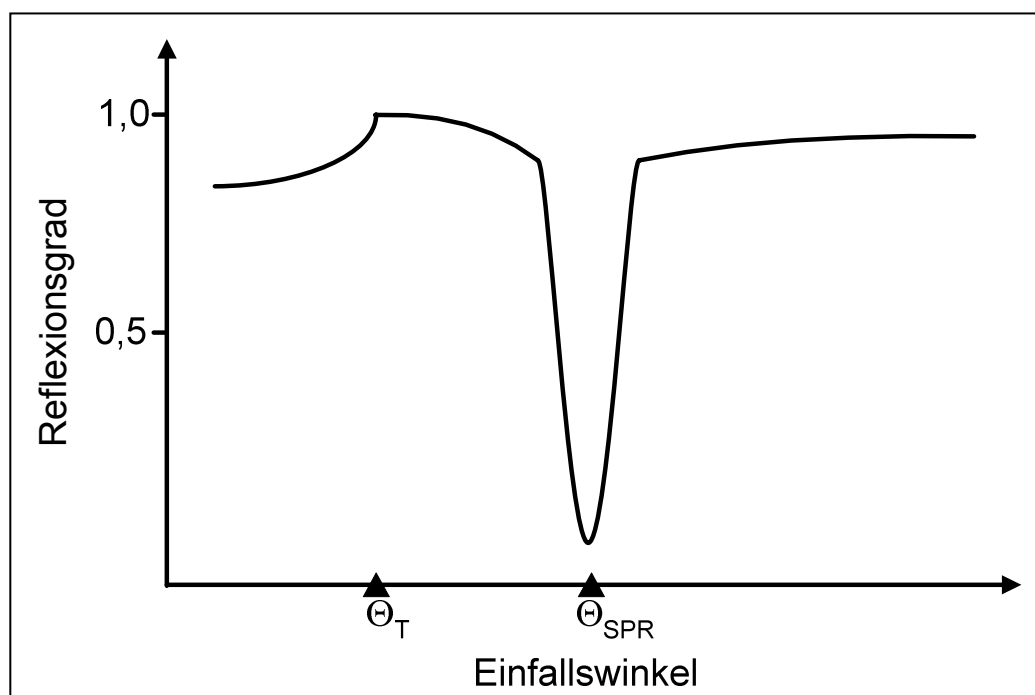


Abbildung 18: SPR-Kurve<sup>208</sup>.

#### 4.1.2 Aufbau eines SPR-Biosensors

Abbildung 19 zeigt ein Schema des in dieser Arbeit verwendeten Biosensors<sup>216</sup> (Biacore 3000) der Fa. Biacore. Lauf-Puffer und Reagenzien werden über zwei Spritzenpumpen zur SPR-Detektionseinheit transportiert. Die Reagenzien werden über einen automatischen Probengeber (Autosampler) in das System injiziert und über Kapillarschläuche mit dem Puffer zu einem Sensor-Chip transportiert. Herzstück des Biosensors ist die SPR-Detektionseinheit mit einem Gold-beschichteten Sensor-Chip aus Glas, auf welchem die biomolekulare Interaktionsanalyse erfolgt<sup>217</sup>. Der Sensor-Chip ist über ein Polymer, das den Brechungsindex nicht verändert, mit einem Prisma verbunden, so dass SP-Wellen wie im vorigen Abschnitt beschrieben angeregt werden können<sup>218</sup>. Die Intensitäten der reflektierten Lichtstrahlen werden mit einem Dioden-Array-Detektor gemessen und ein Computer berechnet anhand dieser Messwerte den SPR-Winkel. Der Biosensor ist so konstruiert, dass die Sensor-Chips nach einer Versuchsreihe einfach ausgetauscht und durch neue ersetzt werden können.

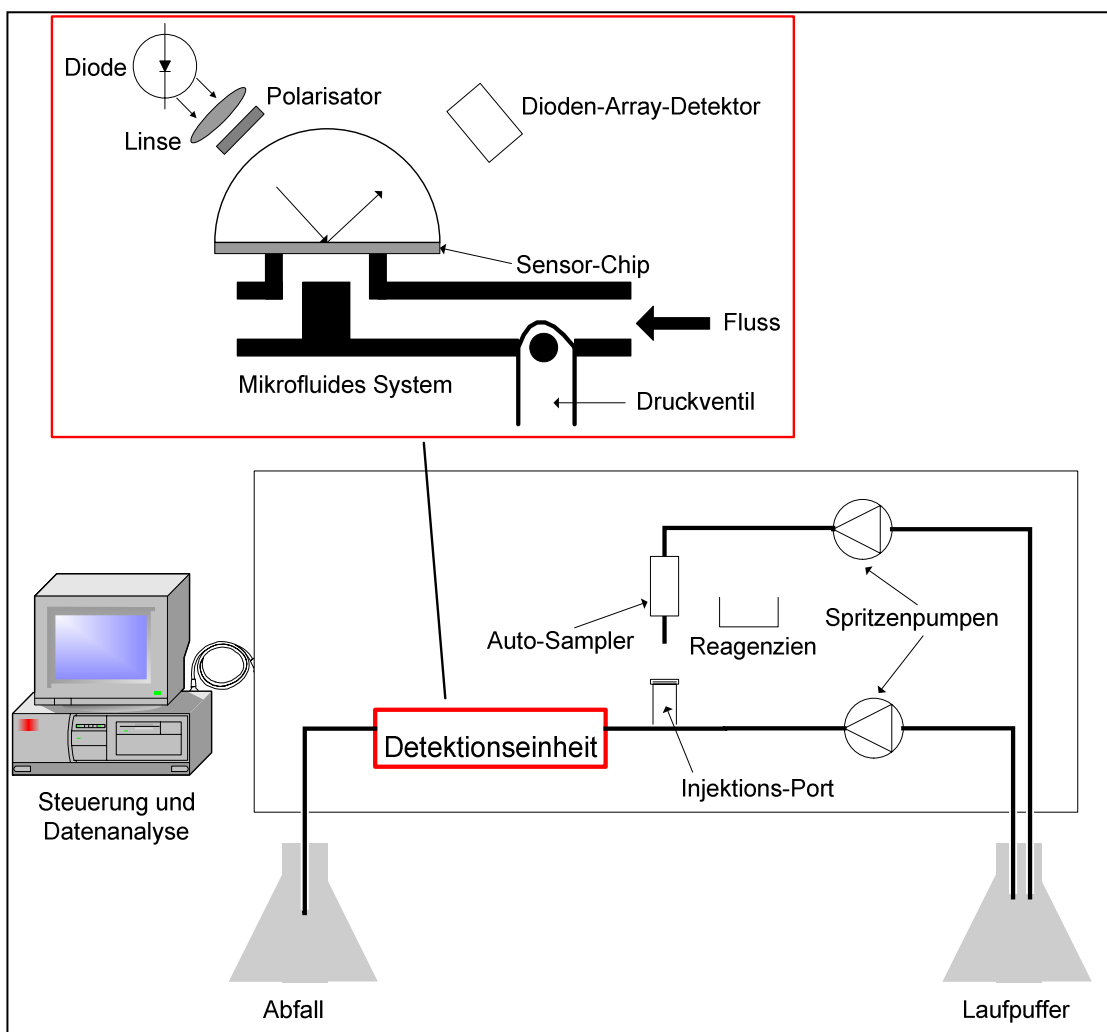
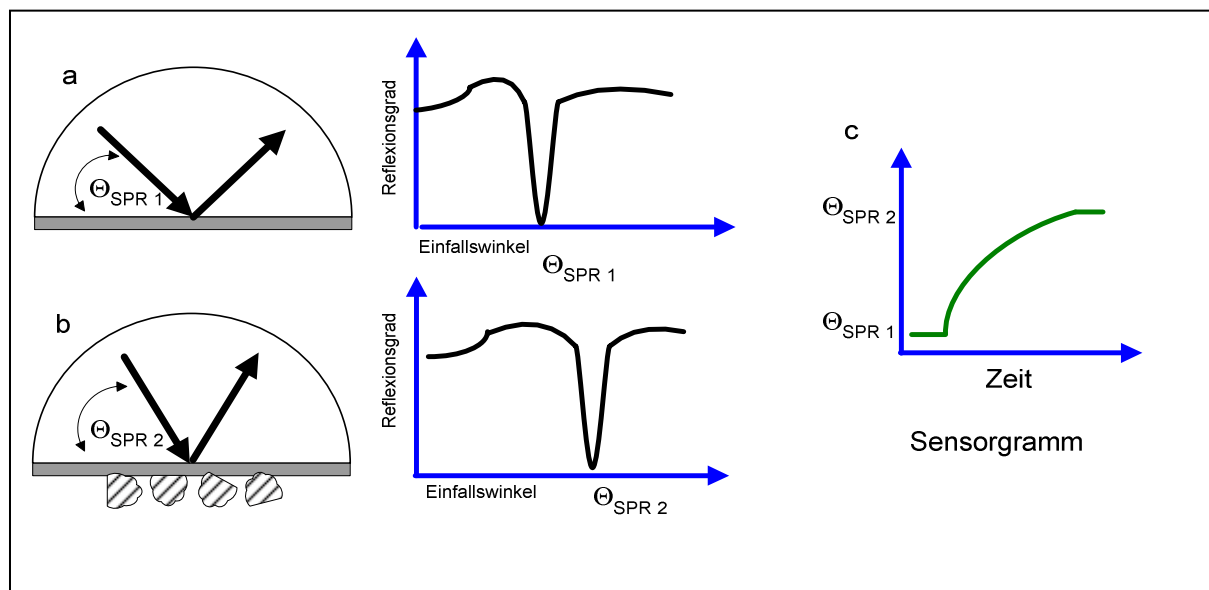


Abbildung 19: Schema eines SPR-Biosensors [modifiziert nach<sup>216,218</sup>].

### 4.1.3 Detektionsprinzip

Die Größe des SPR-Winkels hängt von den optischen Eigenschaften des Prismas, der Art des Metalls, der Dicke der Metallschicht, der Wellenlänge des eingestrahlt Lichtes und dem Brechungsindex des Dielektrikums ab<sup>208</sup>. Werden mit Ausnahme des Dielektrikums die anderen Parameter konstant gehalten, so haben Änderungen des Brechungsindex in der Nähe der Goldschicht einen Einfluss auf die Größe des SPR-Winkels. Aus einer lokalen Erhöhung des Brechungsindex, z.B. durch Adsorption eines Proteins auf der Oberfläche der Goldschicht, resultiert eine Verschiebung des SPR-Winkels zu größeren Werten (Abbildung 20)<sup>219</sup>.



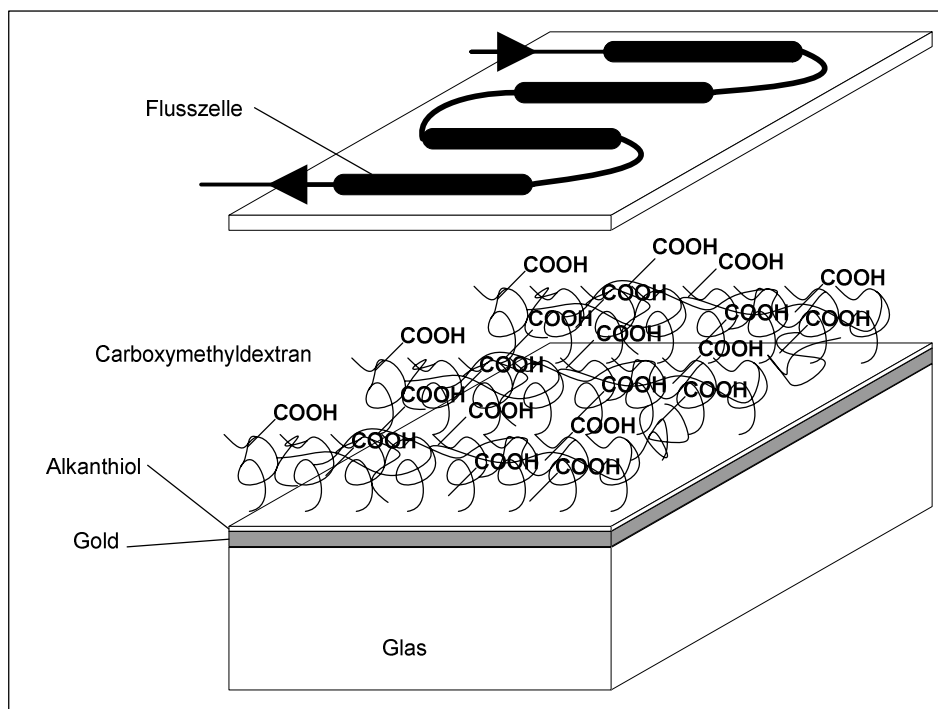
**Abbildung 20: Einfluss des Brechungsindex auf den SPR-Winkel. a) Vor der Erhöhung des Brechungsindex, b) nach der Erhöhung des Brechungsindex durch Adsorption eines Proteins an der Oberfläche der Metallschicht. c) Anhand des Sensorgramms (Änderung des SPR-Winkels gegen die Zeit) können Änderungen des Brechungsindex an der Grenzschicht Metall/Puffer und im Puffer verfolgt werden.**

Eine Verschiebung des SPR-Winkels kann jedoch nur innerhalb der Eindringtiefe der evaneszenten Welle, ca. 400 nm, im Dielektrikum beobachtet werden<sup>214</sup>. Änderungen des Brechungsindex außerhalb der Reichweite dieser evaneszenten Welle haben keinen Einfluss auf die Lage des SPR-Winkels. Als Konsequenz können Rezeptor/Ligand-Wechselwirkungen auf der Basis der SPR ebenfalls nur innerhalb der evaneszenten Welle im Dielektrikum nachgewiesen werden. Daher muss entweder der Rezeptor oder der Ligand auf dem Sensor-Chip immobilisiert werden. Bindet der Ligand an den immobilisierten Rezeptor oder der Rezeptor an den immobilisierten Ligand, so ändert sich der Brechungsindex in der unmittelbaren Nähe der Metallschicht. Dies führt zu einer Änderung des SPR-Winkels. Während einer SPR-Biosensor-Analyse wird die Lage des SPR-Winkels kontinuierlich bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 20)<sup>217</sup>. Das resultierende Diagramm wird als Sensorgramm bezeichnet und bietet den Vorteil, dass biomolekulare

Wechselwirkungen zwischen Rezeptoren und Liganden in Echtzeit verfolgt werden können. Die Änderung des SPR-Winkels wird in so genannten Resonance Units (RU) angegeben, wobei 1 RU der Änderung des SPR-Winkels um  $0,00001^\circ$  entspricht<sup>217</sup>. Untersuchungen von Stenberg *et al.*<sup>220</sup> haben gezeigt, dass zwischen der Änderung der Lage des SPR-Winkels und der Oberflächenkonzentration eines adsorbierten Proteins ein linearer Zusammenhang besteht. Für ein durchschnittliches Protein entspricht eine Zunahme von 1.000 RU einer Oberflächenkonzentration von etwa  $1 \text{ ng/mm}^2$ .

#### 4.1.4 Sensor-Chips

Einen Querschnitt durch einen Sensor-Chip zeigt Abbildung 21. Ein Glasträger ist mit einer dünnen Goldschicht (Schichtdicke ca. 50 nm) beschichtet<sup>217</sup>. Die Goldoberfläche ist über einen Spacer, z.B. ein Alkanthiol, mit Carboxymethyl-dextran (Schichtdicke ca. 100 nm) modifiziert. Diese funktionalisierte Oberfläche bietet den Vorteil, dass Moleküle über geeignete Kopplungsreagenzien an die Carbonsäuregruppen des Dextrans kovalent gebunden werden können, z.B. über Amid-Bindungen. Aufgrund der Stabilität kovalenter Bindungen können Rezeptor/Ligand-Komplexe durch die Injektion einer geeigneten Regenerierungslösung dissoziiert werden, so dass der Sensor-Chip für eine erneute Analyse verwendet werden kann<sup>217</sup>. Die Oberflächenmodifizierung verhindert weiterhin, dass Proteine oder andere Matrixkomponenten, z.B. aus Lebensmittel, unspezifisch an die Goldoberfläche adsorbiert werden<sup>221</sup>.



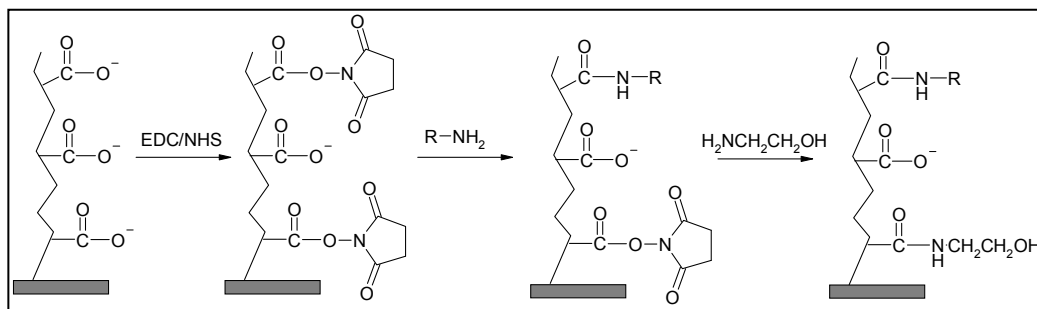
**Abbildung 21: Querschnitt durch einen Sensor-Chip, dessen Oberfläche mit Carboxymethyl-dextran modifiziert wurde. Der obere Teil zeigt die vier Flusszellen, die Bestandteil des mikrofluiden Systems sind und parallel oder in Serie geschaltet werden können. Im Biacore 3000 hat jede Flusszelle ein Volumen von  $0,02 \mu\text{l}$ .**

#### 4.1.5 Mikrofluides System

Wird ein Sensor-Chip in den Biosensor gesteckt, so hat die modifizierte Goldoberfläche Kontakt mit einem mikrofluiden System, das im Biacore 3000 vier miteinander verbundene Flusszellen enthält<sup>222</sup>. Der Zugang und Ablauf von Lösungen wird durch Druckventile kontrolliert, wobei die Flusszellen einzeln, als Paar oder in Reihe (Abbildung 21) verwendet werden können. Für jede Flusszelle kann ein Sensorgramm aufgezeichnet werden.

#### 4.1.6 Biomolekulare Interaktionsanalyse

Eine SPR-Biosensor-Analyse beginnt mit der Immobilisierung eines der beteiligten Reaktionspartner (Rezeptor oder Ligand) auf der Oberfläche des Sensor-Chips. Proteine und Peptide können z.B. über primäre Aminogruppen an die Carbonsäuregruppen des Dextrans gebunden werden (Abbildung 22)<sup>220</sup>. Neben Aminogruppen können für eine Immobilisierung auch andere funktionelle Gruppen, wie Thiole oder Aldehyde, herangezogen werden. Eine Zusammenstellung häufig verwendeter Kopplungsreaktionen findet sich bei Cooper<sup>203</sup>.



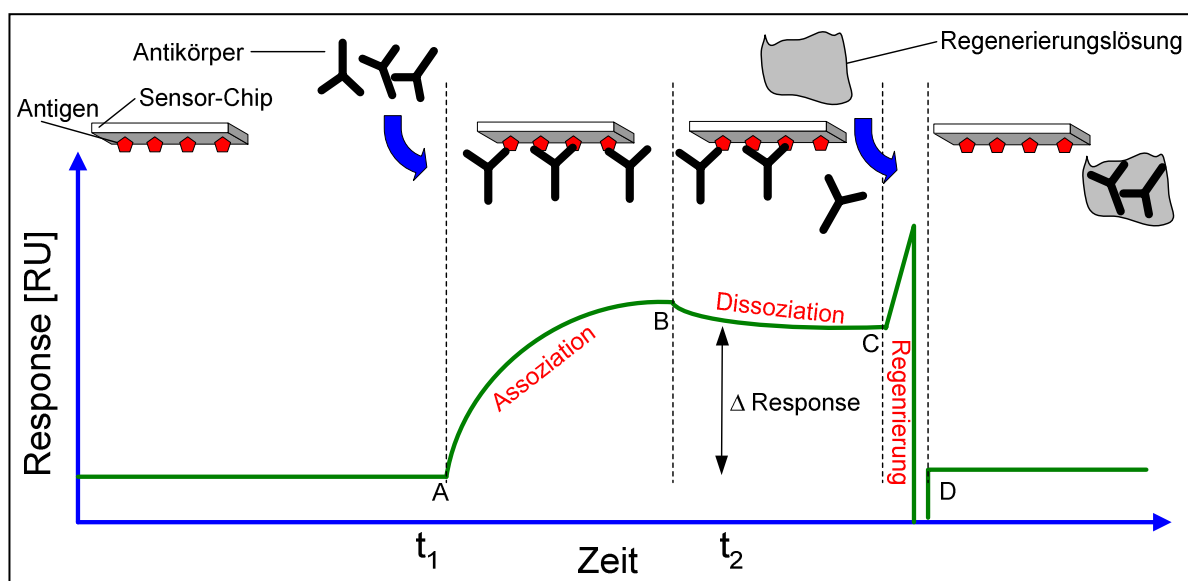
**Abbildung 22: Carbodiimid/*N*-Hydroxysuccinimid-Kopplung (EDC/NHS-Kopplung).** Nach Aktivierung der Carbonsäuregruppen mit *N*-Ethyl-*N'*-Dimethylaminopropylcarbodiimid (EDC) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS), reagieren die gebildeten NHS-Ester mit primären Aminogruppen zu Amidbindungen. Nichtreagierte NHS-Ester werden nach der Bindung des Reaktionspartners mit Ethanolamin deaktiviert.

Nachdem einer der beteiligten Reaktionspartner immobilisiert wurde, kann die biomolekulare Interaktionsanalyse durchgeführt werden und anhand des Sensorgramms verfolgt werden. Abbildung 23 zeigt ein typisches Sensorgramm einer Antigen/Antikörper-Bindung, wobei das Antigen auf dem Sensor-Chip immobilisiert wurde. Zunächst fließt ein Lauf-Puffer am Sensor-Chip vorbei und ab dem Zeitpunkt A werden die Antikörper in den Biosensor injiziert. Die Antikörper strömen mit dem kontinuierlich nachfließenden Lauf-Puffer am Sensor-Chip vorbei und binden an das immobilisierte Antigen (Assoziation). Die Bindung führt zu einer Erhöhung des Signals (Response-Werte ausgedrückt in RU, s. 4.1.3) bis zu dem Zeitpunkt B, an welchem erneut Lauf-Puffer am Sensor-Chip vorbeiströmt. Ab dem Zeitpunkt B kann die spontane Dissoziation des Antigen/Antikörper-Komplexes beobachtet werden. Um den Sensor-Chip für eine erneute Analyse verwenden zu können, wird eine geeignete Regenerierungslösung, die den Antigen/Antikörper-Komplex löst, in den Biosensor injiziert (C), und das

Signal fällt auf den ursprünglichen Wert zurück (D). Die Wahl der Regenerierungslösung ist von der Art der Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor abhängig. Antigen/Antikörper-Komplexe können in der Regel durch verdünnte Säuren oder Laugen gelöst werden<sup>223</sup>.

Die Regenerierung ist ein kritischer Punkt bei der Durchführung von biomolekularen Interaktionsanalysen, da nur eine vollständige Regenerierung reproduzierbare Messungen liefert. Die Regenerierungslösung sollte alle Rezeptor/Ligand-Bindungen lösen, ohne die Bindungskapazität der immobilisierten Reaktionspartner negativ zu beeinflussen.

Biomolekulare Interaktionsanalysen können auch für quantitative Bestimmungen herangezogen werden. Die Quantifizierung basiert auf den Response-Werten, die einige Sekunden nach der Injektion des Analyten ( $t_2$ ) gemessen werden, wobei einige Sekunden vor der Injektion der Analyten ( $t_1$ ) der Response gleich Null gesetzt wird (Abbildung 23). Der ermittelte Wert entspricht daher der Differenz zwischen den Response-Werten zu den Zeitpunkten  $t_2$  und  $t_1$  ( $\Delta \text{Response [RU]} = \text{Response } t_2 - \text{Response } t_1$ ).



**Abbildung 23: Sensorgramm, das die Bindung eines Antikörpers an ein immobilisiertes Antigen zeigt. Erläuterungen siehe Text.**

#### 4.1.7 SPR-Biosensoren in der Lebensmittel- und Rückstandsanalytik

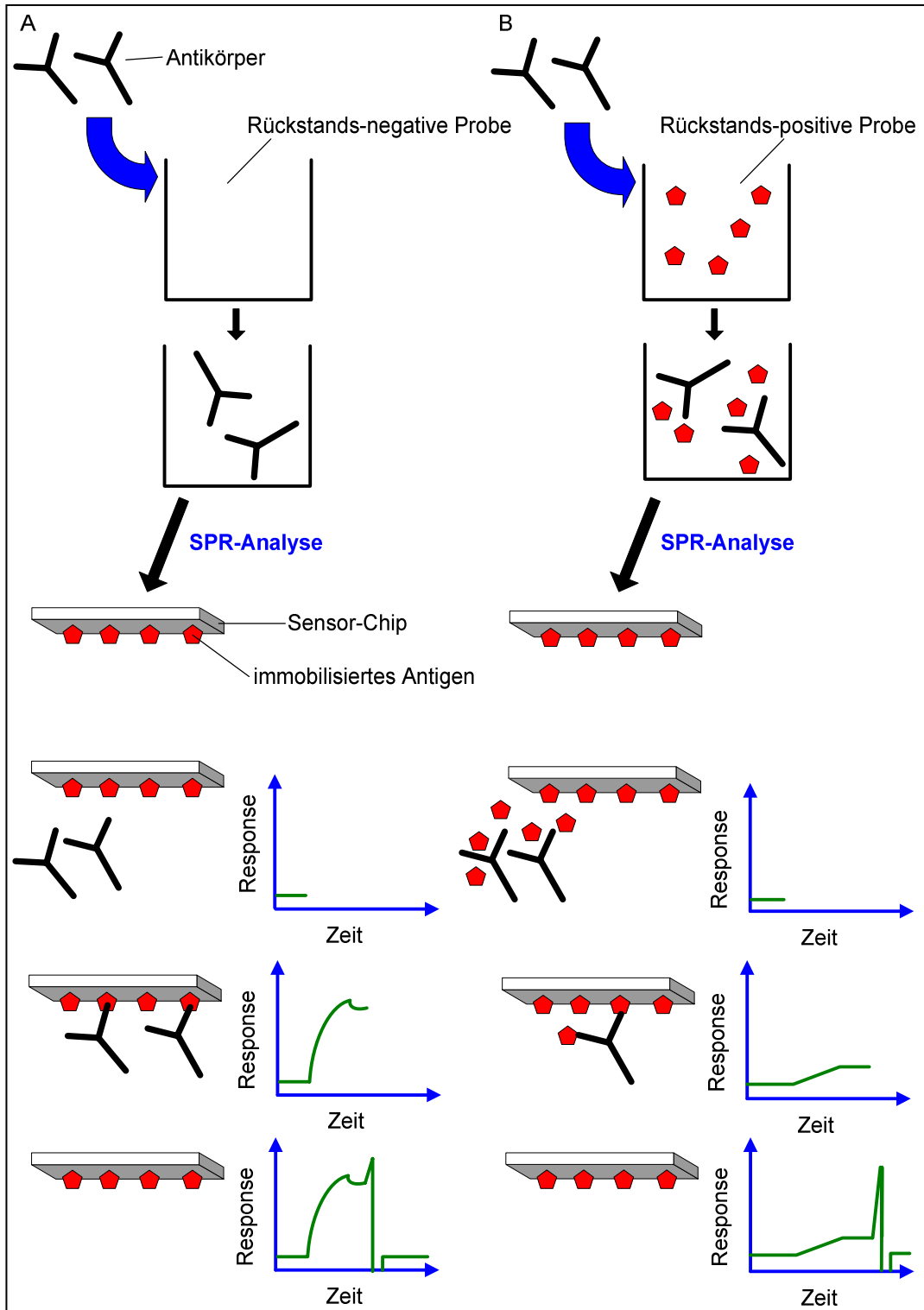
Eines der Hauptanwendungsgebiete für SPR-Biosensoren ist die Lebensmittelanalytik<sup>224</sup>. Das Spektrum, der mit dieser Analysetechnik erfassbaren Verbindungen, ist sehr vielfältig, und erstreckt sich sowohl auf molekulare Verbindungen, wie Vitamine<sup>225</sup>, Proteine<sup>226</sup>, Hormone<sup>227</sup>, Aflatoxine<sup>228</sup> und Tierarzneimittelrückstände (s. u.), als auch auf intakte bakterielle Zellen, wie Salmonellen<sup>229</sup>. Tabelle 4 zeigt einige für den Nachweis von Tierarzneimittelrückständen, insbesondere Antibiotika, entwickelte SPR-Biosensor-Assays. Mit Ausnahme der Assays für Streptomycin, Dihydrostreptomycin<sup>234</sup> und Gentamicin<sup>235</sup> handelt es sich dabei um

kompetitive immunchemische SPR-Biosensor-Assays, bei welchen das Antigen, d.h. das Tierarzneimittel, auf dem Sensor-Chip immobilisiert wird und die Analyt-spezifischen Antikörper den Proben zugesetzt werden (Abbildung 24). Bei den SPR-Biosensor-Assays für Streptomycin, Dihydrostreptomycin<sup>234</sup> und Gentamicin<sup>235</sup> handelt es sich um direkte immunchemische SPR-Biosensor-Assays, bei welchen der Antikörper auf dem Sensor-Chip immobilisiert wird (Abbildung 25). Direkte immunchemische SPR-Biosensor-Assays besitzen den Vorteil, dass das Signal proportional zur Rückstandskonzentration in der Probe ist. Bei kompetitiven SPR-Biosensor-Assays ist das Signal umgekehrt proportional zur Rückstandskonzentration in der Probe. Voraussetzung für die Entwicklung eines direkten immunchemischen SPR-Biosensor-Assays für Tierarzneimittelrückstände ist, dass die Antikörper eine hohe Affinität zu dem Analyten besitzen und die Antikörper/Antibiotika-Komplexe dissoziiert werden können<sup>234</sup>. Weiterhin muss der Sensor-Chip mit einer hohen Antikörperdichte belegt werden, da die Größe des Biosensor-Signals vom Molekulargewicht und Brechungsindex der bindenden Komponente abhängig ist. Niedermolekulare Verbindungen, wie z.B. Antibiotika, erzeugen somit im Vergleich mit Proteinen nur einen geringen Response<sup>230</sup>.

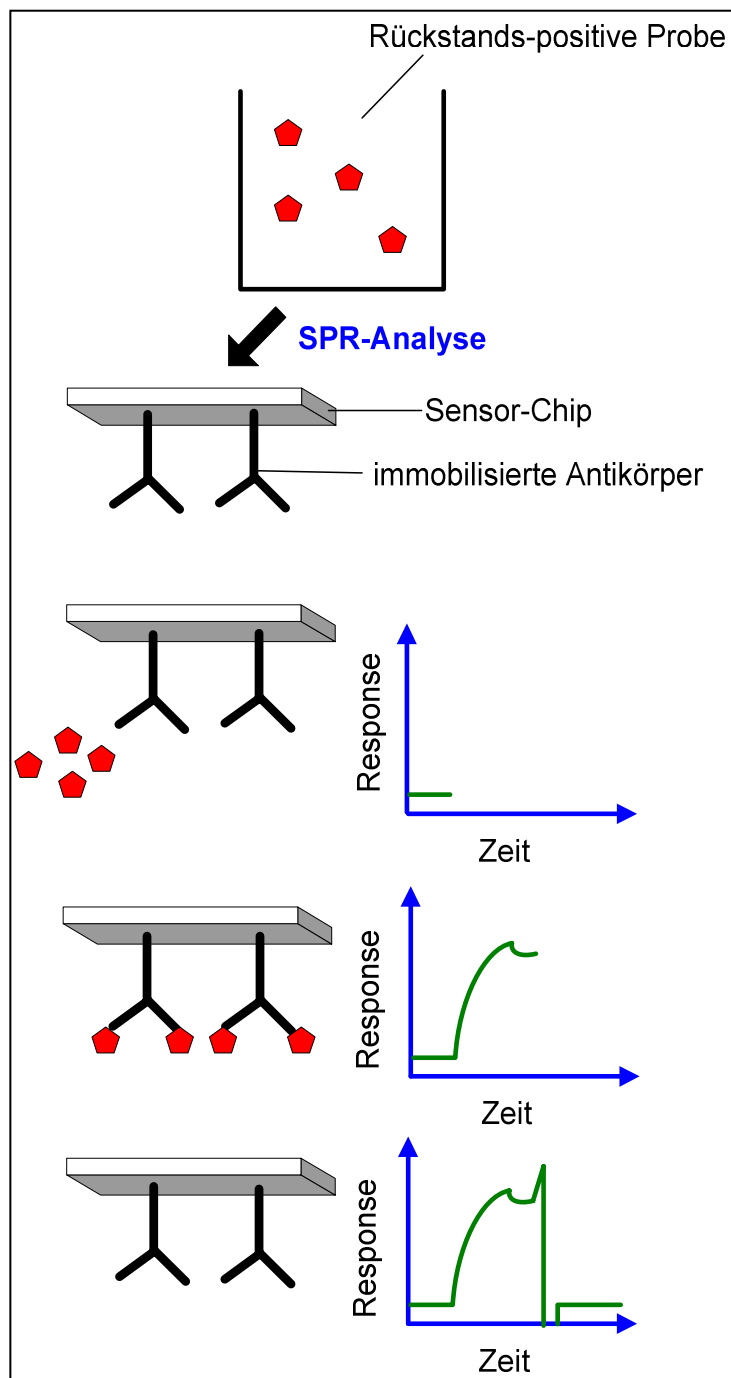
**Tabelle 4: SPR-Biosensor-Assays für den Nachweis von Tierarzneimittelrückständen.**

<b>Wirkstoffklasse</b>	<b>Tierarzneimittel</b>	<b>Matrix</b>	<b>Lit.</b>
Antibiotika	Sulfamethazin	Milch	<sup>231</sup>
	Sulfonamide	Galle	<sup>232</sup>
	Sulfonamide	Serum	<sup>233</sup>
	Streptomycin, Dihydrostreptomycin	Milch	<sup>234</sup>
	Gentamicin	Milch	<sup>235</sup>
	Chloramphenicol	Milch	<sup>236</sup>
$\beta$ -Agonisten	Enrofloxacin, Ciprofloxacin	Milch	<sup>237</sup>
	Clenbuterol	Urin	<sup>238</sup>
	Salbutamol	Urin	<sup>239</sup>
Antiparasitika	Ractopamin	Urin	<sup>240</sup>
	Ivermectin	Milch	<sup>241</sup>
Coccidiostatika	Nicarbazin	Leber, Eier	<sup>242</sup>





**Abbildung 24: Kompetitiver immunochemischer SPR-Biosensor-Assay.** Vor der SPR-Biosensor-Analyse wird ein Antigen, z.B. ein Tierarzneimittel, auf dem Sensor-Chip immobilisiert. Die zu analysierenden Proben werden mit Antigen-spezifischen Antikörpern versetzt und in den SPR-Biosensor injiziert. **A:** In Rückstands-negativen Proben binden die zugesetzten Antikörper an die immobilisierten Antigen-Moleküle, was zu einer Erhöhung des Signals führt. **B:** In Rückstands-positiven Proben konkurrieren die Rückstände mit den immobilisierten Antigen-Molekülen um die Antikörper-Bindestellen. Da weniger Antikörper an den Sensor-Chip binden, steigt der Response im Vergleich zu Rückstands-negativen Proben um einen geringeren Wert an. Nach jeder Probenlösung wird eine Regenerierungslösung injiziert, um die gebildeten Antigen/Antikörper-Komplexe zu dissoziieren.



**Abbildung 25: Direkter SPR-Biosensor-Assay.** Analyt-spezifische Antikörper werden vor der SPR-Biosensor-Analyse auf dem Sensor-Chip immobilisiert und die zu analysierenden Proben werden in den Biosensor injiziert. In Rückstands-positiven Proben binden die Rückstände an die immobilisierten Antikörper, so dass der Response steigt. Nach jeder Probenlösung wird eine Regenerierungslösung injiziert, um die gebildeten Antigen/Antikörper-Komplexe zu lösen.

#### 4.1.8 SPR-Biosensor-Assays für $\beta$ -Lactam-Antibiotika

Gaudin *et al.*<sup>243</sup> haben einen kompetitiven immunchemischen SPR-Biosensor-Assay für den Nachweis von Penicillinen in Milch entwickelt. Der verwendete Antikörper besaß eine höhere Affinität gegenüber Penicillinen mit hydrolysiertem  $\beta$ -Lactam-Ring als zu Penicillinen mit intaktem  $\beta$ -Lactam-Ring, so dass Penicilloyl-Derivate spezifisch nachgewiesen werden konnten. Folglich mussten als Teil der Probenvorbereitung eventuell vorhandene Rückstände mit intaktem  $\beta$ -Lactam-Ring enzymatisch, z.B. durch  $\beta$ -Lactamasen, oder chemisch zu Penicilloinsäuren oder Penicilloyl-Derivaten umgesetzt werden, was einen Nachteil darstellt, da die MRL-Werte nur für die intakten Penicilline festgelegt sind.

Eine Alternative zu Anti-Penicillin-Antikörpern oder Anti-Cephalosporin-Antikörpern als spezifische Bindungskomponenten sind, wie bei den Protein-Bindungstests (s. 3.1.3), PBP. Gustavsson<sup>244</sup> hat mehrere SPR-Biosensor-Assays mit der DD-Carboxypeptidase aus *Actinomadura* R39 (DD-Carboxypeptidase R39) entwickelt. Die Assays basieren zum einen auf dem Nachweis der Bindung der DD-Carboxypeptidase R39 an ein reversibel immobilisiertes Cephalosporin (Rezeptor-Assay)<sup>245</sup> und zum anderen auf der Bestimmung der verbleibenden DD-Carboxypeptidase-Aktivität nach Inkubation mit einem  $\beta$ -Lactam (enzymatische Assays)<sup>246,247</sup>.

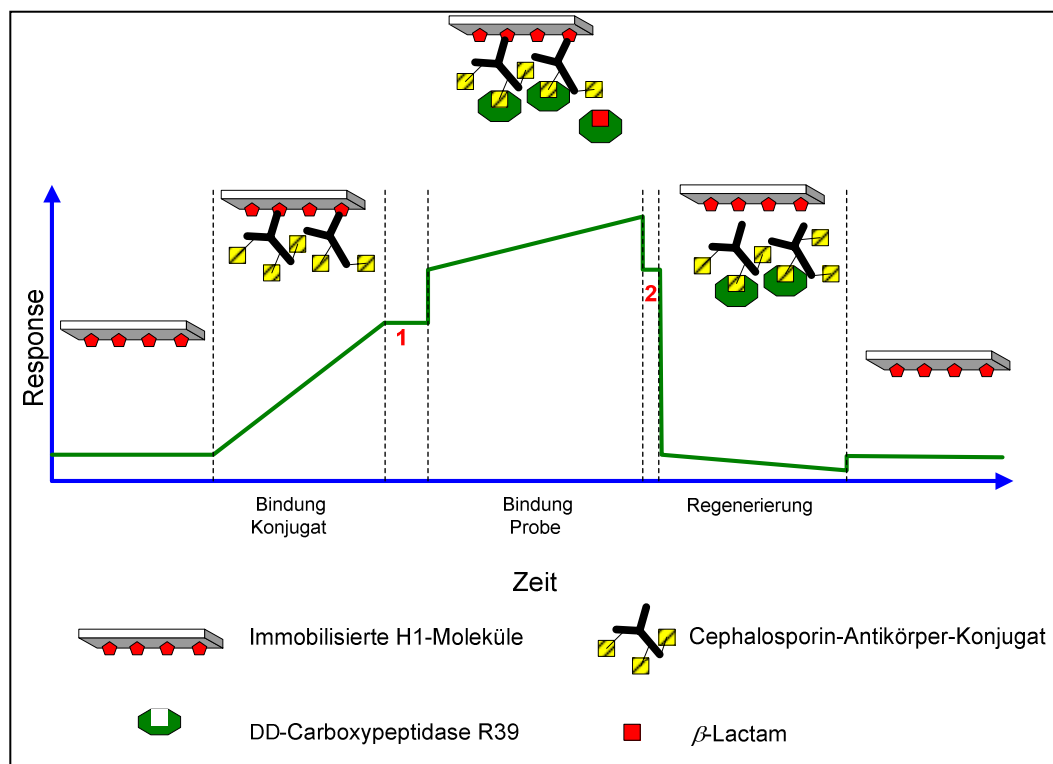


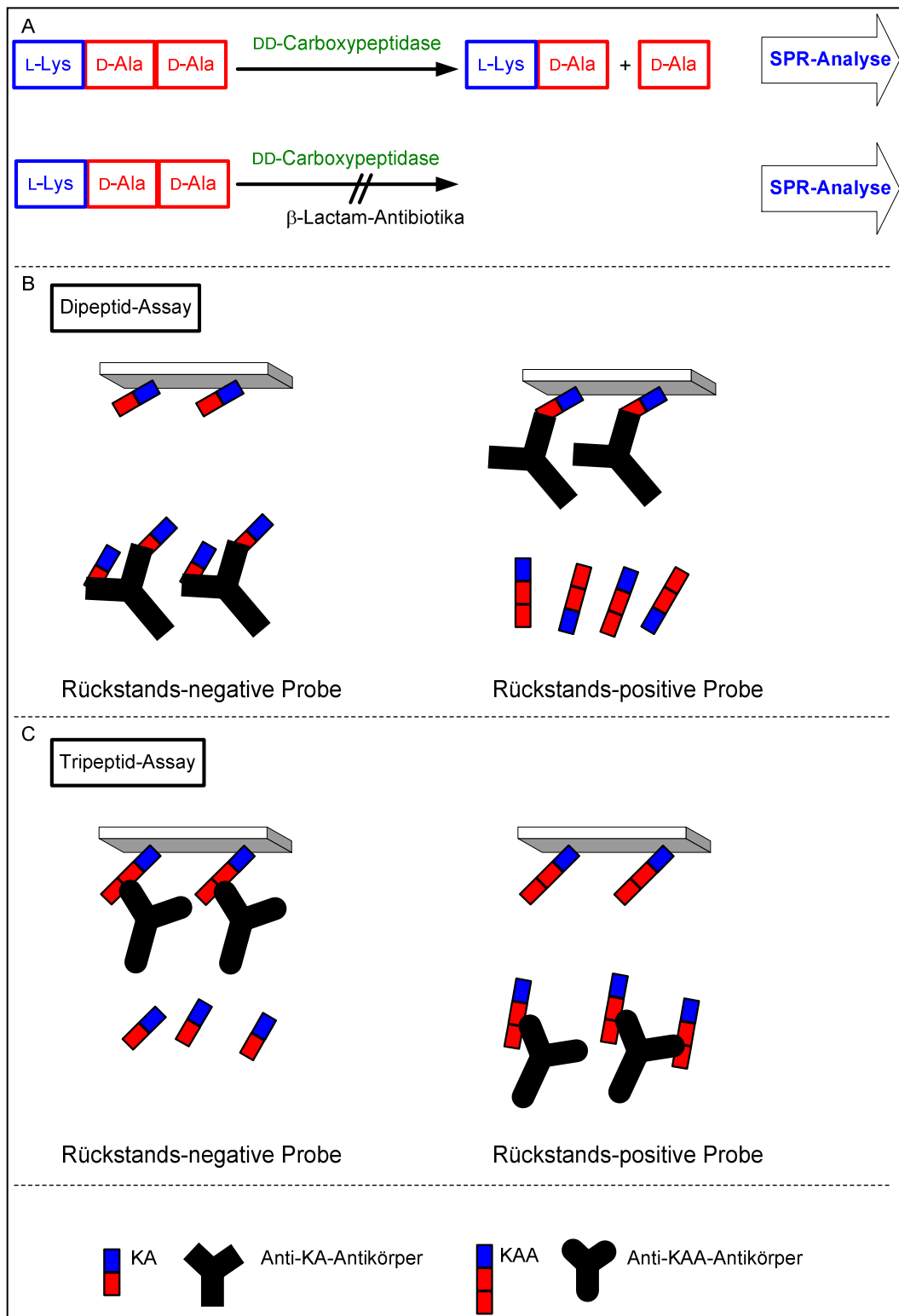
Abbildung 26: Sensorgramm und Schema des Rezeptor-Assays für  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Das injizierte Anti-H1-Antikörper-Cephalosporin-Konjugat bindet an die H1-Moleküle, die auf dem Sensor-Chip immobilisiert sind (Plateau 1). Anschließend wird die Probe injiziert, die zuvor mit der DD-Carboxypeptidase inkubiert wurde. Die DD-Carboxypeptidase-Moleküle, die nicht durch  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-Rückstände inhibiert sind, binden an die Cephalosporin-Moleküle des Konjugates und der Response steigt erneut (Plateau 2) [modifiziert nach <sup>245</sup>].

Bei dem Rezeptor-Assay wird vor der SPR-Biosensor-Analyse ein niedermolekulares, synthetisches Molekül (H1,  $\text{MG } 266 \text{ g mol}^{-1}$ ) auf dem Sensor-Chip immobilisiert. Weitere Angaben zu H1 werden von Gustavsson *et al.*<sup>245</sup> nicht gemacht. Der Rezeptor-Assay beginnt mit der Injektion eines Antikörper-Cephalosporin-Konjugates, wobei der Antikörper gegen H1 gerichtet ist und an den Sensor-Chip bindet. Anschließend wird die Probe injiziert, die zuvor mit der DD-Carboxypeptidase inkubiert wurde. In Rückstands-negativen Proben bindet die DD-Carboxypeptidase an das Anti-H1-Antikörper-Cephalosporin-Konjugat, so dass der Response ansteigt. In Rückstands-positiven Proben wird die DD-Carboxypeptidase durch  $\beta$ -Lactam-Antibiotika inhibiert, so dass weniger Enzym-Moleküle an die Cephalosporine binden. Abbildung 26 zeigt ein Schema und ein dazugehöriges Sensorgramm des Rezeptor-Assays.

Basis für die enzymatischen Assays ist die Reaktion der DD-Carboxypeptidase im Penzym-Test<sup>168</sup> (s. 3.1.3). Die zu analysierende Probe wird mit der DD-Carboxypeptidase R39 und dem Tripeptid  $N\alpha, N\epsilon$ -(Acetyl)<sub>2</sub>-L-Lys-D-Ala-D-Ala inkubiert<sup>247</sup> (Abbildung 27 A). Enthält die Probe keine  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-Rückstände, so wird die DD-Carboxypeptidase das Tripeptid zu D-Ala und dem Dipeptid  $N\alpha, N\epsilon$ -(Acetyl)<sub>2</sub>-L-Lys-D-Ala umsetzen. In Gegenwart von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika wird die DD-Carboxypeptidase inhibiert, so dass weniger Dipeptid gebildet wird. Die Menge an nicht umgesetzten Tripeptid oder gebildeten Dipeptid wird nach Zugabe Peptid-spezifischer Antikörper mittels SPR-Biosensor-Analyse bestimmt.

In dem so genannten Dipeptid-Assay wird zu den Proben ein Dipeptid-spezifischer Antikörper gegeben und die Sensor-Chip-Oberfläche ist mit dem Dipeptid belegt (Abbildung 27 B). In Rückstands-negativen Proben konkurrieren die gebildeten Dipeptide mit den immobilisierten Dipeptiden um die Antikörper-Bindestellen. In Rückstands-positiven Proben binden die zugesetzten Anti-Dipeptid-Antikörper an die immobilisierten Dipeptide, da in der enzymatischen Reaktion keine Dipeptide entstanden sind. Aufgrund dieser Testanordnung ist der Response proportional zur  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-Konzentration in der Probe.

In dem so genannten Tripeptid-Assay wird zu den Proben ein Tripeptid-spezifischer Antikörper gegeben und die Sensor-Chip-Oberfläche ist mit dem Tripeptid belegt (Abbildung 27 C). In Rückstands-negativen Proben binden die Anti-Tripeptid-Antikörper an die immobilisierten Tripeptide. In Rückstands-positiven Proben konkurrieren die nicht umgesetzten Tripeptide mit den immobilisierten Tripeptiden um die Antikörperbindstellen. In diesem Test ist der Response umgekehrt proportional zur  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-Konzentration in der Probe.



**Abbildung 27: Bestimmung der DD-Carboxypeptidase-Aktivität mittels SPR-Biosensor-Analyse.** A: Die DD-Carboxypeptidase katalysiert die hydrolytische Abspaltung des terminalen D-Alanins aus dem Tripeptid L-Lys-D-Ala-D-Ala. Das Enzym wird jedoch durch  $\beta$ -Lactam-Antibiotika inhibiert. B: Auf der Sensor-Chip-Oberfläche ist das Dipeptid L-Lys-D-Ala immobilisiert. Nach Zugabe eines R-L-Lys-D-Ala-spezifischen Antikörpers wird die Menge an gebildetem Dipeptid bestimmt. C: Auf der Sensor-Chip-Oberfläche ist das Tripeptid R-L-Lys-D-Ala-D-Ala immobilisiert. Nach Zugabe eines L-Lys-D-Ala-D-Ala-spezifischen Antikörpers wird die Menge an nicht umgesetzten Tripeptid bestimmt. KA: L-Lys-D-Ala, KAA: L-Lys-D-Ala-D-Ala [modifiziert nach<sup>247</sup>].

## 5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines SPR-Biosensor-Assays für den Nachweis von Penicillinen und Cephalosporinen in Milch und die Isolierung, Synthese und Charakterisierung der dafür benötigten biomolekularen Erkennungspartner. Diese Thematik wurde unabhängig voneinander parallel in Wuppertal und Uppsala aufgegriffen.

Zu Beginn stellte sich die Frage, welche spezifische Bindungskomponente für die Gruppe der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika eingesetzt werden kann. Generell haben sich Antikörper als analytisches Tool in SPR-Biosensor-Assays für Tierarzneimittelrückstände etabliert. Die Gewinnung von Antikörpern gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika hat sich jedoch bisher als schwierig erwiesen. Die hohe Reaktivität des  $\beta$ -Lactam-Ringes führt häufig dazu, dass überwiegend Antikörper gegen Abbauprodukte der Penicilline wie Penicilloyl-Derivate produziert werden. Antikörper, die Abbauprodukte binden, sind jedoch für den Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika eher ungeeignet, da die MRL-Werte für intakte Penicilline und Cephalosporine festgelegt wurden. Ein weiterer limitierender Faktor ist, dass Penicillin-spezifische Antikörper keine ausreichenden Kreuzreaktivitäten gegenüber Cephalosporinen und ebenso Cephalosporin-spezifische Antikörper keine ausreichenden Kreuzreaktivitäten gegenüber Penicillinen zeigen.

Da PBP neben ihren natürlichen Substraten, die nur in Bakterien vorkommen, ausschließlich intakte  $\beta$ -Lactam-Antibiotika binden, erschien es aussichtsreicher diese Proteine für einen gruppenspezifischen Nachweis von Penicillinen und Cephalosporinen einzusetzen. Zunächst sollten daher verschiedene PBP auf ihre Tauglichkeit für den Einsatz in einem SPR-Biosensor-Assay geprüft.

In SPR-Biosensor-Assays wird üblicherweise entweder der Rezeptor oder der Ligand auf dem Sensor-Chip immobilisiert. Die gebildeten Rezeptor/Ligand-Komplexe werden nach der eigentlichen biomolekularen Interaktionsanalyse durch eine Regenerierungslösung gelöst, so dass der Sensor-Chip für eine neue Analyse verwendet werden kann. PBP und  $\beta$ -Lactam-Antibiotika bilden jedoch PBP/ $\beta$ -Lactam-Antibiotikum-Konjugate. Der ausgebildete Serinester zwischen PBP und  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum erschwert die Entwicklung direkter oder kompetitiver Verfahren, wie sie z.B. für immunchemische SPR-Biosensor-Assays eingesetzt werden. Der Serinester kann nur unter Bedingungen gespalten werden, bei denen empfindliche Moleküle wie Proteine denaturieren und chemisch labile Verbindungen wie  $\beta$ -Lactam-Antibiotika hydrolysieren. Zur Verwirklichung des Ziels wurde daher ein indirekter Assay konzipiert, der den Nachweis der Bindung zwischen PBP und  $\beta$ -Lactam ermöglicht,

ohne dass diese Bindung gespalten werden muss. Die Synthese und Charakterisierung der dazu notwendigen Komponenten war der zweite Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit.

Ein wichtiger Punkt, der bei der Analyse von Lebensmitteln beachtet werden muss, ist der Einfluss von Matrixkomponenten auf die Qualitätskenndaten des Analysenverfahrens wie Spezifität, Selektivität und Nachweisgrenze. Bei Screening-Verfahren haben Matrixeffekte insbesondere einen Einfluss auf die Anzahl so genannter falsch-positiver und falsch-negativer Ergebnisse. Falsch-negative Proben liegen vor, wenn mit einem Screening-Assay Antibiotika-Rückstände nachgewiesen werden, obwohl diese nicht vorhanden sind, oder wenn die Konzentration eines vorhandenen Rückstandes unterhalb des MRL-Wertes liegt. Zu falsch-positiven Resultaten kommt es, wenn mit einem Screening-Assay keine Antibiotika nachgewiesen werden konnten, obwohl Rückstände vorhanden waren, oder wenn bei Stoffen mit Höchstmengenfestlegung die Konzentration der Rückstände oberhalb des MRL-Wertes lag. Screening-Verfahren sollten möglichst keine falsch-negativen Ergebnisse liefern ( $< 5\%$ ), während falsch-positive Ergebnisse innerhalb bestimmter Grenzen toleriert werden. Der Einfluss der gewählten Matrix Milch auf die Qualitätskenndaten des entwickelten SPR-Biosensor-Assay sollte in einer ersten modellhaften Evaluierung anhand von Rohmilch-Proben einzelner Kühe näher untersucht werden.

## 6 Ergebnisse und Diskussion

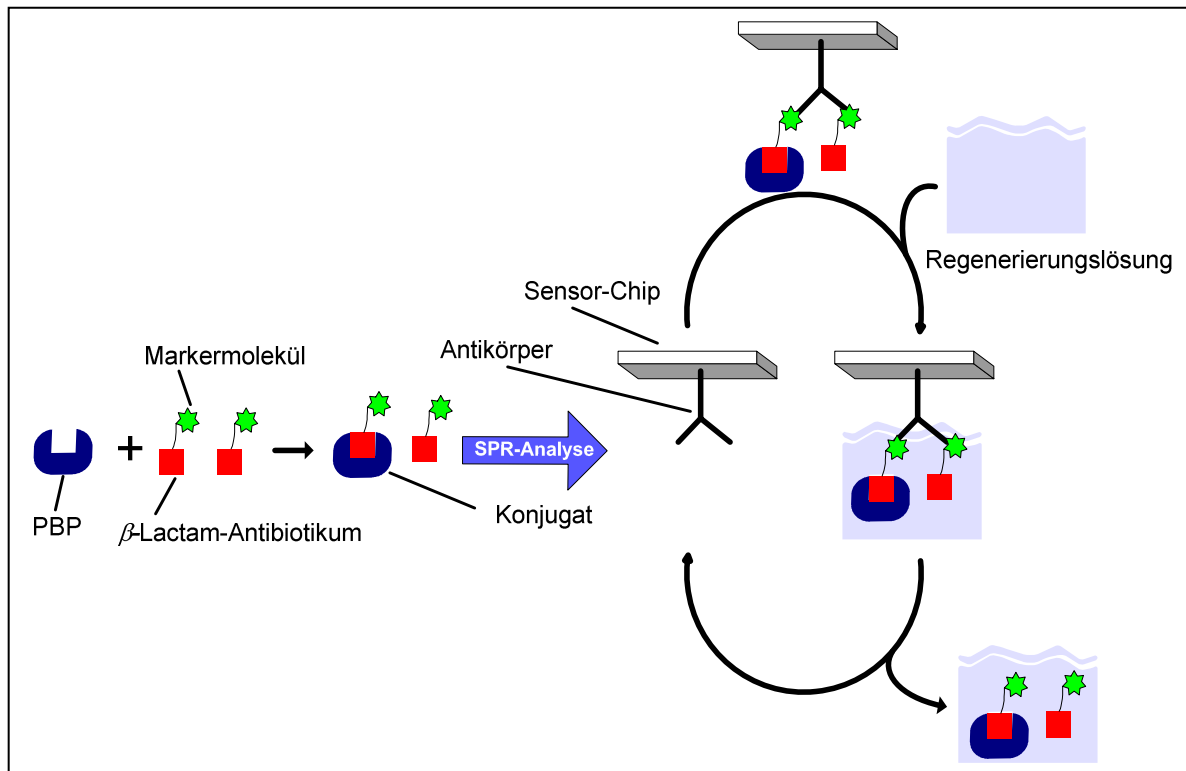
### 6.1 Indirekter SPR-Biosensor-Assay zum Nachweis von $\beta$ -Lactam-Antibiotika-Rückständen

Bei der Entwicklung von SPR-Biosensor-Assays für  $\beta$ -Lactam-Antibiotika mit PBP als spezifischen Bindungskomponenten können Assay-Formate, die üblicherweise zum Nachweis von Rezeptor/Ligand-Wechselwirkungen eingesetzt werden, nicht verwendet werden. Die dabei auftretenden Schwierigkeiten sollen am Beispiel der Penicilline näher erläutert werden.

Würde in einem direkten Assay-Format das PBP auf dem Sensor-Chip immobilisiert, so würde ein injiziertes Penicillin an das PBP binden. Die gebildete Serinester-Bindung ist sehr stabil und kann aber mit einer verdünnten Wasserstoffperoxidlösung<sup>248</sup> oder einer 0,5 bis 1 M Hydroxylaminlösung<sup>56</sup> gespalten werden. Eng und Maxwell<sup>248</sup> haben in einer SPR-Biosensor-Studie mit einer DD-Peptidase jedoch festgestellt, dass ein immobilisiertes PBP nach etwa 20 Regenerierungsschritten seine Penicillin-bindende Aktivität verliert. Würde andererseits in einem kompetitiven Assay-Format ein Penicillin auf dem Sensor-Chip immobilisiert, so würde das PBP an das Penicillin unter irreversibler Öffnung des  $\beta$ -Lactam-Ringes binden. Das PBP/Penicillin-Konjugat könnte wie oben beschrieben gespalten werden, auf der Oberfläche würde aber entweder das Penicilloyl-Derivat oder das *N*-Acyl-Glycin-Derivat des Penicillins (vgl. Abbildung 14) zurückbleiben. Da PBP neben ihren natürlichen Substraten nur mit intakten  $\beta$ -Lactam-Antibiotika reagieren, könnte der Sensor-Chip auch bei einer hohen Beladungsdichte nur für wenige Analysenzyklen verwendet werden.

Für die Routineanalytik werden Sensor-Chips benötigt, die vergleichbar einem Mikrotiterplatten-Test für mindestens 100 Injektionen verwendet werden können, so dass ein indirektes Assay-Format konzipiert wurde. Basis für diesen indirekten Assay ist die Bindung eines PBP an ein Markermolekül-markiertes  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum (Abbildung 28). Das aus PBP und markiertem  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum gebildete Konjugat wurde mittels SPR-Biosensor-Analyse bestimmt, wobei auf dem Sensor-Chip Markermolekül-spezifische Antikörper immobilisiert waren. Dieses indirekte Assay-Format erlaubte es, Proben mit unbekanntem Rückstandgehalt in einem nicht-kompetitiven Inhibierungs-Assay auf  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-Rückstände zu untersuchen. Der Vorteil dieser Kombination aus Protein-Bindungstest und immunchemischem SPR-Biosensor-Assay liegt in der Möglichkeit, dass der Sensor-Chip regeneriert werden kann, ohne die Notwendigkeit PBP/ $\beta$ -Lactam-Antibiotikum-Konjugate zu spalten. Es reicht aus die Markermolekül/Antikörper-Komplexe zu dissoziieren, wobei es für die Dissoziation derartiger Antigen/Antikörper-Komplexe eine Vielzahl von Optionen gibt.





**Abbildung 28: Prinzip des indirekten SPR-Biosensor-Assays für  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. PBP und markiertes  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum bilden ein Konjugat, das mittels SPR-Biosensor-Analyse nachgewiesen wird. Der immobilisierte Antikörper ist gegen das Markermolekül gerichtet. Nach der Regenerierung kann der Sensor-Chip für eine neue Analyse verwendet werden.**

Eine ähnliche Strategie wurde von Bergström *et al.*<sup>249</sup> mit dem Konzept der „general capturing surface“ entwickelt, um die Entwicklung von SPR-Biosensor-Assays für Tierarzneimittel zu vereinfachen. Bergström *et al.*<sup>249</sup> haben auf dem Sensor-Chip einen Antikörper, der gegen ein niedermolekulares Markermolekül gerichtet ist, immobilisiert. Die immobilisierten Antikörper wurden benutzt, um ein Markermolekül-Tierarzneimittel-Konjugat zu binden. Die zu analysierenden Proben wurden mit Tierarzneimittel-spezifischen Antikörper versetzt, so dass Tierarzneimittelrückstände mit einem kompetitiven immunchemischen SPR-Biosensor-Assay nachgewiesen werden konnten. Bei der anschließenden Regenerierung wurde der Komplex zwischen immobilisiertem Antikörper und Markermolekül dissoziiert. Auch dieses Assay-Format bietet den Vorteil, dass die Regenerierung unabhängig vom Analyten und unabhängig von der Art der Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor erfolgen kann.

## 6.2 Isolierung, Synthese und Charakterisierung der essentiellen Komponenten

Aus Abbildung 28 ist ersichtlich, dass das PBP, das markierte  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum und der Antikörper, der gegen das Markermolekül gerichtet ist, die essentiellen Komponenten des indirekten SPR-Biosensor-Assays sind. Verschiedene Komponenten wurden untersucht, um einen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-spezifischen Assay erfolgreich zu etablieren. Dabei müssen die Komponenten bestimmte Anforderungen erfüllen. PBP und Antikörper sollten hochaffin sein, da die Nachweisgrenze des Assays von den Affinitäten des PBP gegenüber den einzelnen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika und der Affinität des Antikörpers gegenüber dem Markermolekül abhängig ist. Eine herausragende Bedeutung kommt insbesondere dem PBP zu, da das PBP das Spektrum der erfassbaren  $\beta$ -Lactam-Antibiotika vorgibt. Idealerweise sollte das PBP alle Penicilline und Cephalosporine binden, für die MRL-Werte festgelegt wurden. Das PBP sollte des Weiteren ein möglichst hohes Molekulargewicht besitzen, da die Höhe des Detektorsignals (Response) in einer SPR-Biosensor-Analyse vom Molekulargewicht des Analyten abhängig ist.

## 6.3 PBP

PBP sind nicht kommerziell erhältlich und wurden aus Bakterien gewonnen. Die Auswahl der Stämme erfolgte aufgrund der Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber den  $\beta$ -Lactam-Antibiotika sowie aus der Literatur erhältlichen Informationen über das PBP-Muster. Es wurden zwei Strategien verfolgt, um das geeignete PBP zu finden und zu isolieren. Zum einen wurden DD-Carboxypeptidasen aus Bakterien, die sehr empfindlich gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika sind, partiell aufgereinigt und zum anderen wurde eine Literaturrecherche hinsichtlich der  $k_2/K$ -Werte (s. 2.4) durchgeführt, um ein PBP mit großem Molekulargewicht (HMW PBP) zu finden, das sowohl Penicilline als auch Cephalosporine mit hoher Affinität bindet.

### 6.3.1 DD-Carboxypeptidasen aus *Streptococcus thermophilus* und *Bacillus stearothermophilus*

DD-Carboxypeptidasen wurden aus *Streptococcus thermophilus* DS 224 und *Bacillus stearothermophilus* DSM 3299 isoliert. *Streptococcus thermophilus* wird zusammen mit *Lactobacillus bulgaricus* als Starterkultur zur Herstellung von Joghurt verwendet. *Streptococcus thermophilus* wurde als potentielle PBP-Quelle betrachtet, da dieses Bakterium sehr empfindlich auf  $\beta$ -Lactam-Antibiotika reagiert. Penicilline haben z.B. ab einer Konzentration von 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  einen hemmenden Einfluss auf Joghurtkulturen, wobei *Streptococcus thermophilus* wesentlich empfindlicher gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika reagiert als *Lactobacillus bulgaricus*. Für den in dieser Arbeit verwendeten Stamm DS 224 betrug die minimale Hemm-Konzentration für Benzylpenicillin 12 ng/ml. Über das PBP-Muster von *Streptococcus*

*thermophilus* oder die Affinitäten einzelner PBP gegenüber bestimmten  $\beta$ -Lactam-Antibiotika wurden in der Literatur keine Daten gefunden.

*Bacillus stearothermophilus* DSM 3299 besitzt fünf PBP, wobei die DD-Carboxypeptidase, das PBP 5, 90 % der Penicillin-bindenden Aktivität des gesamten Organismus ausmacht<sup>56</sup>.

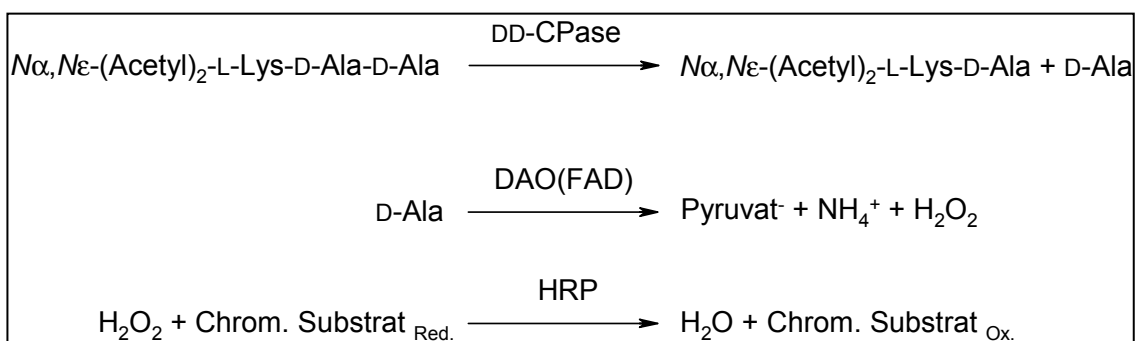
Die DD-Carboxypeptidasen wurden aus den solubilisierten Membranproteinen der Bakterien mittels Ampicillin-Affinitätschromatographie partiell aufgereinigt<sup>276</sup>. Die Elution der angereicherten PBP erfolgte mit 0,8 M Hydroxylamin, wodurch ein Teil der PBP denaturiert<sup>259</sup>. Die Aktivität der DD-Carboxypeptidasen wurde mit D-Ala-D-Ala-terminierten Peptiden und enzymatischen Hilfsreaktionen nachgewiesen, wobei als Substrat  $N\alpha$ -(Acetyl)-L-Lys-D-Ala-D-Ala oder  $N\alpha,N\epsilon$ -(Acetyl)<sub>2</sub>-L-Lys-D-Ala-D-Ala eingesetzt wurde (Abbildung 29)<sup>278</sup>. Das von der DD-Carboxypeptidase abgespaltene terminale D-Alanin wurde in einer FAD-abhängigen Reaktion durch eine D-Aminosäureoxidase zu Pyruvat, Ammonium-Ionen und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Mit Hilfe des gebildeten Wasserstoffperoxids oxidierte eine Meerrettichperoxidase (HRP) ein chromogenes Substrat zu einem spektrometrisch messbaren Chromophor. Als chromogenes Substrat können verschiedene Verbindungen wie o-Phenylendiamin oder 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolinsulfonat) (ABTS) eingesetzt werden, aber auch Substanzen die von der HRP zu fluoreszierenden Substanzen umgesetzt werden, wie 10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin (Amplex-Red)<sup>278,250</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurden Amplex-Red (Abbildung 30) und Tetramethylbenzidin (TMB) (Abbildung 31) als HRP-Substrate verwendet. Zur Unterscheidung werden diese zwei Assays nachfolgend als TMB-Assay und Amplex-Red-Assay bezeichnet.

Um die Affinitäten der DD-Carboxypeptidasen gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika zu bestimmen, wurden die affinitätschromatographisch aufgereinigten Fraktionen mit unterschiedlichen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-Mengen inkubiert und anschließend die verbleibende DD-Carboxypeptidase-Aktivität bestimmt. Abbildung 32 und Abbildung 33 zeigen zwei typische Ergebnisse.

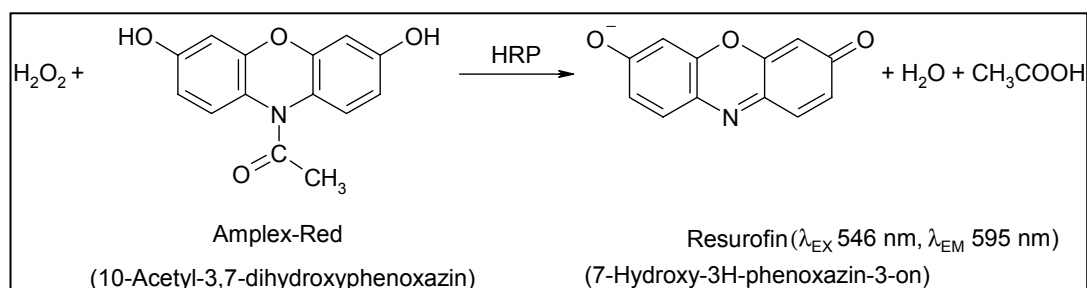
Um die Affinitäten der partiell aufgereinigten DD-Carboxypeptidasen besser beurteilen zu können, wurden die isolierten Enzyme mit der DD-Carboxypeptidase aus dem Penzym-Test (s. 3.1.3) verglichen. Der Penzym-Test verwendet die DD-Carboxypeptidase, die als extrazelluläres Enzym von *Actinomadura* R39 sezerniert wird<sup>252</sup>. Dazu wurde die DD-Carboxypeptidase aus dem Penzym-Test um den Faktor 5 verdünnt und nach Inkubation mit verschiedenen Benzylpenicillin-Mengen die verbleibende Aktivität mit dem TMB-Assay bestimmt.

Als Maß für die Affinität wurde die Konzentration an Benzylpenicillin, welche die enzymatische Aktivität zu 50 % inhibierte ( $IC_{50}$ ), herangezogen. Die  $IC_{50}$  der DD-Carboxypeptidase aus dem Penzym-Test war  $< 2$  ng/ml (Abbildung 34). Für die DD-Carboxypeptidasen aus *Streptococcus thermophilus* und *Bacillus stearothermophilus* lagen die ermittelten Werte bei 63 ng/ml und 25 ng/ml (Abbildung 34).

Verglichen mit dem Enzym aus dem Penzym-Test und dem MRL-Wert für Benzylpenicillin in Milch ( $4 \mu\text{g}/\text{kg} \approx 4$  ng/ml) besitzen die partiell aufgereinigten Enzyme eine geringe Affinität gegenüber Benzylpenicillin. Auch die Affinitäten zu Ampicillin und Cloxacillin sind, verglichen mit den für diese Penicilline festgelegten MRL-Werten (Ampicillin  $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ , Cloxacillin  $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), als gering zu beurteilen, da Cloxacillin- und Ampicillin-Konzentrationen von 4 ng/ml bzw. 30 ng/ml die isolierten DD-Carboxypeptidasen nicht inhibierten (Abbildung 32 und Abbildung 33).



**Abbildung 29: Reaktionen zum Nachweis der DD-Carboxypeptidase-Aktivität. Erläuterungen siehe Text. DD-CPase: DD-Carboxypeptidase, DAO: D-Aminosäureoxidase, FAD: Flavinadenin-dinucleotid, HRP: Meerrettichperoxidase.**



**Abbildung 30: HRP-Substrat Amplex-Red. Durch Oxidation entsteht das fluoreszierende Resurofin.**

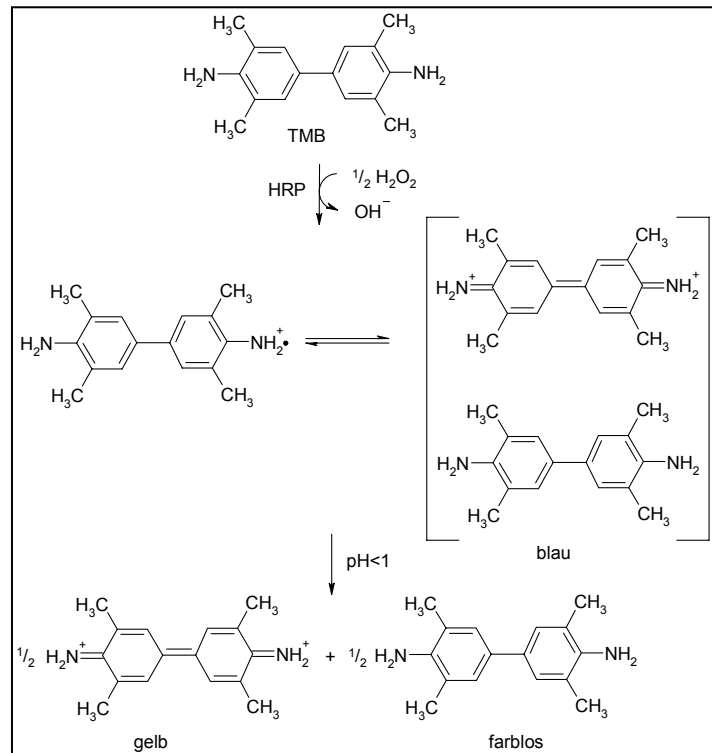


Abbildung 31: Oxidation von Tetramethylbenzidin (TMB) durch Wasserstoffperoxid und Meerrettichperoxidase (HRP)<sup>251</sup>.

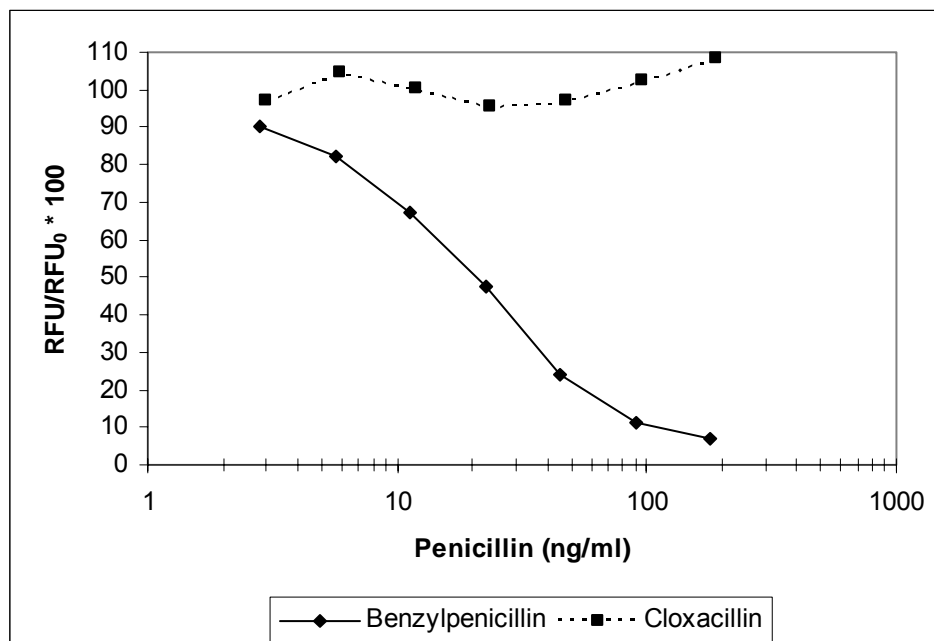


Abbildung 32: Inhibierung der DD-Carboxypeptidase aus *Streptococcus thermophilus* DS 224. Nach Inkubation mit den angegebenen Penicillinen wurde die verbleibende DD-Carboxypeptidase-Aktivität mit dem Amplex-Red-Assay wie unter 9.1.1 beschrieben bestimmt. Die relative Fluoreszenz (RFU), die für Benzylpenicillin und Cloxacillin gemessen wurde, wurde gegen die relative Fluoreszenz der ungehemmten Reaktion ( $\text{RFL}_0$ ), d.h. ohne  $\beta$ -Lactam, normiert ( $\text{RFL}/\text{RFL}_0 * 100$ ).

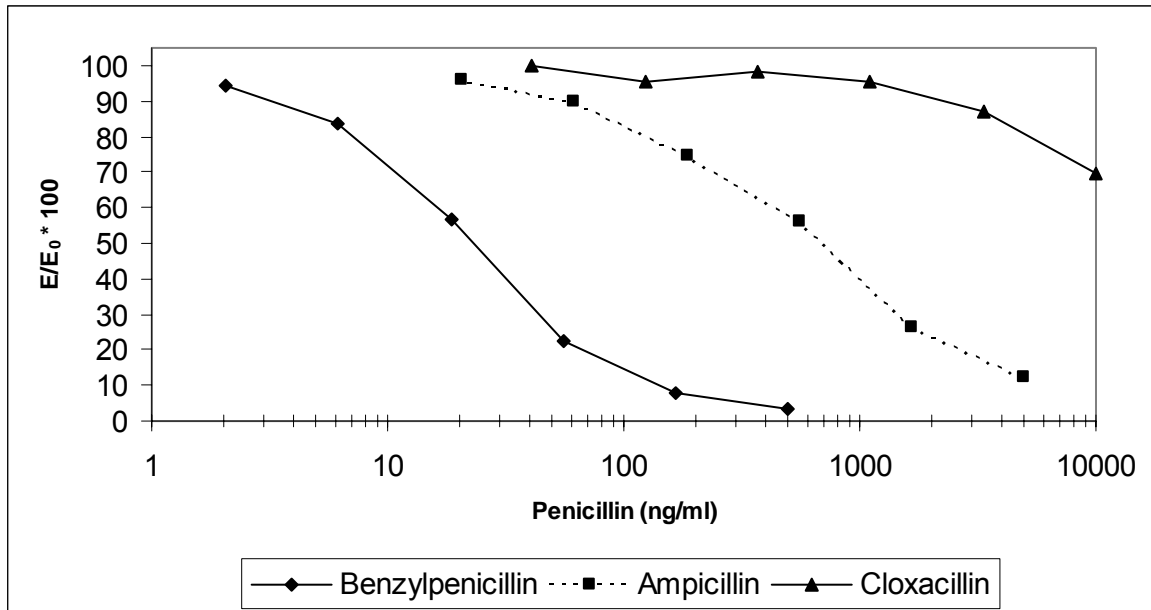


Abbildung 33: Inhibition der DD-Carboxypeptidase aus *Bacillus stearothermophilus* DSM 3299. Nach Inkubation mit den angegebenen Penicillinen wurde die verbleibende DD-Carboxypeptidase-Aktivität mit dem TMB-Assay bestimmt. Im Diagramm wurde die relative Extinktion ( $E/E_0 \cdot 100$ ) gegen die Konzentration aufgetragen.  $E_0$ : Extinktion ohne  $\beta$ -Lactam-Antibiotika.

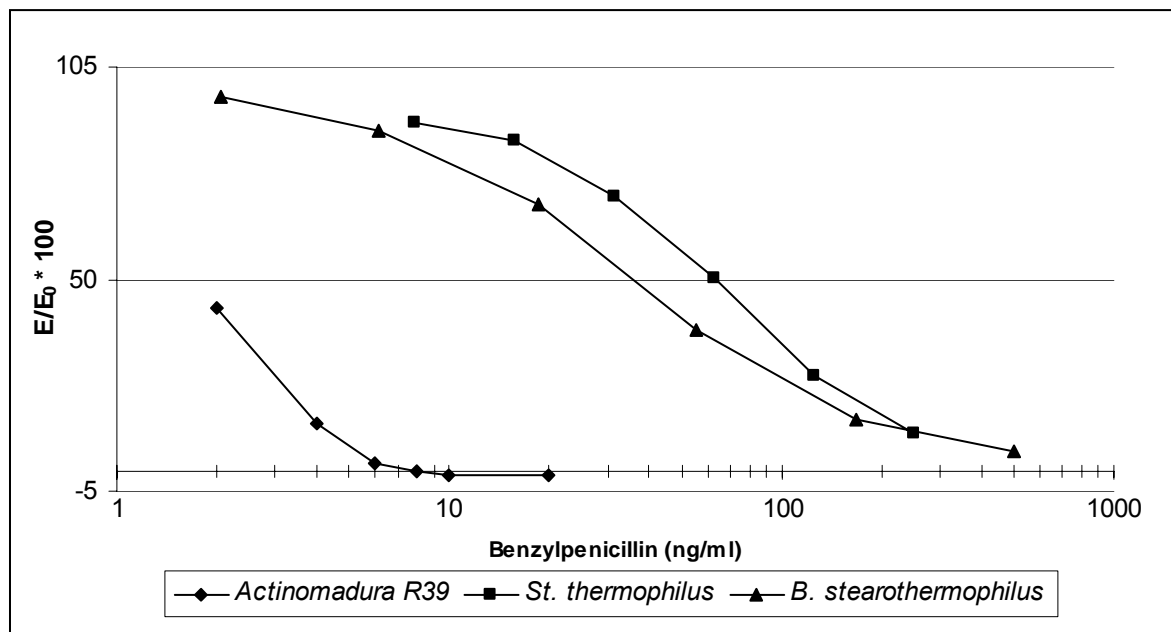


Abbildung 34: Inhibition der DD-Carboxypeptidasen aus dem Penzym-Test (*Actinomadura* R39), *Streptococcus thermophilus* (*St. thermophilus*) und *Bacillus stearothermophilus* (*B. stearothermophilus*). Die DD-Carboxypeptidase-Aktivitäten wurden nach Inkubation mit Benzylpenicillin mit dem TMB-Assay bestimmt.

### 6.3.2 Literaturrecherche: $k_2/K$ -Werte

Die Ergebnisse der Literaturrecherche hinsichtlich der  $k_2/K$ -Werte einzelner PBP zeigt Tabelle 5.

**Tabelle 5:  $k_2/K$ -Werte verschiedener PBP für veterinärmedizinisch relevante  $\beta$ -Lactam-Antibiotika.**

$k_2/K$ -Werte [ $M^{-1} s^{-1}$ ]							
	MG [kDa]	Pen G	AMPI	OXA	CLOXA	CEFTI	CEPHA
<i>Actinomadura</i> R39 <sup>252</sup> DD-CPase	53	300.000	70.000	40.000	15.000	45.000	3.000
<i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> <sup>253</sup> BlaR-CTD*	26	8,7x10 <sup>6</sup>	1,3x10 <sup>6</sup>		190.000	100.000	1.700
<i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> <sup>73</sup> PBP 4a	59	1.400	4.800			860	
<i>Escherichia coli</i> <sup>74</sup> PBP 5	41	390					
<i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> <sup>71</sup> PBP 1	123	331.000			164.500		787
<i>Escherichia</i> <i>coli</i> <sup>254</sup> PBP 3	64	4.000	4.800				45
<i>Streptococcus</i> <i>pneumoniae</i> <sup>72</sup> PBP 1a	75	34.200					
<i>Streptococcus</i> <i>pneumoniae</i> <sup>255,256</sup> PBP 2x	78	58.000	70.000	21.000			1.700

DD-CPase: DD-Carboxypeptidase, MG: Molekulargewicht, Pen G: Benzylpenicillin, AMPI: Ampicillin, CLOXA: Cloxacillin, OXA: Oxacillin, CEFTI: Ceftiofur, CEPHA: Cephalexin

\* Das BlaR-CTD-Protein ist die Carboxy-terminale Domäne des Sensorproteins BlaR, das an der Induktion der  $\beta$ -Lactamase in *Bacillus licheniformis* beteiligt ist<sup>250</sup>.

Die unterschiedlichen PBP besitzen unterschiedliche Affinitäten gegenüber den verschiedenen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Wie unter 2.4 erläutert gilt, je größer der  $k_2/K$ -Wert desto effizienter wird ein PBP durch ein  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum inhibiert, wobei die DD-Carboxypeptidase aus *Actinomadura* R39, das BlaR-CTD-Protein und das PBP 1 aus *Bacillus licheniformis* zu den sensitivsten PBP gehören, die bisher beschrieben wurden. Die DD-Carboxypeptidase aus *Actinomadura* R39 und das BlaR-CTD-Protein werden aufgrund ihrer hohen Affinitäten gegenüber den  $\beta$ -Lactam-Antibiotika im Penzym-Test bzw.  $\beta$ -Star-Test (s. 3.1.3) als spezifische Bindungskomponente eingesetzt. Neben diesen Proteinen ist das PBP 2x aus *Streptococcus pneumoniae* R6 eines der bestcharakterisierten PBP mit ebenfalls hohen  $k_2/K$ -Werten<sup>255,256</sup>. PBP 2x ist ein PBP mit hohem Molekulargewicht der Klasse B (s. 2.4) und eines der Haupttargetproteine der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in *Streptococcus pneumoniae*.

Einige Punkte sprachen für den Einsatz von PBP 2x als spezifische Bindungskomponente in dem konzipierten  $\beta$ -Lactam-spezifischen SPR-Biosensor-Assay (Abbildung 28) anstelle der anderen in Tabelle 5 aufgeführten PBP und der DD-Carboxypeptidasen aus *Streptococcus thermophilus* und *Bacillus stearothermophilus*.

1. PBP 2x ist ein PBP, das die verschiedenen Penicilline mit hoher Affinität bindet, während die Affinitäten der aufgereinigten DD-Carboxypeptidasen gegenüber Ampicillin und Cloxacillin gering sind.
2. Die  $k_2/K$ -Wert gegenüber den einzelnen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika liegen in den Größenordnungen der Werte der DD-Carboxypeptidase aus dem Penzym-Test.
3. PBP werden nur in geringen Mengen von Bakterien produziert. Der Anteil am Gesamtprotein eines Bakteriums liegt im Bereich von 0,005 bis 0,01 %<sup>257</sup>. Dementsprechend wurden aus mehreren Litern einer Bakterien-Kultur nur wenige  $\mu\text{g}$  PBP aus *Streptococcus thermophilus* und *Bacillus stearothermophilus* isoliert.
4. PBP 2x besitzt mit 78 kDA ein hohes Molekulargewicht und kann als rekombinantes lösliches Protein in großen Mengen (mehrere mg) überexprimiert werden.

Insbesondere der letzte Punkt bietet entscheidende Vorteile in der praktischen Handhabung, da PBP (mit Ausnahme extrazellulärer DD-Peptidasen) membrangebundene Proteine sind, die über kurze hydrophobe Oligopeptide (ca. 30 Aminosäuren) in der Cytoplasmamembran verankert sind<sup>56</sup>. Für *in vitro* Untersuchungen müssen sie daher mit einem geeigneten Detergenz solubilisiert und in Lösung gehalten werden. Andernfalls treten wie bei anderen Membranproteinen auch Aktivitätsverluste oder Adsorptionsverluste an allen Arten von Oberflächen auf<sup>148</sup>. Als Detergenz wird in der Regel Triton X-100 (Polyoxyethylenoctylphenylether) eingesetzt. Im Rahmen der nachfolgenden Analytik stören jedoch die in relativ hohen Kon-



zentrationen vorliegenden Detergenzien (> 0,1 %). Triton X-100 stört z.B. bei Proteinbestimmungen und der SDS-Gelelektrophorese. Bei chromatographischen Analysen stört insbesondere die hohe UV-Absorption die Detektion von Proteinen. PBP 2x kann als lösliches Derivat ohne Membranpeptid rekombinant gewonnen werden, wird dann als PBP 2x\* bezeichnet und besitzt die gleichen biochemischen Eigenschaften wie das unmodifizierte Protein<sup>258,258</sup>. Sämtliche biochemischen Analysen können damit ohne Detergenzien durchgeführt werden.

Aufgrund der  $k_2/K$ -Werte wären auch das PBP 1 aus *Bacillus licheniformis*, die DD-Carboxypeptidase aus *Actinomadura* R39 und das BlaR-CTD-Protein aus *Bacillus licheniformis* als spezifische Bindungskomponente geeignet. Verglichen mit dem PBP 2x\* (Molekulargewicht 78 kDa) besitzen diese PBP jedoch einige Nachteile für den Einsatz in dem konzipierten SPR-Biosensor-Assay:

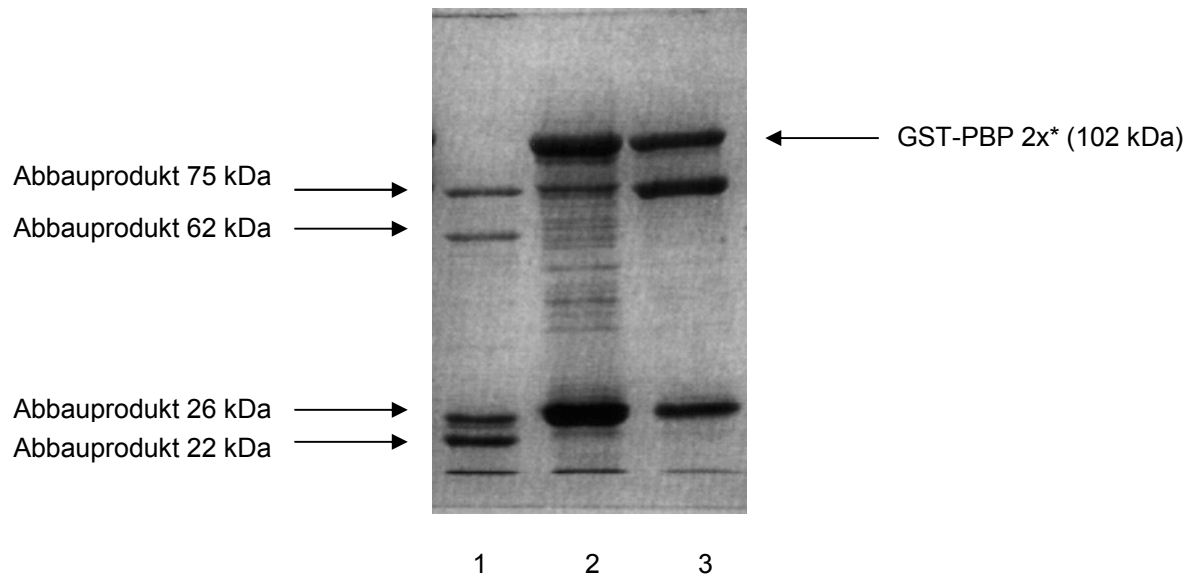
- Das BlaR-CTD-Protein besitzt mit 26 kDa ein niedriges Molekulargewicht und könnte in der SPR-Biosensor-Analyse ein niedriges Detektor-Signal liefern.
- Das PBP 1 aus *Bacillus licheniformis* wurde bisher nicht als lösliches rekombinantes Protein gewonnen. Sämtliche Untersuchungen müssten daher mit Triton X-100 durchgeführt werden, um, wie oben geschildert, Aktivitäts- und Adsorptionsverluste vorzubeugen.
- Die DD-Carboxypeptidase von *Actinomadura* R39 zeigte in den von Gustavsson *et al.*<sup>247</sup> entwickelten SPR-Biosensor-Assays eine geringe Affinität gegenüber Cloxacillin, ein in Mastitispräparaten häufig eingesetztes Penicillin.

Nach Betrachtung der oben aufgeführten Argumente wurde das PBP 2x\* als spezifische Bindungskomponente bevorzugt.

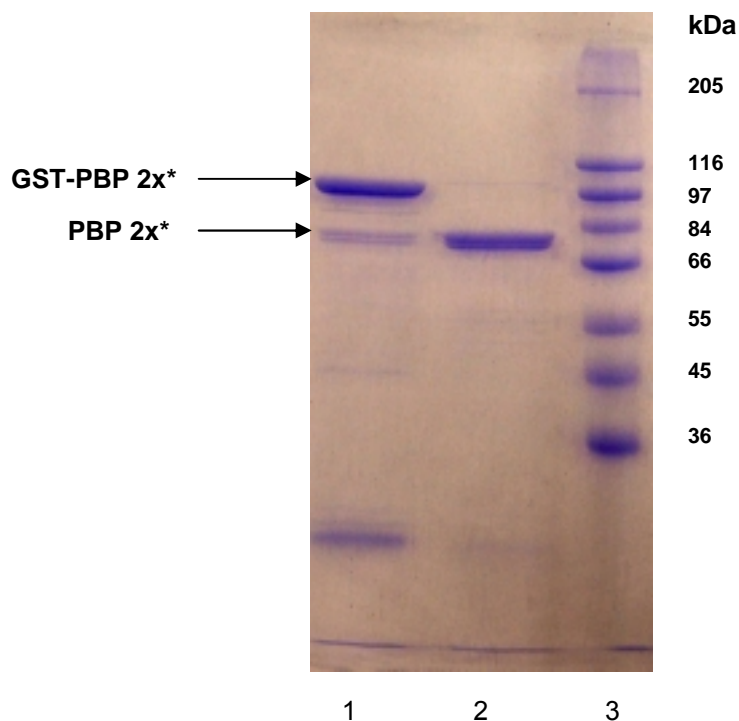
### 6.3.3 PBP 2x\* aus *Streptococcus pneumoniae*

PBP 2x\* wurde als Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein (GST-PBP 2x\*) in *E. coli* über-exprimiert. Dabei sind PBP 2x\* und GST-Protein über das Peptid Leu-Glu-Val-Phe-Gln-Gly-Pro, das durch die Prescission-Protease (Amersham Biosciences, Freiburg) zwischen Gln und Gly spezifisch gespalten wird, verbunden. Dies erlaubt es das PBP 2x\* vom GST-Protein enzymatisch abzuspalten. Im Vergleich zum nicht-modifizierten PBP 2x fehlen dem PBP 2x\* die Aminosäuren 19 – 48<sup>259</sup>. Im dazugehörigen Gen *pbp2x* wurde die Nucleotidsequenz, die dieses Membranpeptid codiert, entfernt<sup>258</sup>.

Die ersten Analysen zur Entwicklung des SPR-Biosensor-Assays wurden mit dem intakten GST-PBP 2x\* durchgeführt, das nach dem Aufschluss der Zellen aus dem Cytosol mittels Glutathion-Affinitätschromatographie isoliert wurde. Das Fusionsprotein erwies sich jedoch als instabil. Nach SDS-PAGE wurden neben dem erwarteten Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 102 kDa weitere Proteine angefärbt (Abbildung 35). Zunächst wurde vermutet, dass es sich dabei um unspezifisch isolierte Proteine aus *E. coli* handelte. Durch Lagerversuche bei 4 °C wurde jedoch festgestellt, dass es sich um Abbauprodukte des GST-PBP 2x\* handelt, da im Laufe der Zeit die zunächst dominante Bande bei 102 kDa abnahm und die Intensitäten der anderen Banden zunahm (Abbildung 35). Ob der Abbau auf enzymatische Reaktionen, z.B. durch Proteasen aus *E. coli*, oder chemische Reaktionen während der Proteinisolierung, zurückzuführen ist, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Versuche den Abbau des GST-PBP 2x\* durch den Zusatz von Proteaseinhibitoren (Protease-Inhibitor-Cocktail, Sigma, Taufkirchen) zu verhindern, zeigten aber keinen Erfolg. Die Abbauprodukte waren im Vergleich zum GST-PBP 2x\* relativ stabil. Das Proteinmuster veränderte sich innerhalb von 2 Monaten nicht wesentlich (Abbildung 35). Die Differenz von 24 kDa zwischen GST-PBP 2x\* mit einem ermittelten Molekulargewicht von ca. 102 kDa und PBP 2x\* mit 78 kDa deutete darauf hin, dass das GST-Protein (26 kDa) von dem intakten Fusionsprotein GST-PBP 2x\* abgespalten wurde. Daher wurde im weiteren Verlauf das GST-Protein durch Verdau mit der Prescission-Protease abgespalten. GST-Protein und Prescission-Protease, ebenfalls ein GST-Fusionsprotein, wurden anschließend durch einen zweiten affinitätschromatographischen Schritt entfernt. GST-Protein und Prescission-Protease wurden vom immobilisierten Glutathion zurückgehalten, während PBP 2x\* im Durchlauf blieb, da es ohne GST-Protein nicht mit der stationären Phase wechselwirken konnte.



**Abbildung 35: SDS-PAGE GST-PBP 2x\*.** GST-PBP 2x\* wurde mittels Glutathion-Affinitätschromatographie aus dem Rohextrakt aufgereinigt und anschließend bei 4 °C gelagert. Die Proteine (2 - 3 µg pro Tasche) wurden auf einem 10 %-Acrylamid-Gel getrennt und mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt. 1: Lagerzeit zwei Monate, 2: Lagerzeit sechs Tage, 3: Lagerzeit 19 Tage.



**Abbildung 36: SDS-PAGE PBP 2x\*.** 1: GST-PBP 2x\* nach erster Glutathion-Affinitätschromatographie (2 µg), 2: PBP 2x\* nach Precision-Protease-Verdau von GST-PBP 2x\* und wiederholter Glutathion-Affinitätschromatographie (1 µg), 3: Molekulargewichtsstandard (Sigma high range). Weitere Bedingungen siehe Abbildung 35.

PBP 2x\* konnte durch die zweifache Affinitätschromatographie bis zu einem hohen Reinheitsgrad aufgereinigt werden, wobei nach SDS-PAGE und Anfärbung mit Coomassie-Brillant-Blau zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von 77 kDa und 75 kDa im Gel zu sehen waren (Abbildung 36). Ein derartiges heterogenes Molekulargewichtsverhalten für rekombinantes PBP 2x\* wurde auch von Lu *et al.*<sup>70</sup> und Pares *et al.*<sup>260</sup> beobachtet. Die mittels SDS-PAGE ermittelten Molekulargewichte stimmten mit dem erwarteten Molekulargewicht von 78 kDa für das PBP 2x\* überein. Aus 3 g Zellen (Nassgewicht) konnten etwa 4 mg PBP 2x\* isoliert werden. Das aufgereinigte PBP 2x\* war wie die Abbauprodukte des GST-PBP 2x\* stabil und konnte in 10 % wässrigem Glycerin über mehrere Monate bei -20 °C ohne Aktivitätsverlust gelagert werden.

### Penicillin-bindende Aktivität

Der Nachweis, dass GST-PBP 2x\* und PBP 2x\*  $\beta$ -Lactam-Antibiotika binden, erfolgte mit Bocillin FL (Abbildung 37) und Gelfiltrationschromatographie mit nachfolgender Fluoreszenzdetektion. Bocillin FL ist ein fluoreszierendes Penicillin V-Derivat, das zum Nachweis von PBP eingesetzt werden kann<sup>261</sup>. Abbildung 38 zeigt typische Chromatogramme einer Analyse. Den Konjugaten von GST-PBP 2x\* und PBP 2x\* mit Bocillin FL konnte jeweils ein Peak zugeordnet werden, so dass beide Proteine Penicillin-bindende Aktivität besaßen. Die Spezifität der Bindung zwischen Bocillin FL und PBP wurde mit einem nicht-kompetitiven Assay überprüft. Vor der Zugabe von Bocillin FL wurde das PBP 2x\* mit Benzylpenicillin inkubiert. Benzylpenicillin inhibierte die Bildung der PBP 2x\*/Bocillin FL-Konjugate, was für die Spezifität der Reaktion mit Bocillin FL spricht.

Die Konzentration an aktivem PBP 2x\* wurde mit Ampicillin und Bocillin FL in Anlehnung an die von Jamin *et al.*<sup>256</sup> beschriebene „active site titration“ bestimmt (s. 9.2.1), nachdem PBP 2x\* mit unterschiedlichen Mengen an Ampicillin inkubiert wurde. Die Konzentration an PBP 2x\* wurde aus der Kalibrierreihe mit Ampicillin extrapoliert, wobei angenommen wurde, dass PBP 2x\* und Ampicillin ein äquimolares Konjugat bilden<sup>256</sup>. Abbildung 39 zeigt, dass mit steigender Ampicillin-Konzentration die Penicillin-bindende Aktivität sank. Die Konzentration an aktivem PBP 2x\* entspricht der Ampicillin-Menge, die das Enzym vollständig inhibiert.

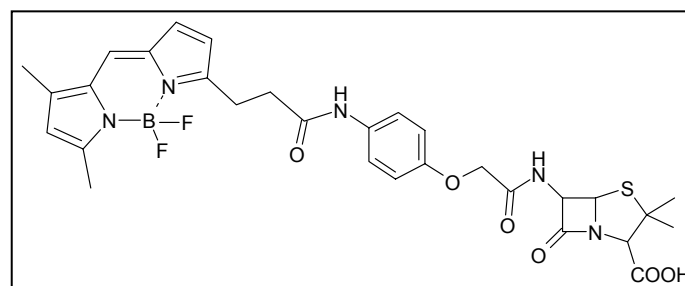
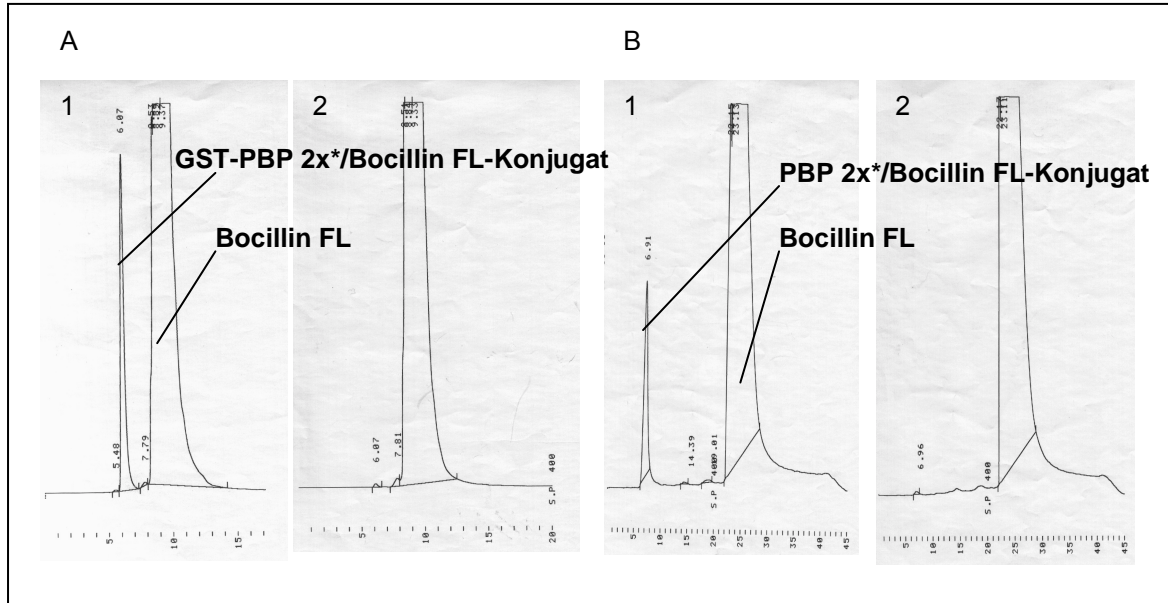
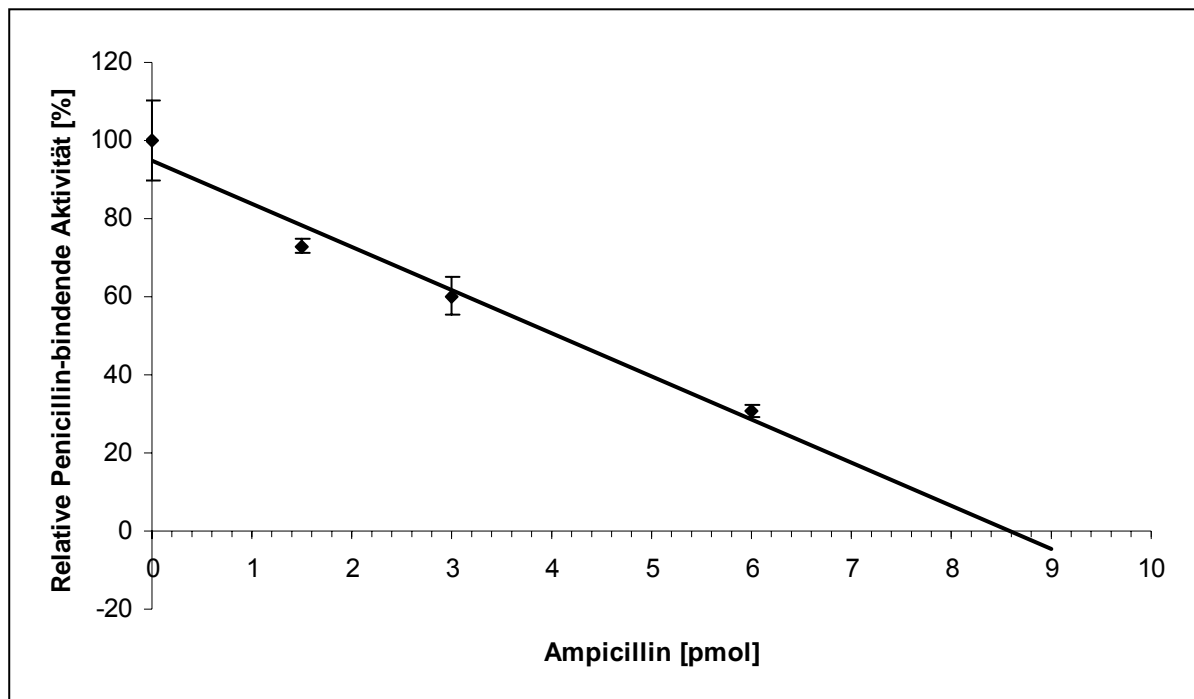


Abbildung 37: Bocillin FL.



**Abbildung 38:** Gelfiltrationschromatographie mit nachfolgender Fluoreszenzdetektion zum Nachweis der Penicillin-bindenden Aktivität von GST-PBP 2x\* (A) und PBP 2x\* (B). A1 und B1: GST-PBP 2x\* und PBP 2x\* wurden mit Bocillin FL inkubiert und wie unter 9.2.1 beschrieben analysiert. A2 und B2: Die Proteine wurden vor der Zugabe von Bocillin FL mit Benzylpenicillin inkubiert. Die unterschiedlichen Retentionszeiten sind auf die Verwendung von zwei unterschiedlichen Gelfiltrationssäulen zurückzuführen (s. 9.2.1).



**Abbildung 39:** Titration von PBP 2x\* mit Ampicillin. PBP 2x\* wurde mit unterschiedlichen Ampicillin-Mengen inkubiert. Die verbleibende Penicillin-bindende Aktivität wurde mit Bocillin FL bestimmt (s. 9.2.1).

### 6.3.4 Markermolekül-markiertes $\beta$ -Lactam-Antibiotikum

Neben dem PBP müssen das markierte  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum und der Antikörper, der gegen das Markermolekül gerichtet ist, bestimmte Voraussetzungen erfüllen, damit der unter 6.1 beschriebene  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-spezifische SPR-Biosensor-Assay erfolgreich aufgebaut werden kann. Diese sind:

1. Das markierte  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum sollte vom PBP 2x\* gebunden werden.
2. Bei dem Markermolekül sollte es sich um ein Molekül handeln, das als natürlicher Bestandteil nicht in Lebensmitteln vorkommt, damit es nur zu geringen unspezifischen Reaktionen mit Lebensmittelinhaltsstoffen kommt.
3. Es sollte sich um ein Molekül handeln, gegen das Antikörper erhältlich sind, wobei der Antikörper eine hohe Affinität gegenüber dem Markermolekül besitzen sollte.

### 6.3.5 Digoxigenin-, Dinitrophenyl- und Fluorescein-markierte Ampicilline

In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl markierter  $\beta$ -Lactam-Antibiotika synthetisiert, um PBP zu untersuchen. Die nachfolgend aufgeführten Studien mit markierten Penicillinen dienten als Grundlage für die eigene Arbeit. Laible *et al.*<sup>258</sup> haben Ampicillin mit [<sup>3</sup>H]Propionsäure markiert, um rekombinantes PBP 2x und PBP 2x\* nachzuweisen. In den Arbeiten von Galleni *et al.*<sup>262</sup> und Lakaye *et al.*<sup>263</sup> wurden verschiedene Penicilline mit Fluorescein markiert, um PBP quantitativ zu bestimmen, wobei PBP 2x\* Fluorescein-markiertes Ampicillin mit hoher Affinität gebunden hat. Weigel *et al.*<sup>264</sup> haben für den Nachweis von PBP Ampicillin mit Digoxigenin markiert. Die PBP wurden mit Digoxigenin-markiertem Ampicillin inkubiert und nach SDS-PAGE und Western Blotting mit Digoxigenin-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Alle aufgeführten markierten Derivate wurden über die Aminogruppe des Ampicillins synthetisiert.

Da PBP 2x\* Ampicillin, das über die Aminogruppe modifiziert wurde, bindet, wurde für die Entwicklung des SPR-Biosensor-Assays ebenfalls Ampicillin als Edukt für die Synthese verschiedener Konjugate eingesetzt. Ampicillin (AMPI) wurde mit Digoxigenin- (DIG), 2,4-Dinitrophenyl- (DNP) oder Fluorescein-Derivaten (FLU) markiert (Abbildung 40). Diese Moleküle wurden gewählt, weil sie sich in der Bioanalytik als Markermoleküle bewährt haben und hochaffine Antikörper gegen diese Verbindungen erhältlich sind<sup>148</sup>. Daneben sind DNP und FLU synthetische Verbindungen, so dass wenig unspezifische Reaktionen mit Lebensmittelinhaltsstoffen zu erwarten waren. Letzteres gilt auch für DIG, da es als Naturstoff ausschließlich in *Digitalis*-Pflanzen vorkommt<sup>148</sup>.

DIG, DNP und FLU wurden als aktivierte *N*-Hydroxysuccinimidester an die Aminogruppe vom Ampicillin gebunden, wobei FLU als gemischtes 5' und 6'-Isomer eingesetzt wurde (Abbildung 40). Bei allen markierten Derivaten befand sich 6-Aminohexanäure als Spacer zwischen Ampicillin und Markermolekül (Abbildung 40). Die entsprechenden Produkte werden im weiteren Verlauf abgekürzt DIG-AMPI, DNP-AMPI und FLU-AMPI bezeichnet.

Der Verlauf der Synthesen wurde mittels HPLC verfolgt. Die Reaktionsprodukte wurden durch Zugabe von  $\beta$ -Lactamase oder PBP 2x\* zu den Reaktionsansätzen identifiziert. Nach Zugabe von  $\beta$ -Lactamase verschoben sich in den Chromatogrammen die Retentionszeiten einiger Peaks zu kürzeren Retentionszeiten hin (Abbildung 41 A), da die entstandenen Ampicillosäuren aufgrund der zusätzlichen Carboxylgruppe polarer als die intakten markierten Ampicilline sind. Nach Zugabe von PBP 2x\* verringerte sich die Fläche des dem markierten Ampicillin zugeordneten Peaks, weil sich die Konzentration an markiertem Ampicillin aufgrund der gebildeten PBP 2x\*/Ampicillin-Konjugate verringerte (Abbildung 41 B und C). FLU-AMPI wurde nach der Synthese durch Flüssig-Flüssig-Verteilung aufgereinigt, während DIG-AMPI und DNP-AMPI mittels RP-HPLC aufgereinigt wurden. Ohne eine ausreichende Aufreinigung der markierten Ampicilline hätte der SPR-Biosensor-Assay nicht entwickelt werden können, da sowohl nicht umgesetztes Ampicillin als auch nicht umgesetztes Markermolekül, die Sensitivität des indirekten,  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-spezifischen SPR-Biosensor-Assays verringert hätte. Nicht umgesetztes Ampicillin würde das PBP inhibieren, so dass weniger markiertes Ampicillin vom PBP gebunden werden würde. Nicht umgesetztes Markermolekül würde andererseits mit dem markierten Ampicillin um die Paratope\* der immobilisierten, Markermolekül-spezifischen Antikörper konkurrieren und zu einem geringeren Response führen. Die Reinheit der aufgereinigten, markierten Ampicilline wurde durch erneute HPLC-Analysen überprüft. Die Identitäten von FLU-AMPI und DIG-AMPI wurden zusätzlich massenspektrometrisch bestätigt (s. Anhang).

### 6.3.6 Charakterisierung der markierten Ampicilline: Interaktion mit PBP 2x\*

Da FLU-AMPI fluoresziert, konnte die Bildung von PBP 2x\*/FLU-AMPI-Konjugaten direkt mittels Gelfiltrationschromatographie und nachfolgender Fluoreszenzdetektion nachgewiesen werden. PBP 2x\* lieferte nach Inkubation mit FLU-AMPI einen Peak, der dem PBP 2x\*/FLU-AMPI-Konjugat zugeordnet werden konnte.

Um festzustellen, ob DIG-AMPI oder DNP-AMPI vom PBP 2x\* gebunden werden, wurden diese markierten Ampicilline in einer ersten Reaktion mit PBP 2x\* inkubiert. Anschließend wurde in einer zweiten Reaktion Bocillin FL zugegeben und die Penicillin-bindende Aktivität mittels Gelfiltrationschromatographie bestimmt (9.3.2, 9.3.3). Sowohl DIG-AMPI als auch

\* Paratop: Antigen-bindender Bereich eines Antikörpers, Epitop: Teilstruktur eines Antigens, die von einem Antikörper erkannt und gebunden wird<sup>147</sup>.

DNP-AMPI verhinderten, dass das PBP 2x\*/Bocillin FL-Konjugat entstand. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass diese markierten Ampicilline ebenfalls mit dem PBP 2x\* spezifisch interagierten.

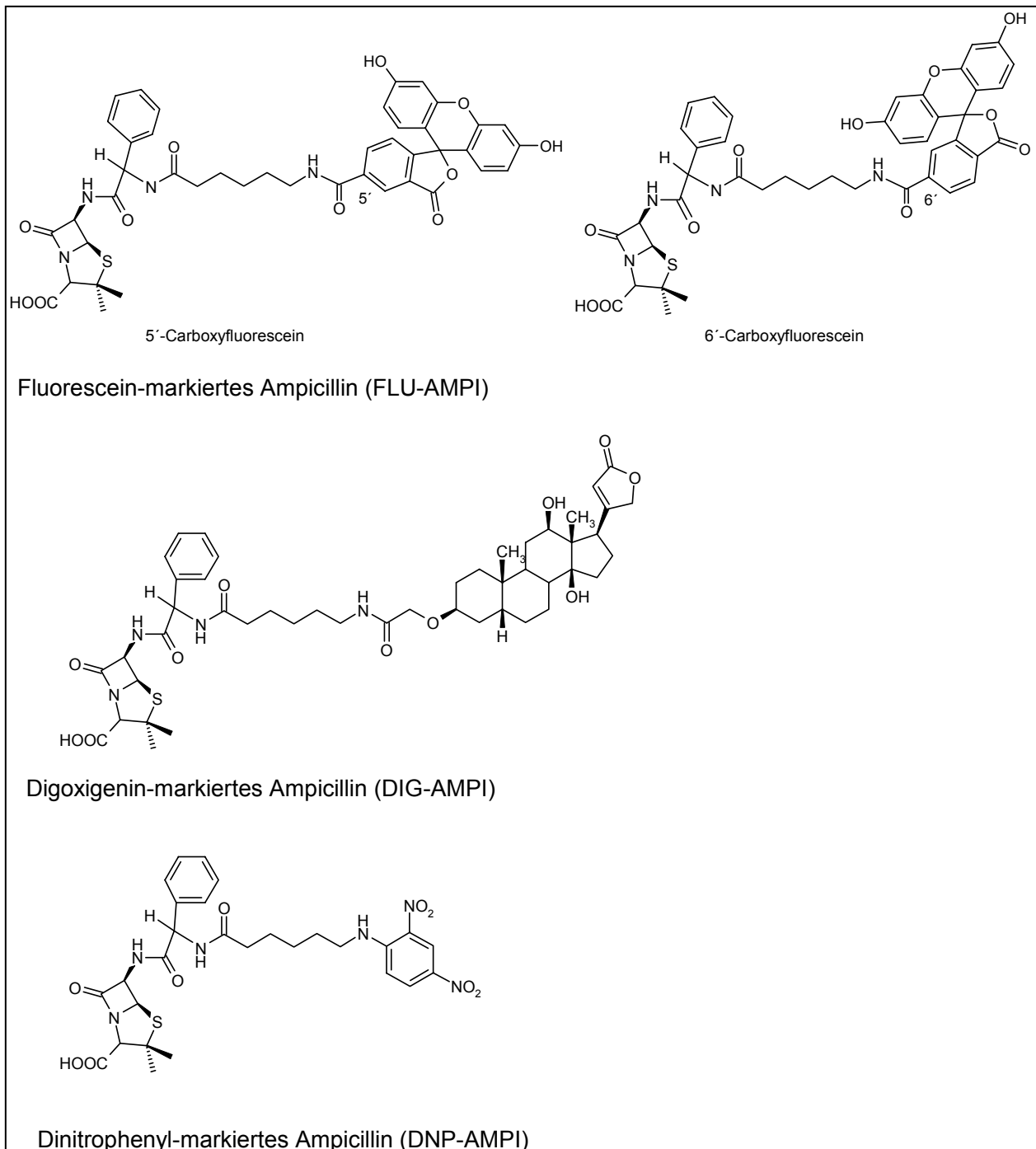
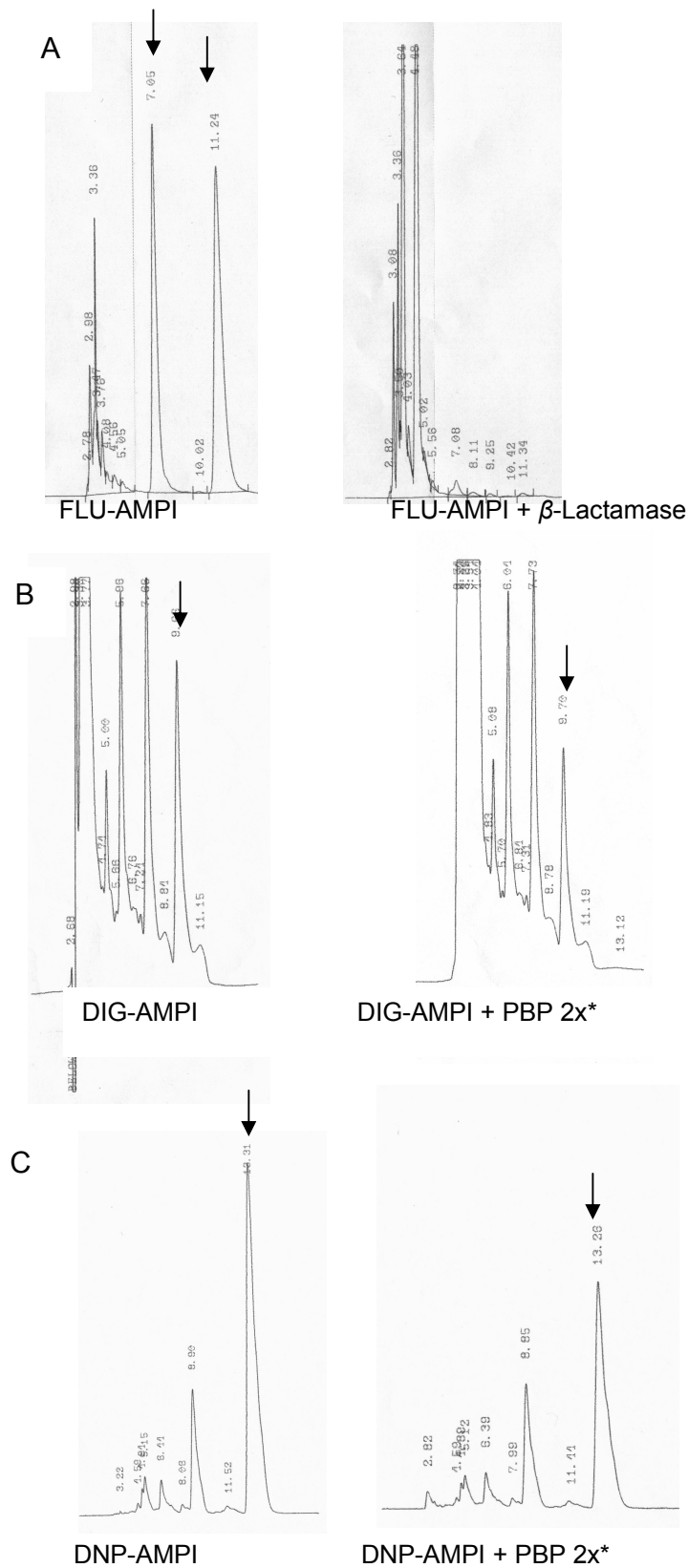


Abbildung 40: Markierte Ampicilline, die für die Entwicklung des  $\beta$ -Lactam-spezifischen SPR-Biosensor-Assays synthetisiert wurden.





**Abbildung 41: Identifizierung von FLU-AMPI (A), DIG-AMPI (B) und DNP-AMPI (C) mittels HPLC**  
 Erläuterungen siehe Text. Die Pfeile zeigen auf die Peaks, die den entsprechenden markierten Ampicillinen zugeordnet wurden. Chromatographische Parameter s. 9.3.1 für FLU-AMPI, 9.3.2 für DIG-AMPI und 9.3.3 für DNP-AMPI.

## 6.4 Entwicklung des $\beta$ -Lactam-Antibiotika-spezifischen SPR-Biosensor-Assays

### 6.4.1 Markermolekül-spezifische Antikörper

Neben dem PBP und dem markierten Ampicillin (M-Ampicillin) ist der Markermolekül-spezifische Antikörper die dritte essentielle Komponente des indirekten SPR-Biosensor-Assays (Abbildung 28). Für jedes markierte Ampicillin wurden verschiedene monoklonale und polyklonale Markermolekül-spezifische Antikörper untersucht (Tabelle 6), um die entsprechenden PBP 2x\*/M-Ampicillin-Konjugate nachzuweisen. Die Markermolekül-spezifischen Antikörper wurden für die SPR-Biosensor-Analysen auf dem Sensor-Chip (ein Antikörper pro Flusszelle) mittels EDC/NHS-Kopplung (Abbildung 22) immobilisiert. Um ein möglichst sensitives System zu entwickeln, wurde ein möglichst hoher Immobilisierungsgrad von 10.000 RU - 15.000 RU gewählt.

**Tabelle 6: Für die SPR-Biosensor-Analysen verwendete Markermolekül-spezifische Antikörper.**

<b>Markiertes Ampicillin</b>	<b>Markermolekül-spezifische Antikörper</b>	<b>Subklasse, Spezies</b>
FLU-AMPI	- monoklonaler Anti-Fluorescein-AK* Klon F4/1 (Alexis, Grünberg)	IgG, Maus
	- monoklonaler Anti-Fluorescein-AK Klon 2A3 (Acris, Hiddenhausen)	IgG, Maus
	- monoklonaler Anti-Fluorescein-AK Klon DE3 (Biotrend, Köln)	IgG, Maus
DIG-AMPI	- monoklonaler Anti-Digoxigenin-AK Klon 1.71.256 (Roche Applied Science, Mannheim)	IgG, Maus
	- polyklonaler Anti-Digoxigenin-AK (Roche Applied Science, Mannheim)	IgG, Schaf
DNP-AMPI	- polyklonaler Anti-Dinitrophenyl-AK (Zytomed, Berlin)	IgG, Kaninchen
	- monoklonaler Anti-Dinitrophenyl-AK Klon SPE-7 (Sigma, Taufkirchen)	IgE, Maus

\* AK, Antikörper

### 6.4.2 Regenerierung des Sensor-Chips

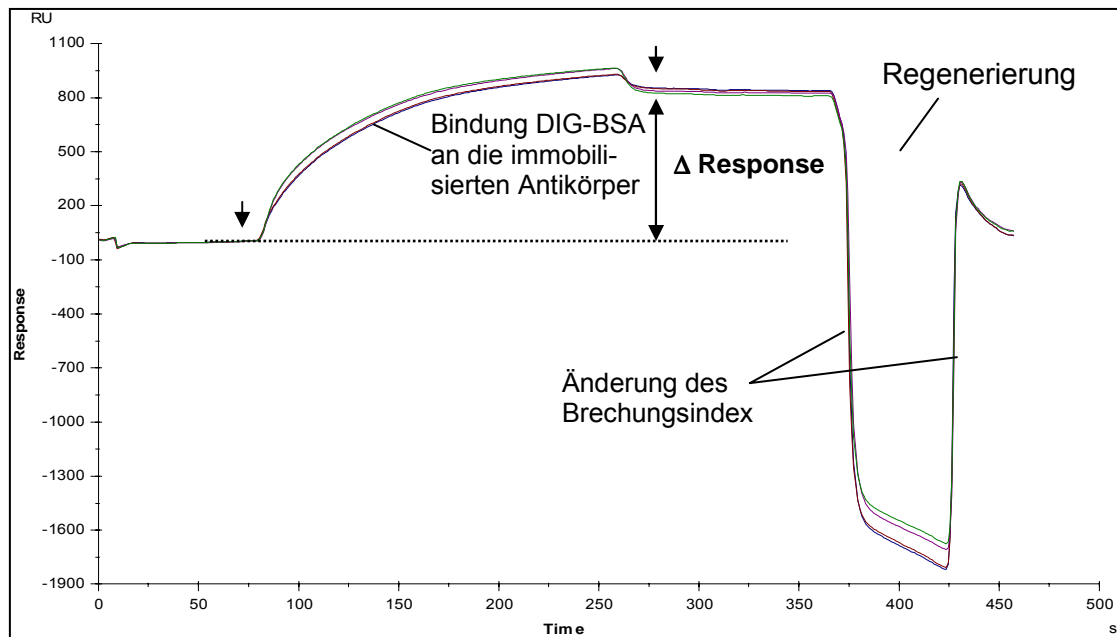
Wie unter 4.1.6 erläutert, ist die Regenerierung ein Teilschritt der biomolekularen Interaktionsanalyse. Die in Tabelle 7 aufgeführten Lösungen wurden als Regenerierungslösungen für die unterschiedlichen Markermolekül/Antikörper-Komplexe untersucht<sup>223,265</sup>.

**Tabelle 7: Lösungen, die für die Regenerierung der Markermolekül/Antikörper-Komplexe eingesetzt wurden.**

A. 10 mM Glycin pH 2,2	G. 5 mM NaOH mit 10 % Acetonitril
B. 5 mM NaOH	H. 5 mM NaOH mit 5 % Methanol
C. 10 mM NaOH	I. 5 mM NaOH mit 10 % Methanol
D. 25 mM NaOH	J. 10 mM Glycin pH 2,2 und anschließend 0,05 % SDS
E. 50 mM NaOH	K. 5 mM NaOH und anschließend 0,05 % SDS
F. 5 mM NaOH mit 5 % Acetonitril	

Als Analyt wurde jedoch nicht das jeweils aus PBP 2x\* und markiertem Ampicillin gebildete Konjugat (PBP 2x\*/M-Ampicillin-Konjugat) eingesetzt, sondern stellvertretend Fluorescein-markiertes Streptavidin für die Fluorescein-spezifischen Antikörper, Digoxigenin-markiertes Rinderserumalbumin für die Digoxigenin-spezifischen Antikörper und Dinitrophenyl-markiertes Rinderserumalbumin für die Dinitrophenyl-spezifischen Antikörper. Die markierten Proteine waren für die Ermittlung der Regenerierungsbedingungen besser geeignet als PBP 2x\*/M-Ampicillin-Konjugate, weil keine zusätzlichen Inkubationsschritte vor den Biosensor-Analysen durchgeführt werden mussten. Um die Regenerierungsbedingungen mit den PBP 2x\*/M-Ampicillin-Konjugaten zu ermitteln, hätten PBP 2x\* und markiertes Ampicillin in einer ersten Reaktion für mindestens 15 min zusammengegeben werden müssen. Durch den Einsatz der markierten Proteine konnte dieser erste Inkubationsschritt vermieden und die Analysenzeit für die jeweilige Analysenreihe verkürzt werden.

Abbildung 42 zeigt die Sensorgramme der biomolekularen Interaktionsanalysen von Digoxigenin-markiertem Rinderserumalbumin mit immobilisierten monoklonalen Digoxigenin-spezifischen Antikörpern. Die Bindung des Digoxigenin-markierten Rinderserumalbumins zeigte einen für Antigen/Antikörper-Wechselwirkungen typischen „parabelförmigen“ Verlauf. Die Änderung des Brechungsindex zu den Zeitpunkten, ab welchen die Regenerierungslösung am Sensor-Chip vorbeiströmte und ab wann sie durch den Lauf-Puffer wieder ersetzt wurde, konnte als steiler Abfall und Anstieg im Response beobachtet werden.



**Abbildung 42: Biomolekulare Interaktionsanalyse (n = 4) für Digoxigenin-markiertes Rinderse- rumalbumin (DIG-BSA). Auf dem Sensor-Chip wurden monoklonale Digoxigenin-spezifische Antikörper immobilisiert. Bei jeder Analyse wurden 15  $\mu$ l Digoxigenin-markiertes Rinderserum- albumin (10  $\mu$ g/ml) injiziert. Die Regenerierung erfolgte durch eine Injektion von 5  $\mu$ l 5 mM Natronlauge mit 10 % Acetonitril. Der Mittelwert der  $\Delta$  Response-Werte betrug 841 RU  $\pm$  1,6 % (Variationskoeffizient). Die Zeitpunkte (5 sec vor und 30 sec nach der Injektion der Probe), die für die Messung der  $\Delta$  Response-Werte herangezogen wurden, sind mit Pfeilen gekennzeichnet.**

Die Regenerierung wurde als ausreichend beurteilt, wenn der Variationskoeffizient der  $\Delta$  Response-Werte von vier hintereinander durchgeführten biomolekularen Interaktionsana- lysen kleiner 5 % war. Da Markermolekül in den markierten Proteinen und in den PBP 2x\*/M-Ampicillin-Konjugaten identisch waren, konnte davon ausgegangen werden, dass die Regenerierung bei beiden Protein-Derivaten mit gleicher Effizienz erfolgte.

Die Regenerierungsversuche ergaben, dass die drei Fluorescein-spezifischen Antikörper mit einer ersten Injektion von 10 mM Glycin pH 2,2 und einer anschließenden Injektion von 0,05 % SDS in HBSEP-Puffer (w/v) regeneriert werden konnten. Der monoklonale Digoxige- nin-spezifische Antikörper und der monoklonale Dinitrophenyl-spezifische Antikörper konnten mit Lösung G (5 mM NaOH mit 10 % (v/v) Acetonitril) regeneriert werden. Der monoklonale Dinitrophenyl-spezifische Antikörper verlor jedoch nach ca. 50 Injektionen etwa 50 - 70 % seiner ursprünglichen Aktivität. Die Markermolekül-Komplexe des polyklonalen Digoxige- nin-spezifischen Antikörpers sowie des polyklonalen Dinitrophenyl-spezifischen Antikörpers konnten mit den getesteten Regenerierungslösungen nicht dissoziiert werden. Dies deutet darauf hin, dass diese Antikörper eine sehr hohe Affinität gegenüber ihren Hapten-Molekülen aufweisen. Der polyklonale Digoxigenin-spezifische Antikörper und DNP-AMPI in Kombinati- on mit den Dinitrophenyl-spezifischen Antikörper wurden daher für die weitere Entwicklung nicht mehr berücksichtigt.

Bei der Entwicklung von SPR-Biosensor-Assays für niedermolekulare Verbindungen, die auf Antigen/Antikörper-Reaktionen basieren, tritt das Problem, dass keine geeigneten Regenerierungsbedingungen ermittelt werden können, häufig auf<sup>223</sup>. Die verwendeten Antikörper sollen zwar eine große Affinität gegenüber ihrem Antigen besitzen, damit eine niedrige Nachweisgrenze erzielt werden kann, die Affinitäten dürfen jedoch einen gewissen Wert (Dissoziationskonstante  $K_D < 10^{-10}$  M) nicht überschreiten, da in diesem Fall die Antigen/Antikörper-Komplexe nicht ausreichend dissoziiert werden können und somit keine reproduzierbare Analysen durchgeführt werden können. Für biomolekulare Interaktionsanalysen sollten nach Nieba *et al.*<sup>266</sup> die Dissoziationskonstanten  $K_D$  von Antigen/Antikörper-Komplexen im Bereich von  $10^{-5}$  bis  $10^{-10}$  M liegen.

### 6.4.3 Orientierende Voruntersuchungen

Nachdem die Regenerierungsbedingungen ermittelt worden waren, wurde PBP 2x\* gegen jedes markierte Ampicillin titriert, wobei die Konzentrationen an PBP 2x\* und FLU-AMPI oder PBP 2x\* und DIG-AMPI variiert wurden (Schachbrett-titration)<sup>240</sup>. Bei den Experimenten mit DIG-AMPI wurde der immobilisierte monoklonale Digoxigenin-spezifische Antikörper eingesetzt und bei den Experimenten mit FLU-AMPI die in Tabelle 6 aufgeführten Fluorescein-spezifischen Antikörper. Der Immobilisierungsgrad der Antikörper lag im Bereich von 10.000 RU – 15.000 RU. Für die SPR-Biosensor-Analyse wurden 15 µl PBP 2x\*-haltige Lösung injiziert. Die Regenerierung erfolgte wie unter 6.4.2 beschrieben. Mit den Schachbrett-titrationen konnten folgende Fragen beantwortet werden:

- a) Wird das Markermolekül im markierten Ampicillin von den immobilisierten Markermolekül-spezifischen Antikörpern erkannt, nachdem das markierte Ampicillin vom PBP 2x\* gebunden wurde?
- b) Welche Kombination aus markiertem Ampicillin und Markermolekül-spezifischem Antikörper liefert die höchste Empfindlichkeit, d.h. Response?
- c) Welche Mengen an PBP 2x\* und markiertem Ampicillin, die sich gegenseitig beeinflussen (s.u.), liefern ein maximales Detektorsignal?

#### DIG-AMPI/Digoxigenin-spezifischer Antikörper

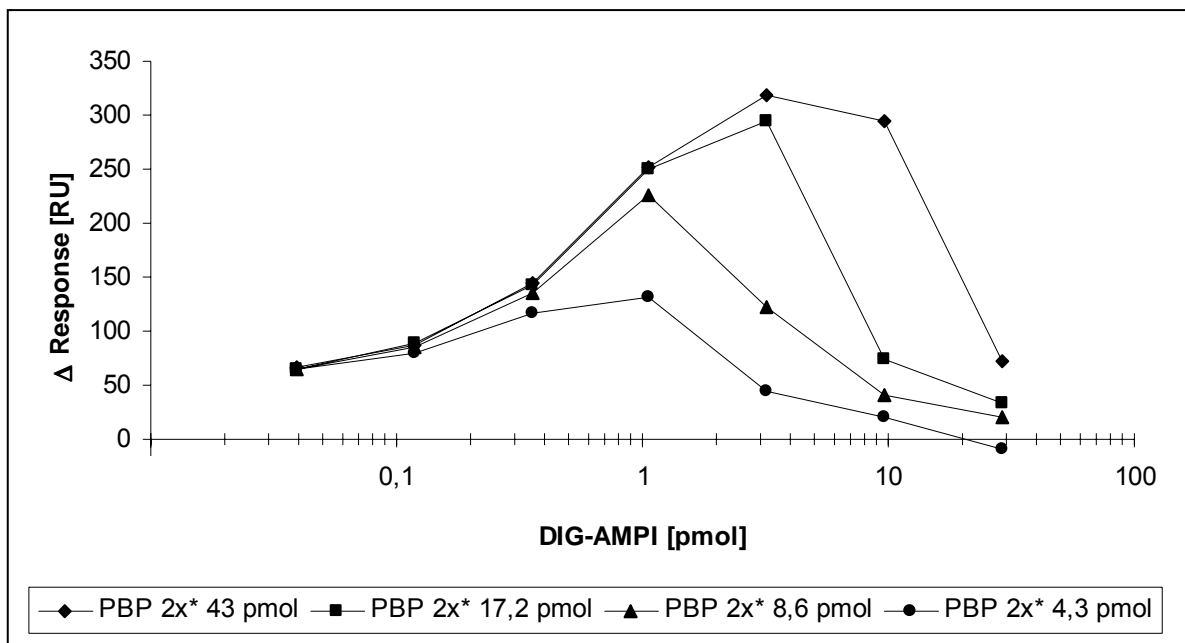
Der immunochemische Nachweis von PBP nach Markierung mit DIG-AMPI wurde erstmalig 1994 von Weigel *et al.*<sup>264</sup> beschrieben. Abweichend von der Original-Vorschrift wurden die PBP/DIG-AMPI-Konjugate jedoch nicht nach SDS-PAGE und Western-Blotting, wodurch Proteine denaturieren, visualisiert, sondern als native Proteine mittels SPR-Biosensor-Analyse nachgewiesen. Die entstandenen PBP 2x\*/DIG-AMPI-Konjugate wurden von den immobilisierten monoklonalen Digoxigenin-spezifischen Antikörpern gebunden (Abbildung 43). Bei geringen DIG-AMPI-Mengen und großen PBP 2x\*-Mengen wurden nur geringe  $\Delta$  Response-Werte (< 100 RU) beobachtet, da nur wenige PBP 2x\*/DIG-AMPI-Konjugate gebildet wurden. Große DIG-AMPI-Mengen und niedrige PBP 2x\*-Mengen lieferten ebenfalls nur niedrige  $\Delta$  Response-Werte, da ausschließlich nicht gebundenes DIG-AMPI von den immobilisierten Antikörpern gebunden wurde. Mittlere DIG-AMPI-Konzentrationen zeigten mit steigender PBP 2x\*-Konzentration auch steigende  $\Delta$  Response-Werte bis 330 RU.

Da die Größe des Messsignals bei SPR-Biosensoren vom Molekulargewicht des Analyten abhängig ist<sup>234</sup>, liegt die Vermutung nahe, dass die größten  $\Delta$  Response-Werte bei äquimolaren Mengen an PBP 2x\* und DIG-AMPI auftreten. Die maximalen  $\Delta$  Response-Werte wurden jedoch gemessen, wenn die Menge an PBP 2x\* um den Faktor 5 bis 10 größer war als die

Menge an DIG-AMPI. Ursache hierfür ist, dass es sich bei den DIG-AMPI-Mengen um relative Ampicillin-Mengen handelt.

Die Bestimmung der DIG-AMPI-Konzentration erfolgte mit PBP 2x\* und Bocillin FL, nachdem PBP 2x\* mit unterschiedlichen Mengen an Ampicillin oder DIG-AMPI inkubiert wurde (s. 9.3.2). Die Konzentration an DIG-AMPI wurde aus der Kalibrierreihe mit Ampicillin extrapoliert, wobei angenommen wurde, dass DIG-AMPI und Ampicillin dieselben Affinitäten gegenüber PBP 2x\* besitzen. Tatsächlich werden sich Ampicillin und sein Derivat in ihren Affinitäten, den  $k_2/K$ -Werten, unterscheiden. Unterschiede in den  $k_2/K$ -Werten haben zur Folge, dass  $\beta$ -Lactam-Antibiotika mit niedrigen  $k_2/K$ -Werten PBP erst bei hohen Konzentrationen inhibieren, während  $\beta$ -Lactam-Antibiotika mit hohen  $k_2/K$ -Werten PBP bereits bei niedrigen Konzentrationen inhibieren. Ampicillin und Fluorescein-markiertes Ampicillin unterscheiden sich beispielsweise in ihren  $k_2/K$ -Werten gegenüber PBP 2x\* etwa um den Faktor 10, wobei Ampicillin den größeren Wert besitzt<sup>263</sup>.

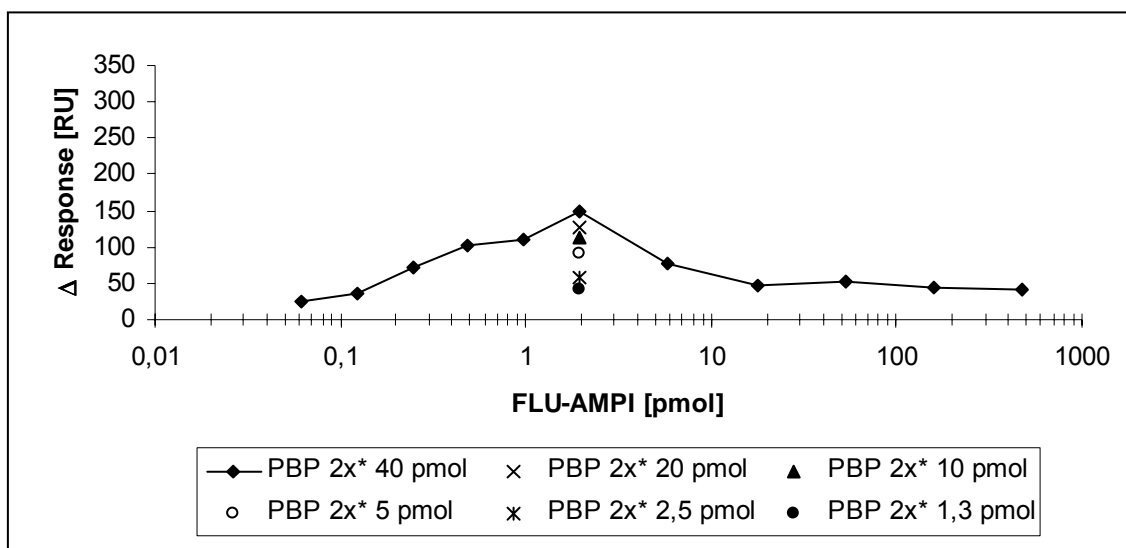
DIG-AMPI und Ampicillin zeigen wahrscheinlich einen ähnlichen Unterschied in ihren Affinitäten gegenüber PBP 2x\*, da Digoxigenin wie Fluorescein an die Aminogruppe von Ampicillin gebunden wurde. Zusätzlich besitzen beide Markermoleküle eine gewisse Größe, welche die Bindung durch das PBP 2x\* sterisch beeinflussen wird. Die Ergebnisse der Schachbrett-titration spiegeln den Unterschied in den Affinitäten wieder und bestärken die Annahme, dass DIG-AMPI gegenüber PBP 2x\* einen geringeren  $k_2/K$ -Wert als Ampicillin besitzt.



**Abbildung 43: Schachbrett-titration von DIG-AMPI und PBP 2x\*. Lösungen mit verschiedenen Mengen an PBP 2x\* und DIG-AMPI wurden gemischt und mittels SPR-Biosensor analysiert. Auf dem Sensor-Chip wurde vor der Analyse der monoklonale Digoxigenin-spezifische Antikörper immobilisiert.**

### FLU-AMPI/Fluorescein-spezifische Antikörper

Die PBP 2x\*/FLU-AMPI-Konjugate wurden lediglich von einem der drei Fluorescein-spezifischen Antikörper (Klon 2A3, Tabelle 6) erkannt. Die gemessenen  $\Delta$  Response-Werte waren des Weiteren im Vergleich mit den Werten der DIG-AMPI-Titration gering ( $< 160$  RU) (Abbildung 44). Dies deutet darauf hin, dass das Epitop (Fluorescein) in der Bindetasche des PBP 2x\* für die Paratope der Antikörper teilweise verborgen ist oder die Fluorescein-spezifischen Antikörper insgesamt eine geringe Affinität gegenüber FLU-AMPI besitzen. Die niedrigen  $\Delta$  Response-Werte können auch auf eine Konkurrenzreaktion zwischen den zwei FLU-AMPI-Isomeren zurückzuführen sein, da das PBP 2x\* eventuell ein Isomer bevorzugt bindet. Lakaye *et al.*<sup>263</sup> haben in ihren Studien mit 5'(6')-Carboxyfluorescein-markiertem Ampicillin festgestellt, dass PBP 2x\* gegenüber dem 5'-Isomer eine um den Faktor 2 bis 3 höhere Affinität besitzt. Das FLU-AMPI-Isomer, das nicht bzw. nur in einem geringeren Ausmaß vom PBP 2x\* gebunden wird, könnte mit den gebildeten PBP 2x\*/FLU-AMPI-Konjugaten um Bindestellen der immobilisierten Fluorescein-spezifischen konkurrieren, so dass der Response nur um einen geringen Wert ansteigt.



**Abbildung 44:** Schachbrettitration von FLU-AMPI und PBP 2x\* (andere Charge als in Abbildung 43). Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen an PBP 2x\* und FLU-AMPI wurden gemischt und mittels SPR-Biosensor analysiert. Der maximale  $\Delta$  Response-Wert wurde mit 40 pmol PBP 2x\* und 2 pmol FLU-AMPI beobachtet.

### DIG-AMPI oder FLU-AMPI?

Von den untersuchten markierten Ampicillin-Derivaten (M-Ampicillin) und Markermolekül-spezifischen Antikörpern lieferten DIG-AMPI und der monoklonale Digoxigenin-spezifische Antikörper die höchsten  $\Delta$  Response-Werte in der SPR-Biosensor-Analyse der PBP 2x\*/M-Ampicillin-Konjugate. FLU-AMPI und die Fluorescein-spezifischen Antikörper



konnten für einen Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika nicht verwendet werden, da für die PBP 2x\*/FLU-AMPI-Konjugate kein ausreichender Response erzielt werden konnte.

Für die weitere Entwicklung des indirekten  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-spezifischen SPR-Biosensor-Assays wurde daher DIG-AMPI in Kombination mit dem monoklonalen Digoxigenin-spezifischen Antikörper eingesetzt.

#### **6.4.4 Nachweis von $\beta$ -Lactam-Antibiotika mit PBP 2x\*, Digoxigenin-markiertem Ampicillin und monoklonalen Digoxigenin-spezifischen Antikörpern**

Die ersten Analysen für den Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika mit dem nicht-kompetitiven Inhibierungs-Assay wurden mit der geringsten Menge an PBP 2x\* (8,6 pmol) und der Menge an DIG-AMPI (1,1 pmol) durchgeführt, die in der Schachbrett titration einen  $\Delta$  Response-Wert von > 200 RU ergaben. PBP 2x\* wurde in einem ersten Reaktionsschritt nur mit HBSEP-Puffer (Blank) oder unterschiedlichen Mengen Benzylpenicillin, Ampicillin, Amoxicillin und Cloxacillin in HBSEP-Puffer für 15 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von DIG-AMPI und einem zweiten Inkubationsschritt von 15 Minuten wurden die Reaktionsansätze (15  $\mu$ l) mittels SPR-Biosensor (Fluss 5  $\mu$ l/min, Temperatur 25 °C) analysiert, wobei auf dem Sensor-Chip der monoklonale Digoxigenin-spezifische Antikörper immobilisiert war. Parallel wurden die Analysen mit einer Flusszelle durchgeführt, dessen Carboxymethyldextran-Schicht nicht modifiziert wurde.

Abbildung 45 veranschaulicht die in den Reaktionslösungen und mit den immobilisierten Antikörpern ablaufenden Reaktionen. In Proben ohne  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Blank) haben die PBP 2x\*-Moleküle ausschließlich DIG-AMPI gebunden, so dass überwiegend PBP 2x\*/DIG-AMPI-Konjugate gebildet wurden. In Gegenwart von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika wurden weniger PBP 2x\*/DIG-AMPI-Konjugate gebildet, da die PBP 2x\*-Moleküle im ersten Inkubationsschritt zunächst die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika gebunden haben.

Als Konsequenz haben die Digoxigenin-spezifischen Antikörper in Proben mit  $\beta$ -Lactam-Antibiotika mehr nicht-gebundenes DIG-AMPI (Molekulargewicht 892 g/mol) als PBP 2x\*/DIG-AMPI-Konjugate (Molekulargewicht ca. 78 kDa) gebunden und in Blank-Proben mehr PBP 2x\*/DIG-AMPI-Konjugate als nicht-gebundenes DIG-AMPI. Da die Signalhöhe während einer SPR-Biosensor-Analyse vom Molekulargewicht der Moleküle, die an den Sensor-Chip binden, abhängig ist<sup>217,220</sup>, lieferten die Blank-Proben größere  $\Delta$  Response-Werte als die Proben mit  $\beta$ -Lactam-Antibiotika.

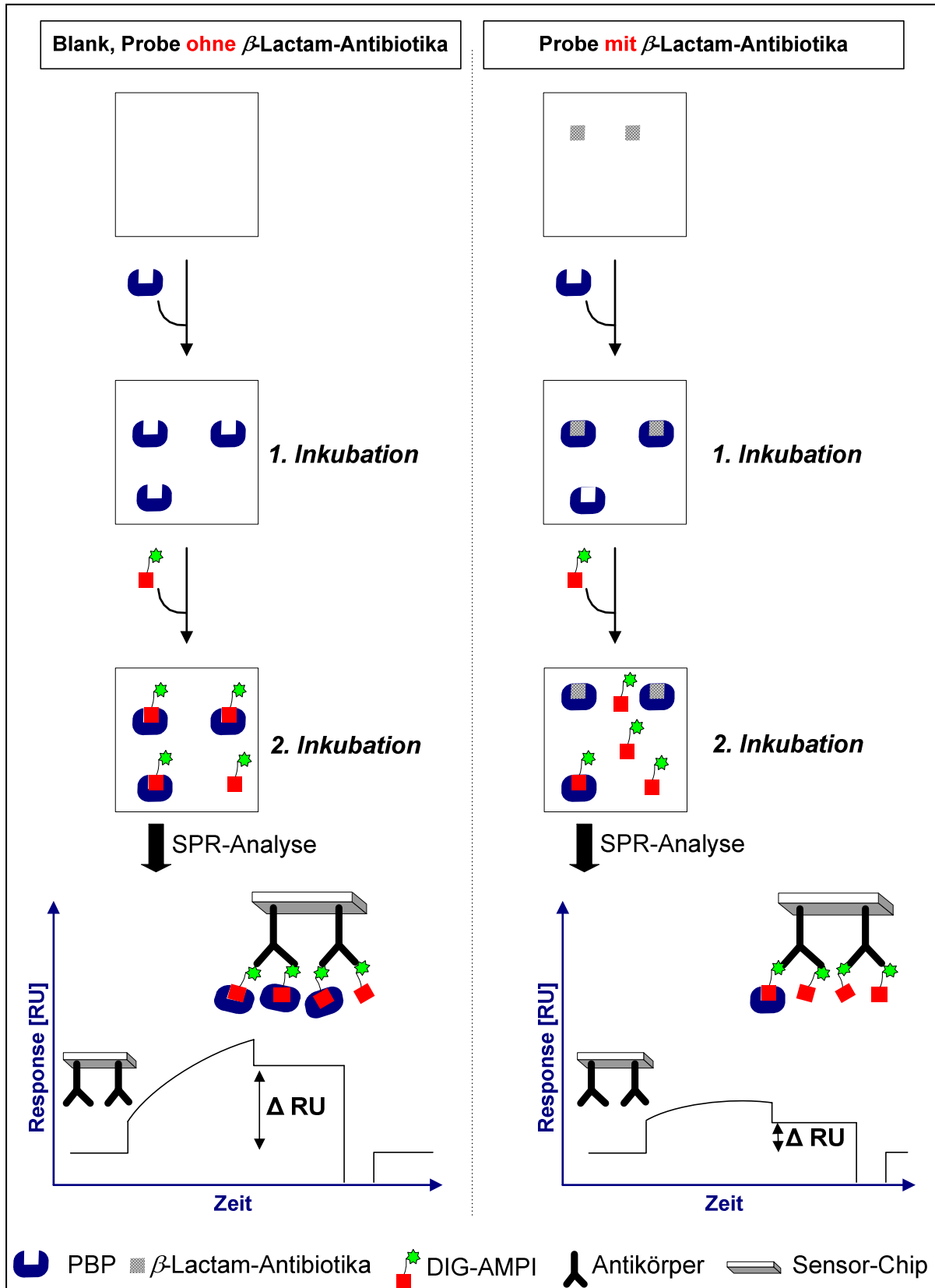
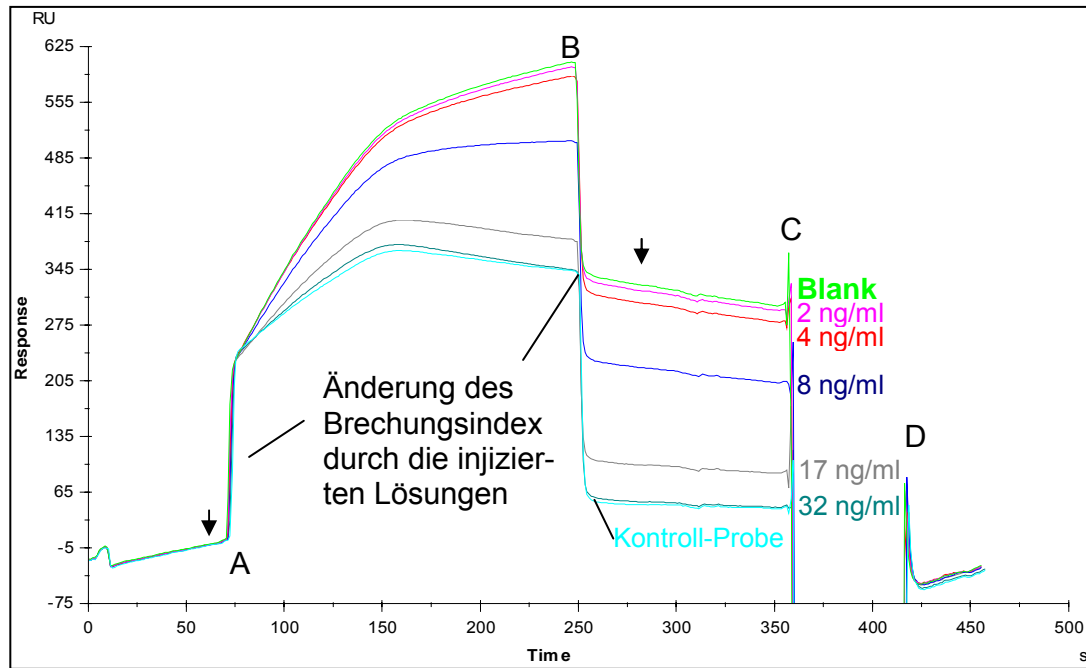


Abbildung 45: Indirekter nicht-kompetitiver SPR-Biosensor-Assay für den Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika mit PBP 2x\*, DIG-AMPI und immobilisierten Digoxigenin-spezifischen Antikörpern.



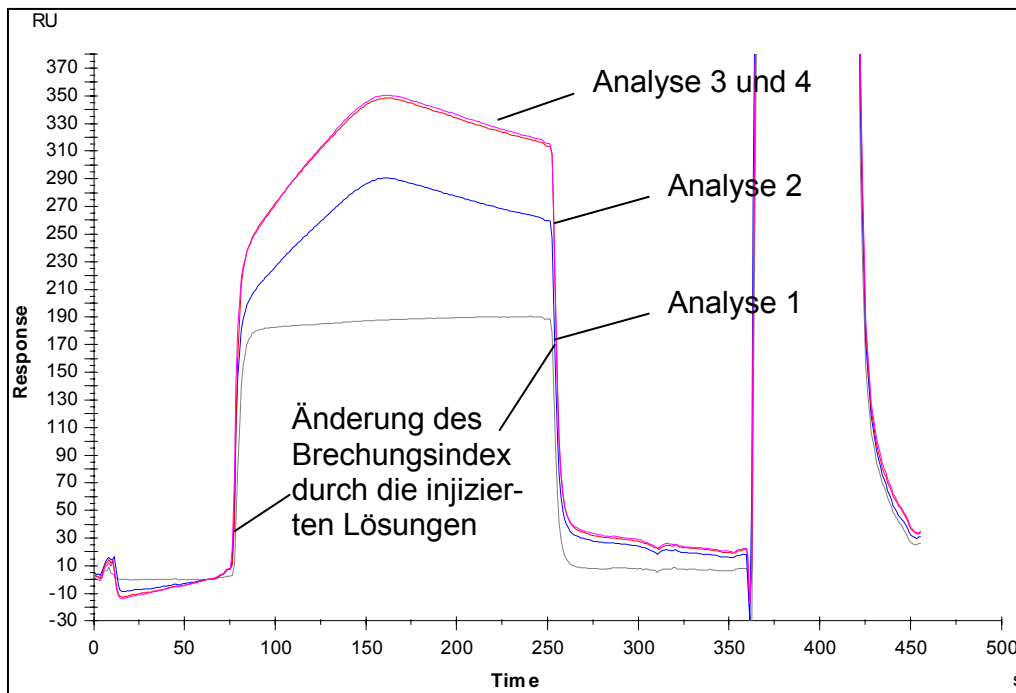
**Abbildung 46: SPR-Biosensor-Analyse von PBP 2x\* (8,6 pmol) nach Inkubation mit unterschiedlichen Ampicillin-Konzentrationen (siehe Sensorgramme) und DIG-AMPI (1,1 pmol). Eine Probe enthielt PBP 2x\* aber kein DIG-AMPI (Kontroll-Probe). A: Injektion PBP 2x\*-haltige Lösungen, B: PBP 2x\*-haltige Lösungen werden durch Lauf-Puffer ersetzt, C: Injektion Regenerierungslösung und D: Regenerierungslösung wird durch Lauf-Puffer ersetzt. Die Pfeile zeigen auf die Zeitpunkte (5 sec vor und 30 sec nach der Injektion der Probe), die für die Messung der  $\Delta$  Response-Werte herangezogen wurden (vgl. 4.1.6 und Abbildung 23).**

Die Sensorgramme in Abbildung 46 veranschaulichen am Beispiel von Ampicillin, dass der Response umgekehrt proportional zu der Penicillin-Konzentration war, d.h. Proben mit Rückständen an  $\beta$ -Lactam-Antibiotika lieferten kleinere  $\Delta$  Response-Werte als Blank-Proben. Die Änderung des Brechungsindex zu den Zeitpunkten, ab welchen die Probenlösungen mit PBP 2x\* am Sensor-Chip vorbeiströmten und ab wann sie durch den Lauf-Puffer wieder ersetzt wurden, konnte als steiler Abfall und Anstieg im Response beobachtet werden. Die Injektion von Blank-Proben ohne DIG-AMPI aber mit PBP 2x\* (Kontroll-Proben) zeigte, dass PBP 2x\*-Moleküle auch unspezifisch an die Sensor-Chip-Oberfläche gebunden haben. Der  $\Delta$  Response-Wert dieser unspezifischen Bindung lag bei etwa 50 RU. Dies kann zum einen auf elektrostatische Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Carboxymethyl-dextran-Oberfläche zurückzuführen sein oder auf Protein/Protein-Wechselwirkungen mit den immobilisierten Antikörpern. Die Injektion von Blank-Proben ohne PBP 2x\* aber mit DIG-AMPI führte zu keiner Signalerhöhung. Dies deutet darauf hin, dass die DIG-AMPI-Konzentration in den Proben zu niedrig war, um einen Response-Anstieg zu bewirken. Der Verlauf der Sensorgramme dieser Analysenreihe war jedoch ungewöhnlich, s. Abbildung 46 für Ampicillin, da während der Injektion der Probenlösungen ab ca. 150 sec ein Abflachen der Kurven zu beobachten war.

Dieser Kurvenverlauf könnte auf folgende Reaktionen zurückzuführen sein:

- a) Mit steigender Rückstandskonzentration nahm die Menge an nicht-gebundenem DIG-AMPI zu und die Konkurrenz zwischen freiem und PBP 2x\*-gebundenem DIG-AMPI um die Paratope der immobilisierten Digoxigenin-spezifischen Antikörper konnte in Echtzeit verfolgt werden.
- b) Die Dissoziation der unspezifisch gebundenen PBP 2x\*-Moleküle und/oder der Komplexe aus PBP 2x\*/DIG-AMPI-Konjugat und Digoxigenin-spezifischen Antikörpern konnte bereits während der Injektion beobachtet werden.
- c) Der Hydratationsgrad der Carboxymethyldextran-Schicht auf der Sensor-Chip-Oberfläche wurde durch die Regenerierung mit der Acetonitril-haltigen Lösung verringert, was eine Kontraktion der Carboxymethyldextran-Schicht auf der Sensor-Chip-Oberfläche bewirkte<sup>265</sup>. Nachdem die Regenerierungslösung am Sensor-Chip vorbeigeströmt ist (Abbildung 46, Zeitpunkt D), wurde die Hydrathülle durch den kontinuierlich nachfließenden Lauf-Puffer wieder aufgebaut und die Carboxymethyldextran-Schicht dehnte sich auf ihr ursprüngliches Volumen aus. Sowohl die Kontraktion als auch die Volumenvergrößerung der Carboxymethyldextran-Schicht haben einen Einfluss auf den lokalen Brechungsindex an der Sensor-Chip-Oberfläche und somit auch auf das beobachtete Detektorsignal<sup>265,228</sup>. Die Volumenzunahme des Carboxymethyldextrans äußerte sich in Form eines ansteigenden Response nach Injektion der Regenerierungslösung (Abbildung 46, Zeitpunkt D bis zum Ende der Analyse). Ein Ansteigen der Basislinie konnte auch in der Anfangsphase der nachfolgenden Biosensor-Analyse beobachtet werden, obwohl während dieser gesamten Zeitspanne (Abbildung 46, 0 sec bis Zeitpunkt A) ebenfalls ausschließlich Lauf-Puffer am Sensor-Chip vorbeiströmte. Ein derartiger Effekt („artificial detector response“) wurde auch von Andersson *et al.*<sup>265</sup> und Daly *et al.*<sup>228</sup> beschrieben. Das Ansteigen der Basislinie zu Beginn der biomolekularen Interaktionsanalyse deutet darauf hin, dass die Sensor-Chip-Oberfläche zum Zeitpunkt der biomolekularen Interaktionsanalyse noch nicht vollständig „äquilibriert“ war. Das Abflachen der Sensorgramme während der Injektion der Probenlösungen spiegelt sowohl die Volumenzunahme des Carboxymethyldextrans als auch die Wechselwirkungen zwischen den PBP 2x\*-Molekülen und PBP 2x\*/DIG-AMPI-Konjugaten mit den immobilisierten Antikörpern und dem Carboxymethyldextran wieder.

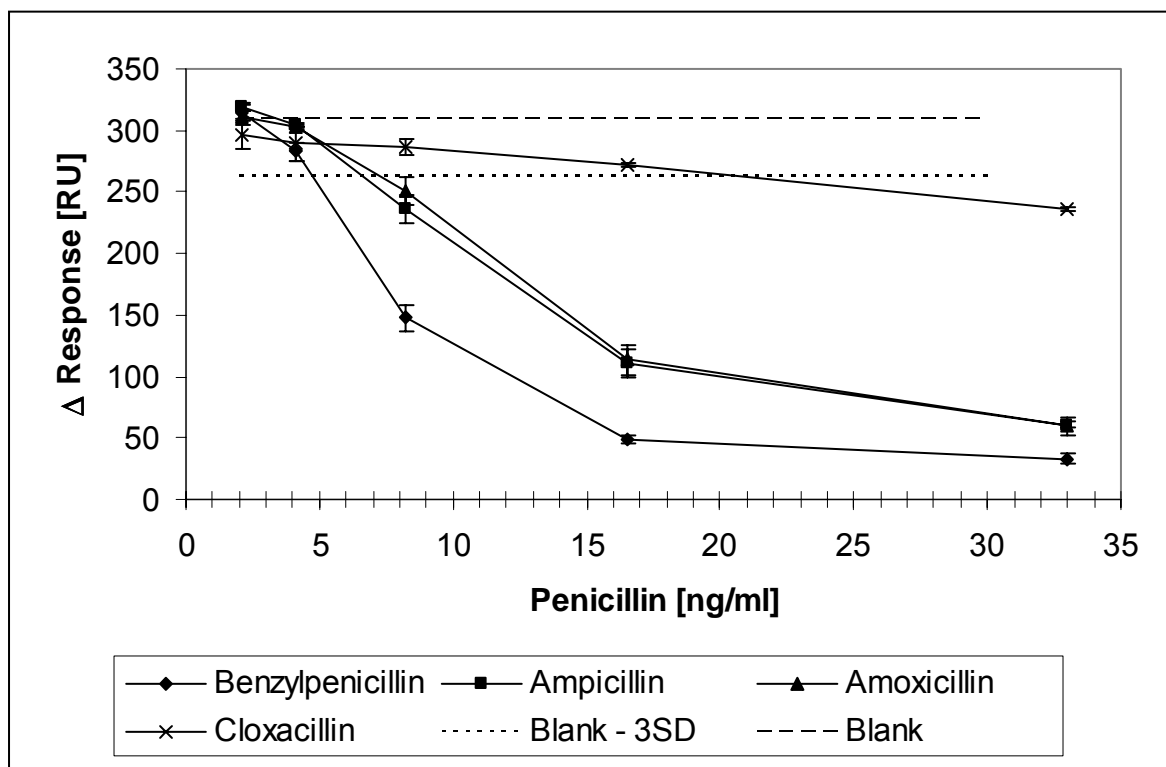
Einen Hinweis, welche dieser Hypothesen das Abflachen der SPR-Kurve erklären kann, lieferten die Ergebnisse der SPR-Biosensor-Analysen mit dem unmodifizierten Carboxymethyldextran.



**Abbildung 47: Sensorgramme der ersten vier Injektionen der in diesem Abschnitt beschriebenen Analysenreihe mit dem nicht-modifizierten Carboxymethyldextran. Analyse 1: Blank, Analyse 2: Blank, Analyse 3: Benzylpenicillin 33 ng/ml und Analyse 4: 17 ng/ml. Erläuterungen siehe Text.**

Abbildung 47 zeigt die Sensorgramme der ersten vier Analysen dieser Analysenreihe. Das Sensorgramm der ersten Analyse zeigte einen unauffälligen Verlauf. Es wurde eine gerade Basislinie zu Beginn der Analyse beobachtet und die Änderung des Brechungsindex durch die Injektion der Probenlösung, ein leichter Anstieg im Response aufgrund der Bindung der PBP 2x\*-Moleküle an das Carboxymethyldextran (Assoziation), die Änderung des Brechungsindex durch den nach der Probenlösung am Sensor-Chip vorbeiströmenden Lauf-Puffer sowie die Dissoziation der an das Carboxymethyldextran gebundenen PBP 2x\*-Moleküle. Die Änderung des Brechungsindex zu den Zeitpunkten, ab welchen die Regenerierungslösung am Sensor-Chip vorbeiströmte und ab wann sie durch den Lauf-Puffer wieder ersetzt wurde, lieferte einen steilen Anstieg und Abfall im Response. Die Analysen mit den immobilisierten Digoxigenin-spezifischen Antikörper zeigten hingegen zunächst ein abfallendes und anschließend ein steigendes Signal. Dies belegt, dass auch die chemische Modifizierung der Carboxylgruppen auf der Sensor-Chip-Oberfläche einen Einfluss auf den lokalen Brechungsindex und somit auf den Response hat. Die Sensorgramme der nachfolgenden Analysen wiesen das in den Analysen mit den immobilisierten Antikörpern beobachtete Ansteigen der Basislinie zu Beginn der Analyse auf und das Abflachen der Sensorgramm-Kurve während der Injektion der Probenlösung. Dieses Bild erstreckte sich ab der dritten Injektion reproduzierbar auf die nachfolgenden Analysen.

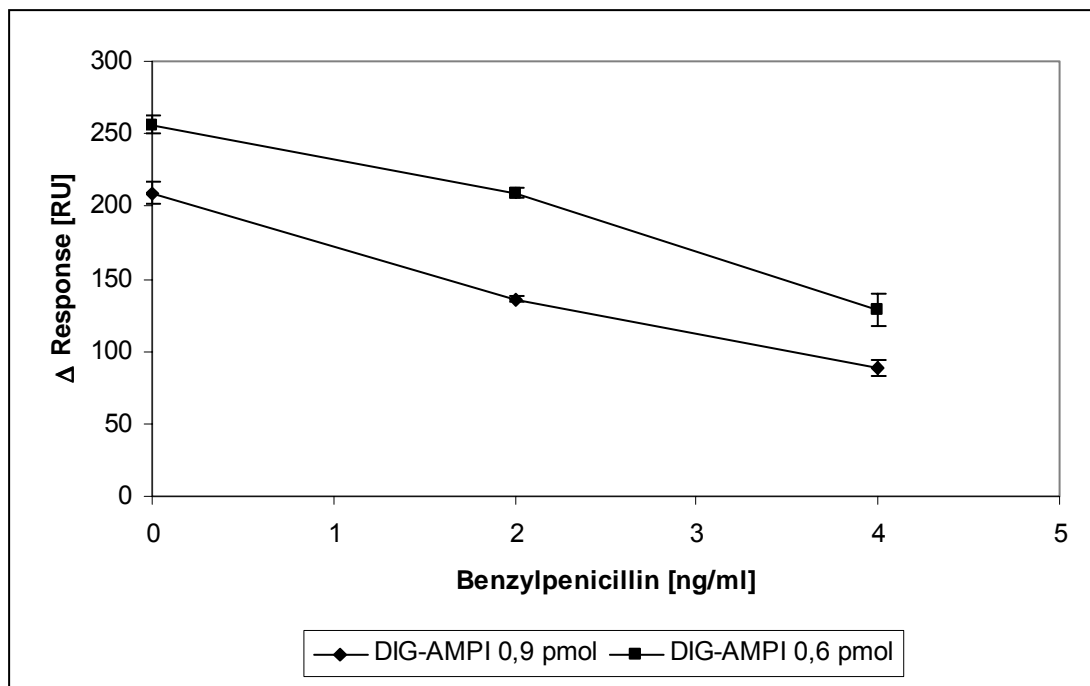
Die Resultate der SPR-Biosensor-Analyse mit dem unmodifizierten Carboxymethyldextran (Abbildung 47) sprechen für den auf Seite 76 beschriebenen „artificial detector response“ als Ursache für die mit den immobilisierten Antikörpern beobachteten Kurvenverläufe. Dabei lieferten 73 Probenlösungen von insgesamt 74 Probenlösungen dieser Analysenreihe ähnliche  $\Delta$ -Response-Werte mit einem Mittelwert ( $n = 72$ ) von  $34 \text{ RU} \pm 1,1 \%$  (Variationskoeffizient). Für die Berechnung des Mittelwertes wurde der  $\Delta$ -Response-Wert der ersten Probenlösung (Abbildung 47, Analyse 1) nicht berücksichtigt, weil dieser nach dem Grubbs-Test als Ausreißer identifiziert wurden. Der niedrige Variationskoeffizient deutet darauf hin, dass die  $\Delta$ -Response-Werte bei den Analysen mit dem unmodifizierten Carboxymethyldextran überwiegend auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den PBP 2x\*-Molekülen und der negativ geladenen Sensor-Chip-Oberfläche zurückzuführen sind und dass die anderen Probenbestandteile (DIG-AMPI und Penicilline) nur einen geringen Einfluss auf den Response hatten.



**Abbildung 48:** Standardkurven von Benzylpenicillin, Ampicillin, Amoxicillin und Cloxacillin in HBSEP-Puffer. Die SPR-Biosensor-Analysen der Penicillin-haltigen Lösungen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt und die der Blank-Lösungen als Elffachbestimmungen. Für die Analyse wurden  $8,6 \text{ pmol PBP 2x}^*$  und  $1,1 \text{ pmol DIG-AMPI}$  eingesetzt und es wurde die Flusszelle mit den immobilisierten Digoxigenin-spezifischen Antikörpern verwendet. Die gestrichelte Linie entspricht dem Mittelwert der  $\Delta$  Response-Werte der Blank-Lösungen. Die gepunktete Linie entspricht dem Mittelwert der  $\Delta$  Response-Werte der Blank-Lösungen abzüglich der dreifachen Standardabweichung des Mittelwertes. SD: Standardabweichung.

Mit den aus der Schachbrett titration ermittelten Mengen an PBP 2x\* (8,6 pmol), DIG-AMPI (1,1 pmol) und den immobilisierten Digoxigenin-spezifischen Antikörpern konnten Benzylpenicillin, Ampicillin, Amoxicillin und Cloxacillin in HBSEP-Puffer ab einer Konzentration von 5 ng/ml, 7 ng/ml, 8 ng/ml und 20 ng/ml nachgewiesen werden (Abbildung 48). Die in Hypothese c) beschriebenen Reaktionen hatten keinen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit des Verfahrens. Die Nachweisgrenzen wurden durch Interpolation aus der jeweiligen Standard-Kurve anhand des Mittelwertes der  $\Delta$  Response-Werte der Blank-Lösungen abzüglich der dreifachen Standardabweichung (Blank – 3SD) ermittelt<sup>267</sup>. Für die Berechnung der Nachweisgrenzen wurden elf Antibiotika-freie Lösungen (Blank) analysiert.

Die MRL-Werte für Benzylpenicillin, Ampicillin und Amoxicillin in Milch betragen 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $\approx$  4 ng/ml) und für Cloxacillin 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $\approx$  30 ng/ml), so dass der Assay für den Nachweis dieser  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Milch weiter optimiert werden musste. Ausgehend von den vorliegenden Daten wurden dazu weitere Schachbrett titrationen mit 4,3 pmol PBP 2x\* und 0,9 oder 0,6 pmol DIG-AMPI durchgeführt, wobei PBP 2x\* vor der Inkubation mit DIG-AMPI nur mit HBSEP-Puffer (Blank) oder unterschiedlichen Konzentrationen an Benzylpenicillin (4 ng/ml oder 2 ng/ml) inkubiert wurde. Indem die Mengen an zugesetztem PBP 2x\* und DIG-AMPI verringert wurden, konnte eine höhere Empfindlichkeit für den Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika erzielt werden. Weitere Schachbrett titrationen, die sich über einen größeren Konzentrationsbereich erstreckten, waren daher nicht notwendig.



**Abbildung 49:** Einfluss unterschiedlicher DIG-AMPI-Mengen auf die  $\Delta$  Response-Werte in Gegenwart von 4,3 pmol PBP 2x\* und unterschiedlichen Benzylpenicillin-Konzentrationen. Die SPR-Biosensor-Analysen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die geringeren Mengen an PBP 2x\* und DIG-AMPI hatten jedoch zur Folge, dass weniger PBP 2x\*/DIG-AMPI-Konjugate gebildet und geringere  $\Delta$  Response-Werte gemessen wurden. Um weiterhin einen  $\Delta$  Response-Wert von ca. 200 RU zu erzielen, wurde das injizierte Volumen der Standard- und Probe-Lösungen von 15  $\mu$ l auf 25  $\mu$ l erhöht.

Abbildung 49 zeigt den Einfluss der unterschiedlichen DIG-AMPI-Mengen (0,9 und 0,6 pmol) auf die  $\Delta$  Response-Werte (Injektionsvolumen 25  $\mu$ l). Mit 0,6 pmol DIG-AMPI wurden höhere  $\Delta$  Response-Werte ermittelt als mit 0,9 pmol. Ursache hierfür ist, dass bei der größeren DIG-AMPI-Menge mehr nicht-gebundene DIG-AMPI-Moleküle vorlagen als bei der geringeren DIG-AMPI-Menge. Diese nicht-gebundenen DIG-AMPI-Moleküle konkurrierten mit den PBP 2x\*/DIG-AMPI-Konjugaten um die Paratope der immobilisierten Digoxigenin-spezifischen Antikörper. Ein deutlicherer Unterschied zwischen Lösungen ohne Benzylpenicillin (Blank) und mit Benzylpenicillin wurde mit 0,9 pmol DIG-AMPI beobachtet, wie die normierten  $\Delta$  Response-Werte in Abbildung 50 zeigen, bei denen die Werte der Blank-Proben gleich 100 % gesetzt wurden. Der normierte  $\Delta$  Response-Wert für Benzylpenicillin mit einer Konzentration von 2 ng/ml betrug 68 % mit 0,9 pmol DIG-AMPI und 87 % mit 0,6 pmol DIG-AMPI. Mit 4,3 pmol PBP 2x\*, 0,9 pmol DIG-AMPI und 25  $\mu$ l injizierter Probenlösung wurden für die Blank-Proben ein  $\Delta$  Response-Wert im Bereich von 180 bis 220 RU erzielt. Der  $\Delta$  Response-Wert der unspezifischen Bindung des PBP 2x\* an die Sensor-Chip-Oberfläche lag bei etwa 30 - 40 RU. Die Injektion von Blank-Proben ohne PBP 2x\* aber mit DIG-AMPI führte zu keiner Erhöhung des Response. Durch diese Modifikationen konnte die Nachweisgrenze für Benzylpenicillin in HBSEP-Puffer auf < 1 ng/ml (Abbildung 51) und für Cloxacillin auf 5 ng/ml (Abbildung 52) verringert werden. Die Dauer einer SPR-Biosensor-Analyse betrug 10 min.

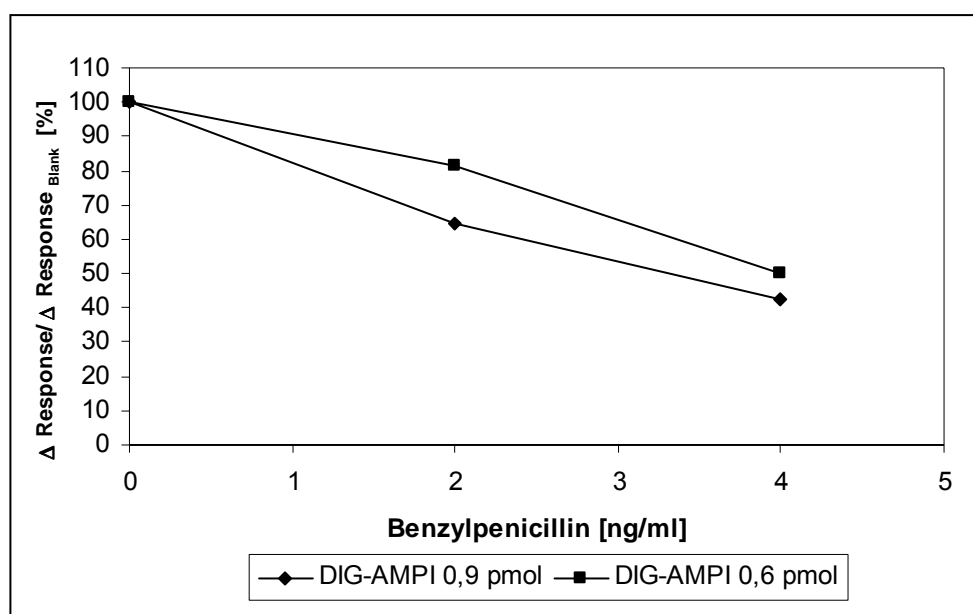


Abbildung 50:  $\Delta$  Response-Werte aus Abbildung 49 nach Normierung. Die  $\Delta$  Response-Werte der Blank-Proben wurden gleich 100 % gesetzt.



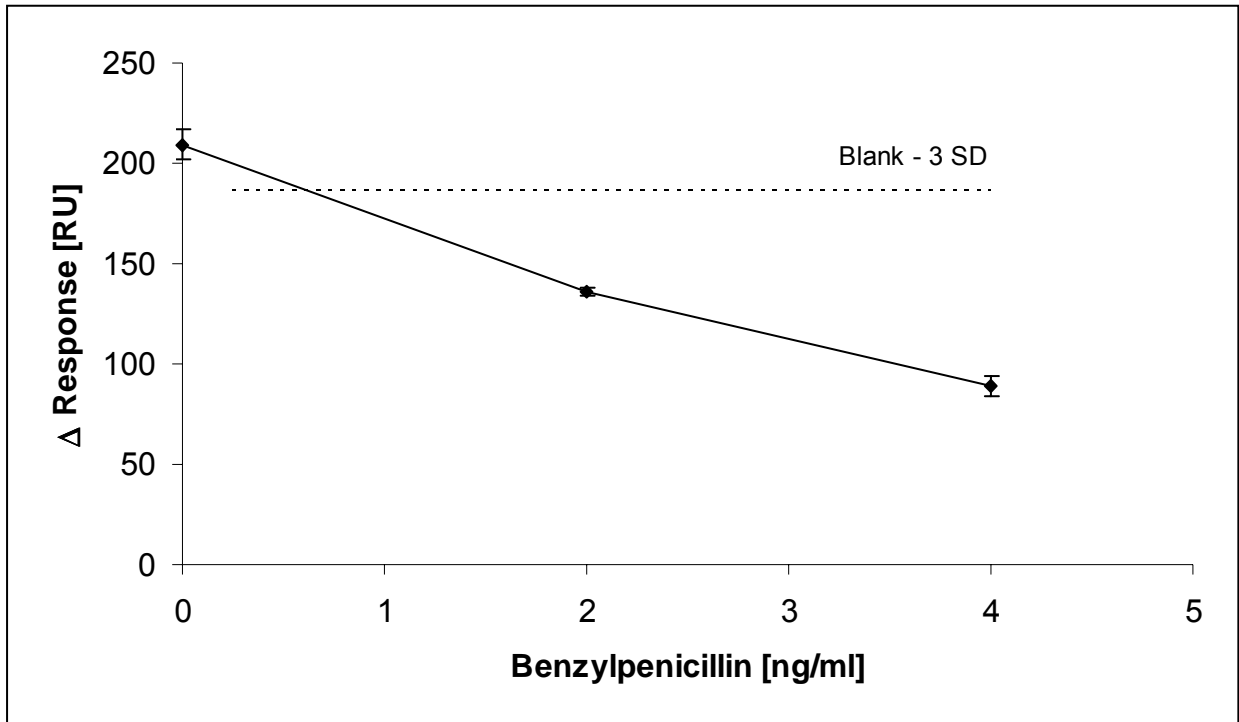


Abbildung 51: Nachweis von Benzylpenicillin (n = 3) in HBSEP-Puffer mit PBP 2x\* (4,3 pmol) und DIG-AMPI (0,9 pmol).  $\Delta$  Response-Wert Blank (n = 3)  $209 \pm 8$  RU. SD: Standardabweichung.

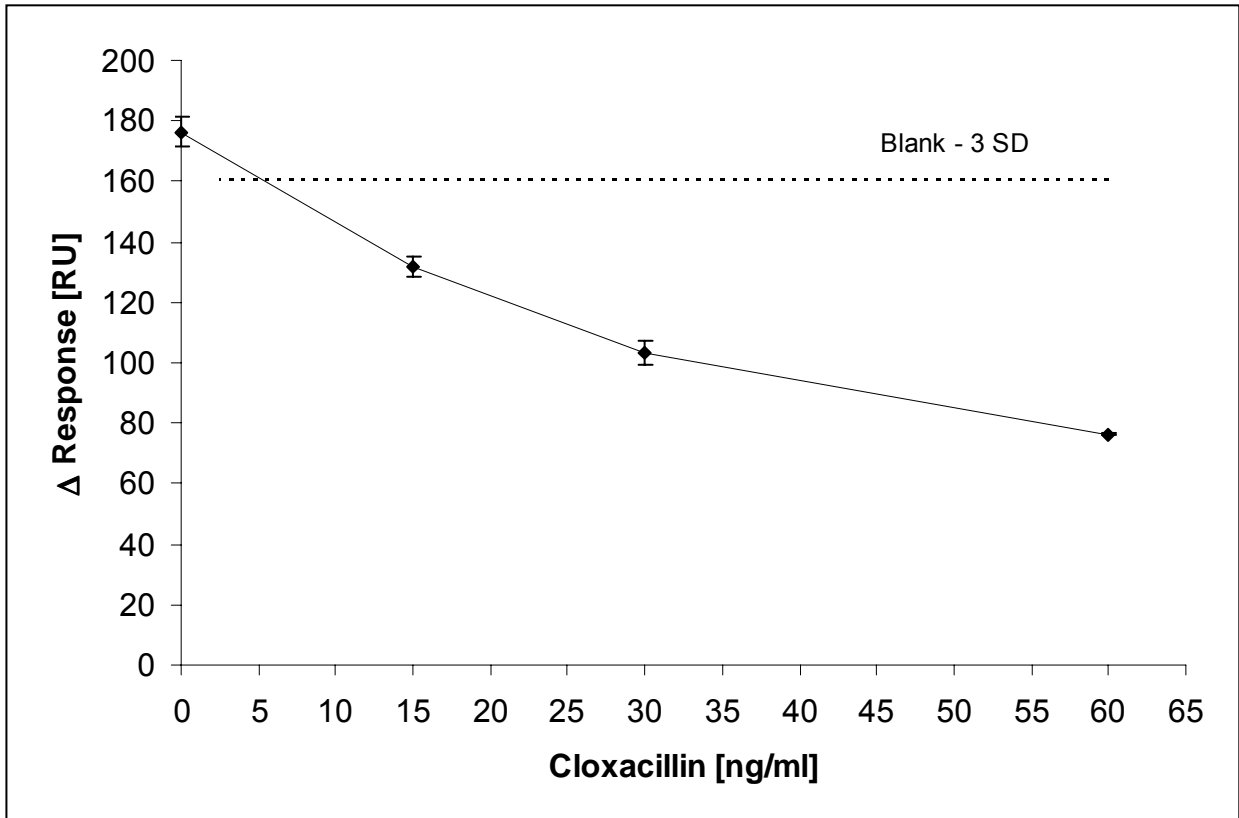
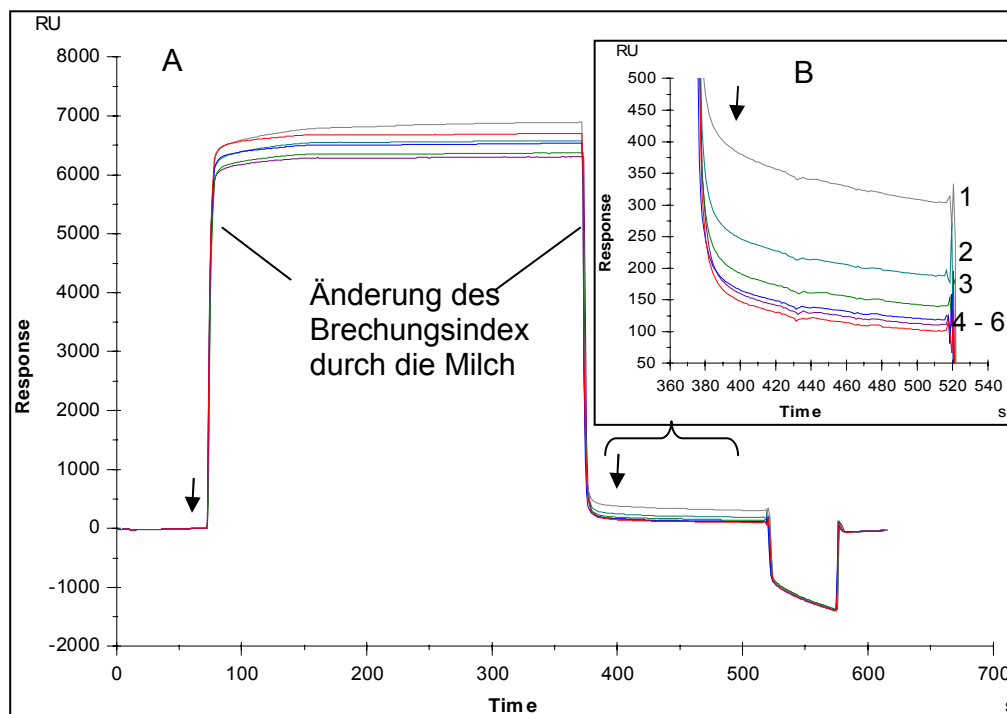


Abbildung 52: Nachweis von Cloxacillin (n = 3) in HBSEP-Puffer mit PBP 2x\* (4,3 pmol) und DIG-AMPI (0,9 pmol).  $\Delta$  Response-Wert Blank (n = 3)  $176 \pm 5$  RU. SD: Standardabweichung.

### 6.4.5 Nachweis von $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Vollmilch und Rohmilch

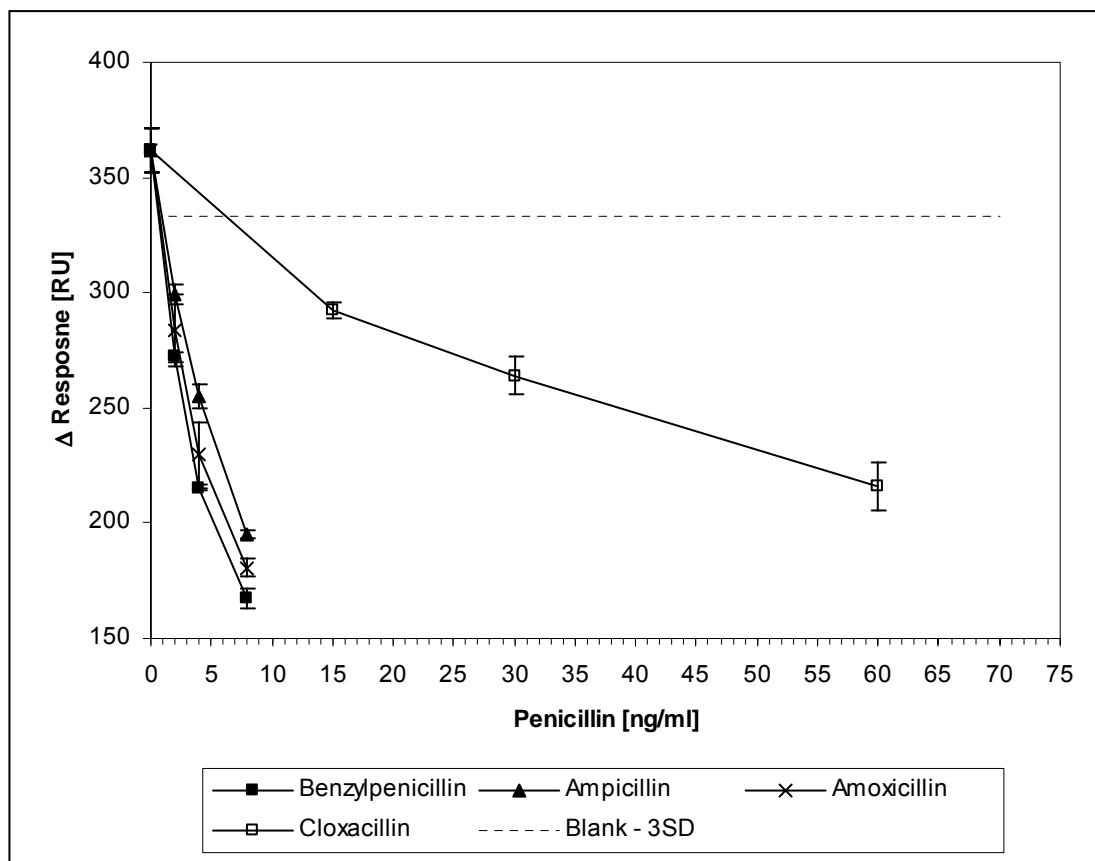
#### Vollmilch

Der SPR-Biosensor-Assay konnte ohne weitere Modifikationen auf die Matrix Milch übertragen werden. Handelsübliche Vollmilch-Proben (pasteurisiert, homogenisiert, 3,5 % Fett) wurden als Blank-Proben, d.h. ohne  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, und als dotierte Proben untersucht. Die dotierten Proben und die Blank-Proben wurden vor der Zugabe von PBP 2x\* und DIG-AMPI durch Zentrifugation entfettet, um bei der anschließenden SPR-Biosensor-Analyse Matrixinterferenzen vorzubeugen. Die Vollmilch-Proben zeigten dennoch Matrixinterferenzen von etwa 150 RU (Abbildung 53). Für den Nachweis dieser unspezifischen Bindungen an den Sensor-Chip wurden Blank-Proben ohne DIG-AMPI und PBP 2x\* analysiert. Blank-Proben ohne PBP 2x\* aber mit DIG-AMPI lieferten ebenfalls  $\Delta$  Response-Werte von etwa 150 RU. Dies zeigt, dass es nicht zu einer nennenswerten Bindung von DIG-AMPI an Milchproteine, z.B. als Penicilloyl-Derivat (vgl. Abbildung 5), gekommen ist. Derartige proteingebundene DIG-AMPI-Derivate hätten sonst wie die PBP 2x\*-Konjugate oder das Digoxigenin-markierte Rinderserumalbumin zu einem Response-Anstieg geführt. Im weiteren Verlauf werden Proben, die für den Nachweis der Bindung von Matrix-Komponenten an den Sensor-Chip analysiert wurden, als Matrix-Kontroll-Proben bezeichnet.



**Abbildung 53: Sensorgramme Vollmilch.** A: Die Vollmilch-Probe wurde als Blank, nach Dotierung mit Benzylpenicillin (Pen G 8, 4 und 2 ng/ml) und ohne DIG-AMPI und PBP 2x\* analysiert. B: Ausschnitt Sensorgramm zwischen 360 und 540 sec. 1: Blank, 2: Pen G 2 ng/ml, 3: Pen G 4 ng/ml, 4: Matrix-Kontrolle ohne DIG-AMPI, 5: Pen G 8 ng/ml und 6: Matrix-Kontrolle ohne PBP 2x\*. Die Pfeile zeigen auf die Zeitpunkte (5 sec vor und 30 sec nach der Injektion der Probe), die für die Berechnung der  $\Delta$  Response-Werte herangezogen wurden.

Die Sensorgramme der Vollmilch-Proben (Abbildung 53) zeigten ein für die Analyse biologischer Proben mit großen Konzentrationen an Matrix-Komponenten typisches Bild. Die Änderung des Brechungsindex zu den Zeitpunkten, ab welchen die Milch am Sensor-Chip vorbeiströmte und ab wann sie durch den Lauf-Puffer wieder ersetzt wurde, konnte als steiler Anstieg und Abfall im Response beobachtet werden. Der Ausschnitt des Sensorgramms zwischen 360 und 540 sec (Abbildung 53) zeigt, dass die Blank-Proben von den dotierten Proben unterschieden werden konnten, obwohl Matrixkomponenten an den Sensor-Chip gebunden haben. Das Messsignal setzt sich aus zwei Komponenten zusammen, a) dem spezifischen Response aufgrund der Bindung der PBP 2x\*/DIG-AMPI-Konjugate an die immobilisierten Digoxigenin-spezifischen Antikörper und b) dem unspezifischen Response durch Bindung der Matrixkomponenten an den Sensor-Chip. Der spezifische Response sank mit steigender Penicillin-Konzentration und war dem unspezifischen aufgelagert. Benzylpenicillin, Ampicillin und Amoxicillin konnten auch in Vollmilch unterhalb einer Konzentration von 2 ng/ml nachgewiesen werden und Cloxacillin unterhalb von 15 ng/ml, d.h. Konzentrationen die dem halben MRL-Wert entsprechen (Abbildung 54). Für die Ermittlung der Nachweisgrenzen wurden zwölf Blank-Proben untersucht. Die Berechnung der Nachweisgrenze in Milch erfolgte wie unter 6.4.4 für HBSEP-Puffer beschrieben.



**Abbildung 54: Standardkurven von Benzylpenicillin, Ampicillin, Amoxicillin und Cloxacillin in Vollmilch. Die Analysen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt. SD: Standardabweichung.**

Tabelle 8 zeigt die  $\Delta$  Response-Werte von drei verschiedenen Vollmilch-Proben, die am jeweiligen Tag gekauft, dotiert und anschließend analysiert wurden. Da die Aktivität der immobilisierten Antikörper sich mit jeder Analyse bzw. Regenerierung änderte, konnten die Testbedingungen nie völlig identisch eingehalten werden. Letzteres bedingte, dass die absoluten  $\Delta$  Response-Werte von Test zu Test schwankten (Tabelle 8). Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den Tagen wurden die am jeweiligen Tag gemessenen  $\Delta$  Response-Werte normiert, wobei die  $\Delta$  Response-Werte der Blank-Lösungen gleich 100 % gesetzt wurden ( $\Delta \text{ Response}_{\text{Probe}}/\Delta \text{ Response}_{\text{Blank}}$  [%]). Die normierten Werte wurden von den sich ändernden Bedingungen weniger beeinflusst und schwankten zwischen den Tagen um einen geringeren Faktor als die absoluten  $\Delta$  Response-Werte (Tabelle 8). Die Variationskoeffizienten, die auf der Basis der Mittelwerte der normierten Werte berechnet wurden, waren sowohl innerhalb eines Tages als auch zwischen den Tagen kleiner 5 % (Tabelle 8). Das Verfahren besaß somit eine ausreichende Präzision, auch für quantitative Analysen.

**Tabelle 8: SPR-Biosensor-Analyse von Vollmilch an drei Tagen. Die Proben wurden an Tag 1 und 3 als Dreifachbestimmung analysiert und an Tag 2 als Vierfachbestimmung. Die  $\Delta$  Response-Werte wurden in % ausgedrückt, wobei die Werte der Blank-Proben gleich 100 % gesetzt wurden.**

Pen G <sup>a</sup> (ng/ml)	Tag 1 (n=3)	Tag 2 (n=4)	Tag 3 (n=3)	CV <sup>b</sup>
Blank	100 % (362 RU $\pm$ 2,7 %)	100 % (361 RU $\pm$ 4,4 %)	100 % (329 RU $\pm$ 1,5 %)	-
8	46 % (168 RU $\pm$ 2,7 %) <sup>c</sup>	44 % (158 RU $\pm$ 2,5 %)	40 % (130 RU $\pm$ 1,6 %)	3.5 %
4	59 % (215 RU $\pm$ 0,2 %)	55 % (197 RU $\pm$ 1,4 %)	53 % (175 RU $\pm$ 0,7 %)	3.2 %
2	75 % (272 RU $\pm$ 0,7 %)	70 % (253 RU $\pm$ 2,4 %)	70 % (231 RU $\pm$ 1,7 %)	2.9 %

<sup>a</sup> Pen G: Benzylpenicillin

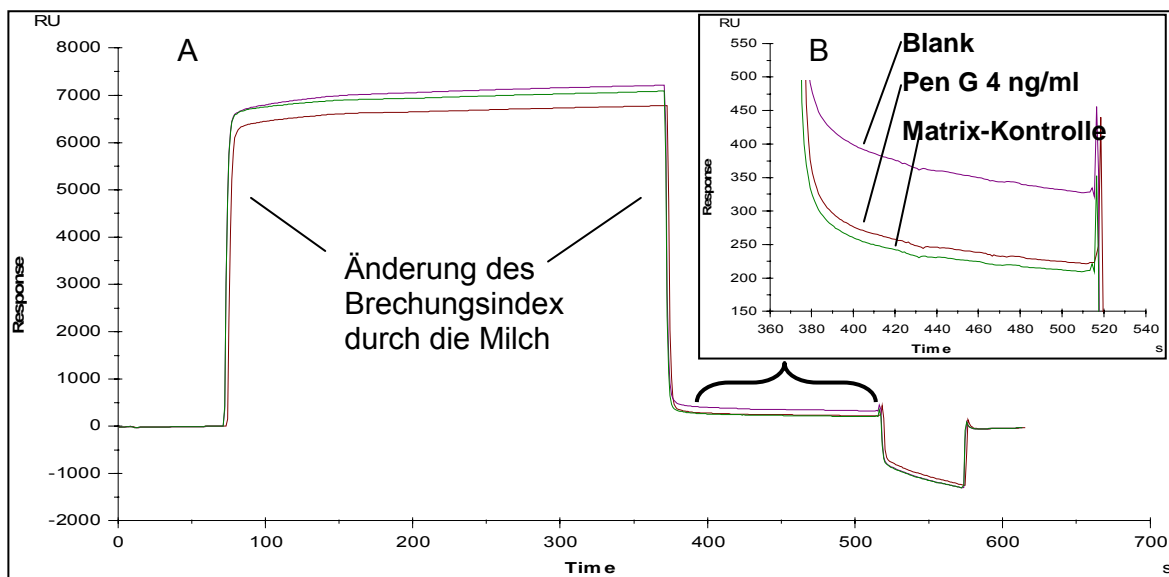
<sup>b</sup> CV: Variationskoeffizient. Die Variationskoeffizienten wurden auf der Basis der Mittelwerte der normierten Werte für Tag 1, Tag 2 und Tag 3 berechnet.

<sup>c</sup>  $\Delta$  Response-Wert  $\pm$  CV

## Rohmilch

Rohmilch wurde von der Forschungs-Farm der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Utrecht (Niederlande) zur Verfügung gestellt. Die SPR-Biosensor-Analysen wurden sowohl mit der Rohmilch des gesamten Bestandes (gepoolte Rohmilch von 24 Kühen) als auch mit dem Gemelk einzelner Kühe, Rasse Holstein-Friesian, durchgeführt. Die gepoolte Rohmilch wurde wie die Vollmilch analysiert (s. o.).

Die Sensorgramme (Abbildung 55) der gepoolten Rohmilch-Proben zeigten ein ähnliches Bild wie die Vollmilch-Proben. Die gepoolte Rohmilch zeigte jedoch ein höheres Maß an Matrixinterferenzen von etwa 270 RU. Um diese Bindung von Matrix-Komponenten an den Sensor-Chip zu untersuchen, wurden die Rohmilch-Proben ohne Zusatz von PBP 2x\* und DIG-AMPI (Matrix-Kontroll-Proben) analysiert. Der Ausschnitt des Sensorgramms zwischen 360 und 540 sec (Abbildung 55) zeigt, dass die Blank-Proben von den dotierten Proben unterschieden werden konnten, obwohl Matrixkomponenten an den Sensor-Chip gebunden haben.



**Abbildung 55: Sensorgramme Rohmilch. A:** Die Rohmilch-Probe wurde als Blank, nach Dotierung mit Benzylpenicilin (Pen G 4 ng/ml) und ohne PBP 2x\* und DIG-AMPI (Matrix-Kontrolle) analysiert. **B:** Ausschnitt Sensorgramm zwischen 360 und 540 sec.

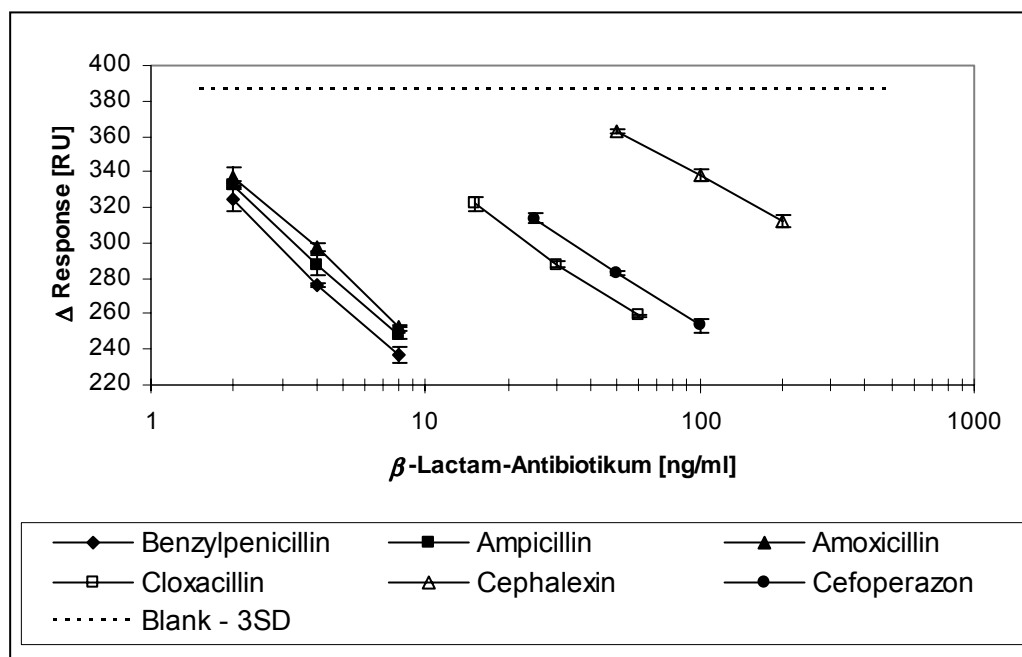
Tabelle 9 zeigt die Daten von zwei gepoolten Rohmilch-Proben, die an zwei verschiedenen Tagen gemolken und am jeweiligen Tag mit Benzylpenicillin, Ampicillin, Amoxicillin, Cloxacillin, Cephalexin oder Cefoperazon im Konzentrationsbereich des MRL-Wertes dotiert und analysiert worden sind. Die Variationskoeffizienten der normierten  $\Delta$  Response-Werte innerhalb eines Tages waren kleiner als 2 % und zwischen den Tagen kleiner als 8 %, so dass die unspezifische Bindung der Matrix-Komponenten nur einen geringen Einfluss auf die Präzision und Reproduzierbarkeit des Verfahrens hatte.

**Tabelle 9: Vergleich der normierten  $\Delta$  Response-Werte von zwei verschiedenen Rohmilch-Proben, die an zwei Tagen dotiert und mittels SPR-Biosensor analysiert worden sind.**

	Tag 1	Tag 2	CV <sup>#</sup>
Blank (n = 11)	100 % (396 RU $\pm$ 0,8 %)†	100 % (447 RU $\pm$ 0,6 %)	-
Benzylpenicillin 4 ng/ml (n = 3)	70 % (276 RU $\pm$ 0,5 %)	63 % (281 RU $\pm$ 0,6 %)	7,4
Ampicillin 4 ng/ml (n = 3)	73 % (287 RU $\pm$ 2,0 %)	69 % (307 RU $\pm$ 0,9 %)	4,0
Amoxicillin 4 ng/ml (n = 3)	75 % (298 RU $\pm$ 0,6 %)	70 % (315 RU $\pm$ 0,3 %)	4,9
Cloxacillin 30 ng/ml (n = 3)	73 % (289 RU $\pm$ 0,6 %)	68 % (306 RU $\pm$ 1,1 %)	5,0
Cephalexin 100 ng/ml (n = 3)	92 % (338 RU $\pm$ 1,0 %)	84 % (376 RU $\pm$ 0,8 %)	6,4
Cefoperazon 50 ng/ml (n = 3)	71 % (283 RU $\pm$ 0,6 %)	65 % (292 $\pm$ 0,5 %)	6,2
Matrix-Kontrolle (n = 5) ohne PBP 2x* und DIG-AMPI	67 % (264 RU $\pm$ 0,7 %)	60 % (267 RU $\pm$ 1,0 %)	7,8

<sup>#</sup>CV: Variationskoeffizienten der Mittelwerte der normierten  $\Delta$  Response-Werte von Tag 1 und 2

†  $\Delta$  Response-Wert  $\pm$  CV



**Abbildung 56: Matrixkalibrierkurven von Penicillinen und Cephalosporinen in gepoolter Rohmilch jeweils am halben MRL-, MRL- und 2-fachen MRL-Wert dotiert. Die Analysen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Für die Ermittlung der Nachweisgrenzen wurden zehn Blank-Proben untersucht. SD: Standardabweichung.**

Da die Matrixinterferenzen nur innerhalb geringer Grenzen schwankten, konnten die gepoolten Rohmilch-Proben ohne aufwendige Probenvorbereitung analysiert werden. Die Rohmilch wurde vor der Zugabe von DIG-AMPI und PBP 2x\* lediglich zentrifugiert, um sie zu entfetten und eventuell vorhandene Partikel, die das mikrofluide System verstopfen könnten, zu entfernen. Alle untersuchten sechs  $\beta$ -Lactam-Antibiotika konnten in dotierter, gepoolter Rohmilch in Konzentrationen nachgewiesen werden, die niedriger lagen als der halbe MRL-Wert (Abbildung 56). Benzylpenicillin, Ampicillin und Amoxicillin konnten unterhalb einer Konzentration von 2 ng/ml nachgewiesen werden, Cloxacillin unterhalb von 15 ng/ml, Cefoperazon unterhalb von 25 ng/ml und Cephalexin unterhalb von 50 ng/ml. Die Berechnung der Nachweisgrenze in gepoolter Rohmilch erfolgte wie unter 6.4.4 für HBSEP-Puffer beschrieben.

Wie in Abbildung 45 dargestellt, basiert der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-spezifische SPR-Biosensor-Assay auf der Inhibierung der Bindung des Digoxigenin-markierten Ampicillin-Derivates (DIG-AMPI) an das PBP 2x\* aus *Streptococcus pneumoniae*. Die in Abhängigkeit von der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-Konzentration aus PBP 2x\* und DIG-AMPI gebildeten PBP 2x\*/DIG-AMPI-Konjugate wurden durch die SPR-Biosensor-Analyse mit Digoxigenin-spezifischen Antikörpern, die auf dem Sensor-Chip immobilisiert waren, nachgewiesen. Ein verwandtes Assay-Format haben Gustavsson *et al.*<sup>245</sup> mit ihrem Rezeptor-Assay (Abbildung 26) entwickelt. Analog zu dem in dieser Arbeit entwickelten Assay, wurde in dem Rezeptor-Assay die zu analysierende Probe mit einem PBP, der DD-Carboxypeptidase aus *Actinomadura* R39, inkubiert, so dass vorhandene  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-Rückstände die DD-Carboxypeptidase inhibierten<sup>245</sup>. Die nicht inhibierten DD-Carboxypeptidase-Moleküle wurden durch ein auf dem Sensor-Chip reversibel immobilisiertes Cephalosporin nachgewiesen, wobei die DD-Carboxypeptidase während der SPR-Biosensor-Analyse an das immobilisierte Cephalosporin gebunden hat. Dies bedingte, dass auf dem Sensor-Chip zwei verschiedene Reaktionen als Bestandteil einer biomolekularen Interaktionsanalyse ablaufen mussten. Zunächst musste das Cephalosporin immobilisiert werden und anschließend wurde die DD-Carboxypeptidase injiziert. Als Konsequenz war die Analysen-Dauer mit 17 Minuten pro Probe<sup>245</sup> (einschließlich Regenerierung) für eine SPR-Biosensor-Analyse verhältnismäßig lang. Die Analysenzeit der in dieser Arbeit beschriebenen SPR-Biosensor-Analyse lag bei 10 Minuten (einschließlich Regenerierung). Vor der SPR-Biosensor-Analyse erfolgten zwei Teilreaktionen mit PBP 2x\* und DIG-AMPI, die insgesamt 30 Minuten dauerten. Die gesamte Analysen-Zeit für eine Probe betrug daher 40 Minuten. Allerdings können aufgrund der Stabilität der PBP 2x\*/ $\beta$ -Lactam-Antibiotikum-Konjugate (Halbwertszeit je nach Penicillin und Cephalosporin 24 bis 54 Stunden<sup>70</sup>) mehr als 80 Proben parallel angesetzt und anschließend analysiert werden. Bei größeren Probenserien nähert sich die durchschnittliche Analysenzeit pro Probe deshalb dem Wert von 10 Minuten.

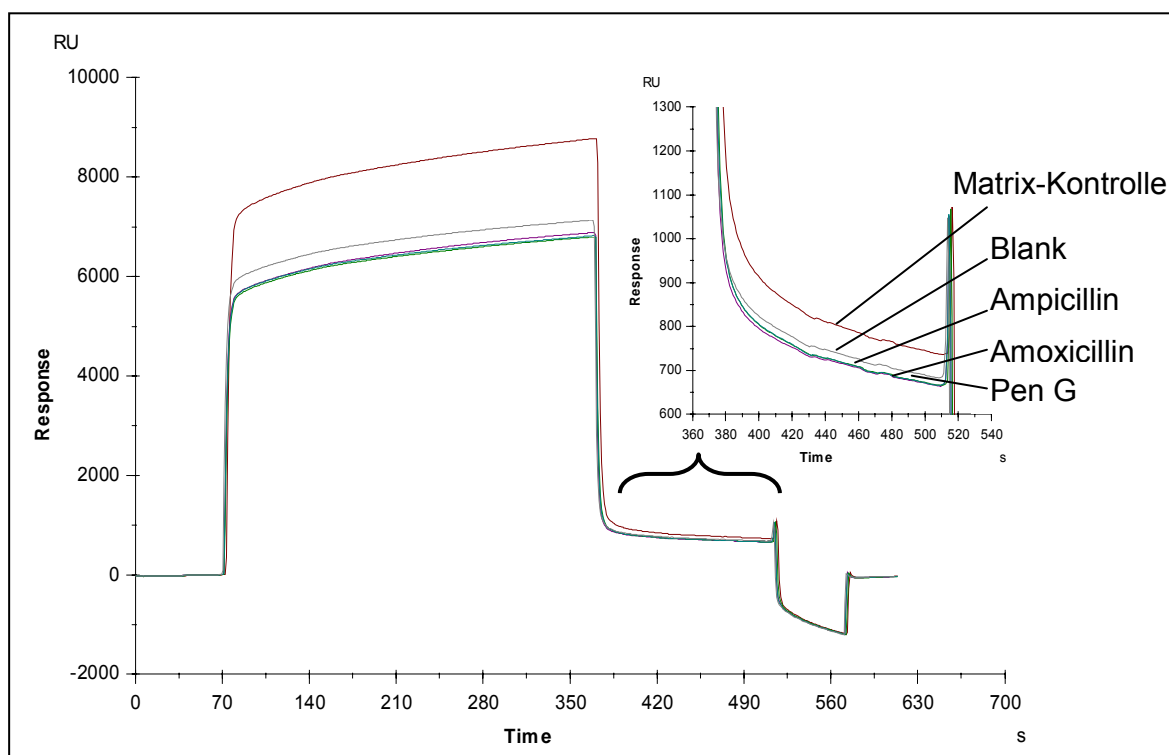
Ein Nachteil des von Gustavsson *et al.*<sup>245</sup> entwickelten Rezeptor-Assays war, dass die Analyse von Rohmilch-Proben aufgrund von Matrixinterferenzen nicht möglich war<sup>245</sup> und die für die Durchführung des Assays essentiellen Reagenzien nicht reproduzierbar synthetisiert werden konnten<sup>244</sup>.

Mit den von Gustavsson *et al.*<sup>247</sup> entwickelten enzymatischen SPR-Biosensor-Assays (Abbildung 27) konnte in Rohmilch eine Vielzahl veterinärmedizinisch-relevanter Penicilline und Cephalosporine nachgewiesen werden. Der Nachweis von Cloxacillin, eines der in Feld-Proben am häufigsten nachgewiesenen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika<sup>193</sup>, gelang jedoch erst ab einer Konzentration, die dem zweifachen MRL-Wert entspricht<sup>247</sup>. Mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Assay konnten Benzylpenicillin, Ampicillin, Amoxicillin, Cloxacillin, Cefoperazon und Cephalexin in Milch unterhalb der Konzentrationsbereiche der für diese Matrix festgesetzten MRL-Werte nachgewiesen werden.



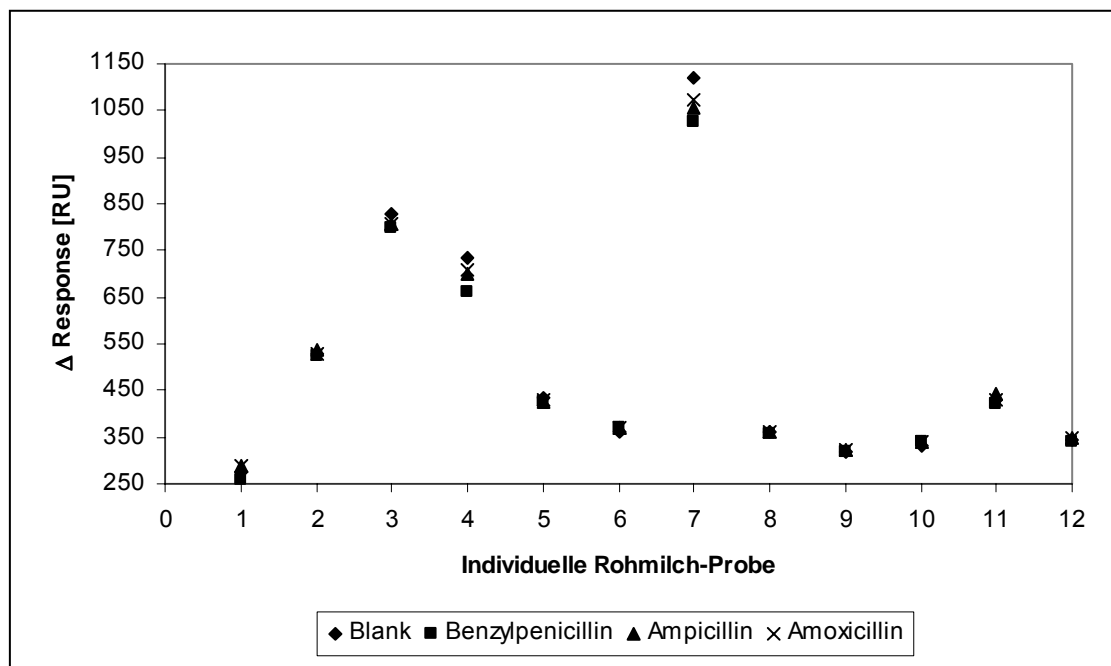
### 6.4.6 Analyse von individuellen Rohmilch-Proben

Die untersuchten Vollmilch-Chargen eines Herstellers und gepoolten Rohmilch-Proben lieferten über zwei Monate hinweg konstante und reproduzierbare Ergebnisse. Die Variationskoeffizienten innerhalb einer Analysenreihe waren in der Regel  $< 5\%$  (vgl. Tabelle 8 und Tabelle 9). Rohmilch-Proben unterschiedlicher Kühe aus verschiedenen Tier-Beständen werden sich jedoch in ihrer Zusammensetzung, z.B. Proteingehalt, Fettgehalt und Anzahl an somatischen Zellen, stärker unterscheiden<sup>268</sup>. Daraus resultiert eine größere Schwankungsbreite der  $\Delta$  Response-Werte, weil sich die unterschiedlichen Proben auch in ihren Matrixinterferenzen stärker unterscheiden. Um den Einfluss derartiger Matrixinterferenzen, die bei einer Analyse von Feld-Proben zu erwarten sind, auf den entwickelten Assay näher zu untersuchen, wurde das Gemelk einzelner Kühe untersucht. Rohmilch-Proben einzelner Kühe unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung sehr stark und haben einen Einfluss auf die Rate falsch-positiver oder falsch-negativer Befunde von Screening-Tests<sup>269,270</sup>. Die individuellen Rohmilch-Proben wurden als Blank, nach Dotierung mit Benzylpenicillin, Ampicillin oder Amoxicillin (4 ng/ml) sowie als Matrix-Kontroll-Proben analysiert. Für die Analyse standen insgesamt 20 individuelle Rohmilch-Proben zur Verfügung. Die Proben der einzelnen Kühe wurden wie die Vollmilch oder gepoolte Rohmilch zunächst entfettet und nach Zugabe von PBP 2x\* und DIG-AMPI mittels SPR-Biosensor analysiert. Die Matrix-Kontroll-Proben wurden ohne PBP 2x\* und DIG-AMPI analysiert.



**Abbildung 57: Sensorgramme einer individuellen Rohmilch-Probe, die wie unter 9.4.8 beschrieben analysiert worden ist. Pen G: Benzylpenicillin.**

Die individuellen Rohmilch-Proben zeigten im Vergleich zu den Vollmilch- und gepoolten Rohmilch-Proben ein größeres Maß an Matrixinterferenzen. Die Matrix-Kontroll-Proben lieferten  $\Delta$  Response-Werte von bis zu 1.000 RU, die zusätzlich über einen sehr großen Bereich streuten (215 RU – 1.000 RU). Daneben lieferten die Matrix-Kontroll-Proben teilweise höhere  $\Delta$  Response-Werte als die entsprechenden Blank-Proben (Abbildung 57). Ebenso wurden bei einigen dotierten Proben höhere  $\Delta$  Response-Werte beobachtet als bei den Blank-Proben (Abbildung 58). In dieser ersten Messreihe sollten zunächst alle 20 individuellen Rohmilch-Proben als Blank, Matrix-Kontroll-Probe und dotierte Probe analysiert werden. Diese Messreihe wurde jedoch vorzeitig abgebrochen, da aufgrund der Matrixinterferenzen keine Unterscheidung in Proben mit und ohne Rückstände von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika möglich war. In Abbildung 58 sind daher nur die Ergebnisse von 12 Proben der Messreihe abgebildet und es liegen keine Ergebnisse der Matrix-Kontroll-Proben vor. Die gepoolten Rohmilch-Proben zeigten möglicherweise aufgrund von Verdünnungseffekten geringere Matrixinterferenzen als die individuellen Rohmilch-Proben.



**Abbildung 58:**  $\Delta$  Response-Werte von 12 individuellen Rohmilch-Proben, die als Blank oder nach Dotierung mit Benzylpenicillin, Ampicillin oder Amoxicillin mittels SPR-Biosensor analysiert worden sind.

$\Delta$  Response-Werte von bis zu 1.000 RU wurden für Rohmilch, die nicht weiter aufarbeitet wurde, ebenfalls von Gustavsson<sup>244</sup> mit dem Rezeptor-Assay beobachtet. Auch Haasnoot *et al.*<sup>234</sup> haben in ihrem kompetitiven SPR-Biosensor-Assay für Streptomycin und Dihydrostreptomycin, bei welchem ein Streptomycin-Ovalbumin-Konjugat auf dem Sensor-Chip immobilisiert war,  $\Delta$  Response-Werte von bis zu 500 RU nach Injektion von unverdünnten,

entfetteten Rohmilch-Proben gemessen. Bezogen auf das Endvolumen der zur SPR-Biosensor-Analyse eingesetzten Lösungen lag der Milch-Anteil in der vorliegenden Studie bei 83 %. Ein niedrigerer Milch-Anteil, der eventuell zu einem geringeren Level an Matrixinterferenzen geführt hätte, konnte nicht eingesetzt werden, da sonst  $\beta$ -Lactam-Antibiotika im Konzentrations-Bereich der festgesetzten MRL-Werte nicht hätten nachgewiesen werden können.

Gustavsson<sup>244</sup> geht davon aus, dass die Matrixinterferenzen unter anderem durch Molken-Proteine der Rohmilch verursacht werden. Sie konnte zeigen, dass durch eine Hitzebehandlung (72 °C, 5 min) der Milch, die zur Denaturierung der Molkenproteine führt, die unspezifische Bindung um 70 % reduziert werden konnte und weniger variable Werte ergab. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit die individuellen Rohmilch-Proben vor der Entfettung und der Zugabe von PBP 2x\* und DIG-AMPI für 3 Minuten bei 95 °C erhitzt, um die Matrixinterferenzen zu verringern. Die höhere Temperatur und eine zeitlich kürzere thermische Behandlung wurde für die Stabilität der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika als weniger kritisch erachtet. Die Stabilität der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika gegenüber dem Erhitzungsprozess wurde anhand von Benzylpenicillin-Lösungen mit Konzentrationen, die dem halben MRL-, MRL- und 2-fachen MRL-Wert entsprechen, überprüft. In HBSEP-Puffer konnte zwischen den  $\Delta$  Response-Werten der erhitzten und nicht-erhitzten Benzylpenicillin-Lösungen kein Unterschied festgestellt werden. Vergleichbar mit den Ergebnissen von Gustavsson<sup>244</sup> konnte die unspezifische Bindung von Matrix-Bestandteilen an den Sensor-Chip durch die Hitzebehandlung um 75 % reduziert werden.

Matrixinterferenzen in einer SPR-Biosensor-Analyse sind sowohl auf Wechselwirkungen zwischen Matrix-Komponenten und den auf dem Sensor-Chip immobilisierten Molekülen als auch auf Wechselwirkungen zwischen Matrix-Komponenten und dem negativgeladenen Carboxymethyldextran auf der Sensor-Chip-Oberfläche zurückzuführen<sup>234</sup>. Um die Wechselwirkungen mit dem Carboxymethyldextran zu verringern, wurde die Probe mit einer Carboxymethyldextran-Lösung versetzt (Endkonzentration 0,25 %) <sup>228,271</sup>. Die zugesetzten Carboxymethyldextran-Moleküle belegen wahrscheinlich die Struktur-Elemente der Moleküle in der zu analysierenden Lösung, die an das Carboxymethyldextran auf der Sensor-Chip-Oberfläche binden. Durch die Zugabe der Carboxymethyldextran-Lösung konnte die unspezifische Bindung um weitere 5 – 10 % reduziert werden. Insbesondere die Bindung der PBP 2x\*-Moleküle an die Carboxymethyldextran-Matrix konnte auf einen Wert von < 15 RU verringert werden, so dass die unspezifische Bindung der PBP 2x\*-Moleküle in den nachfolgenden Analysen vernachlässigt wurde.

Im weiteren Verlauf der Studie wurde der Assay für Benzylpenicillin optimiert, weil Benzylpenicillin das am häufigsten eingesetzte  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum in der Mastitis-Therapie ist. Als Konsequenz ist es auch das am häufigsten nachgewiesene  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum in Feld-Proben<sup>193,272</sup>. Schachbrett-titrationen in erhitzten Rohmilch-Proben mit 4,3 pmol oder 2,15 pmol PBP 2x\* und 0,9 pmol oder 0,45 pmol DIG-AMPI ergaben, dass sich die  $\Delta$  Response-Werte dotierter Proben deutlicher von denen der Blank-Proben unterschieden, wenn wie bei den Vollmilch- oder gepoolten Rohmilch-Proben 4,3 pmol PBP 2x\* zugegeben wurden, der Gehalt an DIG-AMPI jedoch auf 0,45 pmol reduziert wurde. Mit diesen modifizierten Bedingungen, d.h. Erhitzungsschritt, Zugabe von löslichem Carboxymethyldextran, 4,3 pmol PBP 2x\* und 0,45 pmol DIG-AMPI, ergaben sich für die  $\Delta$  Response-Werte die nachfolgenden Mittelwerte: Matrix-Kontroll-Proben  $129 \pm 18$  RU ( $n = 19$ ), dotierten Proben (Benzylpenicillin 4 ng/ml)  $163 \pm 22$  RU ( $n = 19$ ) und Blank-Proben  $285 \pm 25$  RU ( $n = 19$ ). Eine der 20 Proben wurde für die Berechnungen der Mittelwerte nicht berücksichtigt, weil diese nach dem Grubbs-Test als Ausreißer identifiziert wurde. Eine bessere Präzision wurde erreicht, wenn der  $\Delta$  Response-Wert der Matrix-Kontroll-Probe von dem der jeweiligen Blank-Probe und der jeweiligen dotierten Probe abgezogen wurde. Mit diesen Werten wurden die Mittelwerte berechnet, welche eine geringere Streuung zeigten (Mittelwert Blank-Proben  $156 \pm 10$  RU ( $n = 19$ ), Mittelwert dotierte Proben  $34 \pm 10$  RU ( $n = 19$ )).

Diese Subtraktion kann auch mit Feld-Proben erfolgen, da es sich bei den Matrix-Kontroll-Proben lediglich um Proben ohne PBP 2x\* und DIG-AMPI handelt. Dies geht jedoch zu Lasten der Analysen-Zeit, da eine Probe zweimal untersucht werden muss, einmal mit PBP 2x\* und DIG-AMPI und einmal ohne. Die Doppeluntersuchung kann jedoch vermieden werden, wenn eine Referenz-Flusszelle verwendet wird. In einer Referenz-Flusszelle wird ein Antikörper, der Matrix-Bestandteile in einem vergleichbaren Level wie der Analyt-spezifische Antikörper bindet, immobilisiert. Während der SPR-Biosensor-Analyse wird der unspezifische Response der Referenz-Flusszelle kontinuierlich von dem Response der Analyt-spezifischen Flusszelle abgezogen. In orientierenden Voruntersuchungen wurden die Dinitrophenyl-spezifischen Antikörper immobilisiert und die  $\Delta$  Response-Werte der Matrix-Kontroll-Proben mit denen des monoklonalen Digoxigenin-spezifischen Antikörpers verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Dinitrophenyl-spezifischen Antikörper nicht für die Belegung einer Referenz-Flusszelle verwendet werden konnten, weil diese höhere  $\Delta$  Response-Werte als der Digoxigenin-spezifische Antikörper lieferten.

Versuche eine Flusszelle, dessen Carboxymethyldextran-Schicht nicht modifiziert wurde, oder eine mit Ethanolamin deaktivierte Sensor-Chip-Oberfläche zu verwenden, waren ebenfalls nicht erfolgreich. Sowohl die unmodifizierte als auch die deaktivierte Flusszelle lieferten

ebenfalls höhere  $\Delta$  Response-Werte als die Flusszelle mit den immobilisierten Digoxigenin-spezifischen Antikörpern. Die vorhandenen Carboxylgruppen der Sensor-Chip-Oberfläche wirkten wahrscheinlich wie ein Kationenaustauscher, so dass z.B. Milchproteine angereichert wurden. Eine Alternative könnte eine Referenz-Flusszelle mit immobilisierten IgG-Antikörpern aus einem Kaninchen-Serum (IgG-Fraktion) sein<sup>234</sup>.

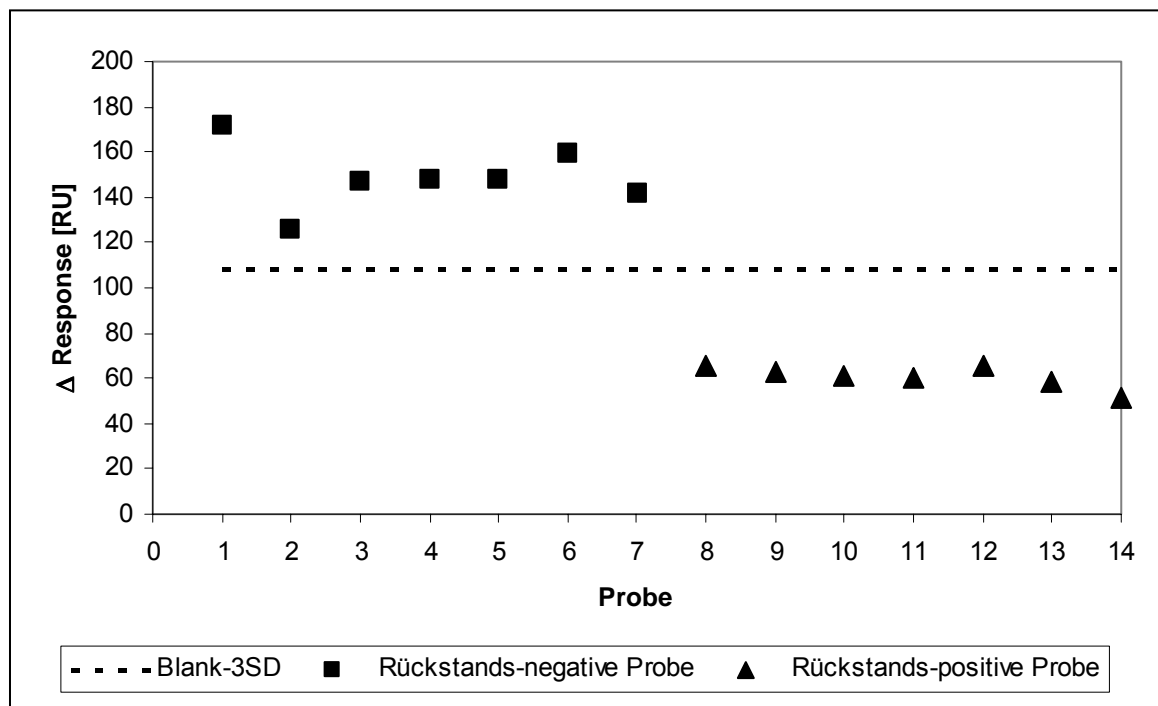
Die Subtraktion des  $\Delta$  Response-Wertes der Matrix-Kontroll-Probe (ohne PBP 2x\* und DIG-AMPI) von dem  $\Delta$  Response-Wert der Probe (mit PBP 2x\* und DIG-AMPI) oder die Verwendung einer Referenz-Flusszelle ist in jedem Fall sinnvoll, da dadurch der spezifische Response ermittelt wird, der für die Beurteilung ausschlaggebend ist, ob eine Probe  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-Rückstände enthält oder nicht. Aus analytischer Sicht erscheint die Subtraktion der  $\Delta$  Response-Werte der Matrix-Kontroll-Probe zweckmäßiger, da mit dieser Methode, die unspezifischen Wechselwirkungen mit der Flusszelle bestimmt werden, die auch für die Beurteilung der zu beurteilenden Proben verwendet wird. Hier liegt ein Vorteil des in dieser Arbeit entwickelten SPR-Biosensor-Assays. Für jede einzelne Probe kann auch der individuelle Grad an Matrixinterferenzen ermittelt werden.

#### 6.4.7 Simulierte Feldstudie

Die bisher gewählte Versuchsanordnung, bei der sämtliche Proben als Blank und nach Dotierung untersucht werden können, wird bei der Analyse von Feld-Proben so nicht vorkommen, da Feld-Proben entweder Rückstands-positiv oder Rückstands-negativ sind. Daher wurden in einer ersten modellhaften Evaluierung die zwanzig individuellen Rohmilch-Proben nicht komplett als Blank oder dotierte Probe analysiert, sondern sechs Proben als Blank, sieben als Rückstands-negative Proben und sieben nach Dotierung mit Benzylpenicillin in einer Konzentration, die dem MRL-Wert entspricht (4 ng/ml), als Rückstands-positive Proben. Für jede Probe wurde jedoch der Matrix-Kontroll-Wert ohne DIG-AMPI und PBP 2x\* bestimmt. Die Auswahl der einzelnen Proben erfolgte zufallsorientiert.

Bei der Auswertung der Messdaten wurde der  $\Delta$  Response-Wert der Matrix-Kontroll-Probe vom  $\Delta$  Response-Wert der Probe mit PBP 2x\* und DIG-AMPI abgezogen. Der Mittelwert der  $\Delta$  Response-Werte der Blank-Proben betrug  $154 \pm 15$  RU ( $n = 6$ ). Die einzelnen  $\Delta$  Response-Werte der vermeintlich Rückstands-positiven und -negativen Proben wurden mit dem Mittelwert der Blank-Proben abzüglich der dreifachen Standardabweichung (Unterscheidungsgrenze) verglichen (Abbildung 59). Proben deren  $\Delta$  Response-Wert kleiner als die Unterscheidungsgrenze war, wurden als Rückstands-positiv beurteilt und Proben deren Wert größer als die Unterscheidungsgrenze war, als Rückstands-negativ. Abbildung 59 zeigt, dass alle sieben Proben ohne  $\beta$ -Lactam-Antibiotika als Rückstands-negativ beurteilt werden konnten und alle Proben mit Benzylpenicillin als Rückstands-positiv. Die Mittelwerte der

$\Delta$  Response-Werte der Rückstands-negativen Proben betragen  $148 \pm 14$  RU ( $n = 7$ ) und die der Rückstands-positiven Proben  $61 \pm 5$  RU ( $n = 7$ ). Die Variationskoeffizienten lagen bei den Rückstands-positiven, Rückstands-negativen und Blank-Proben im Bereich von 9 bis 11 % und zeigen, dass die individuellen Rohmilch-Proben sich in ihren Matrixinterferenzen stärker unterscheiden als die gepoolten Rohmilch-Proben. Die Nachweisgrenze für Benzylpenicillin aus diesem Experiment wurde mit 2 ng/ml ermittelt, indem der  $\Delta$  Response-Wert für den Mittelwert der Blanks abzüglich der 3-fachen Standardabweichung (Blank – 3 SD) mit der Kalibrierkurve von Benzylpenicillin in HBSEP-Puffer verglichen wurde.



**Abbildung 59: SPR-Biosensor-Analyse der individuellen Rohmilch-Proben nach Erhitzung und Zugabe von Carboxymethyldextran. Erläuterungen siehe Text.**

Die Unterscheidung zwischen Proben mit und ohne  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-Rückstände basiert auf signifikanten Unterschieden zwischen den  $\Delta$  Response-Werten von Rückstands-positiven und Blank-Proben. Ein positiver Befund besagt jedoch nur, dass in der analysierten Probe  $\beta$ -Lactam-Antibiotika vorhanden sind. In Proben mit unbekanntem Rückstandsgehalt können einzelne  $\beta$ -Lactam-Antibiotika nicht identifiziert und quantifiziert werden. Positive Befunde müssen durch geeignete Bestätigungsverfahren nachuntersucht werden, z.B. mit dem von Becker *et al.*<sup>198</sup> beschriebenen HPLC/MS-MS-Verfahren, mit welchem 7 Penicilline und 8 Cephalosporine identifiziert und quantifiziert werden können.

Die Analyse der individuellen Rohmilch-Proben einzelner Kühe bestätigte die Erfahrung, dass die unspezifische Bindung von Matrix-Bestandteilen an den Sensor-Chip ein kritischer Faktor ist, der die Nachweisgrenze eines SPR-Biosensor-Assays beeinträchtigen oder die Analyse unmöglich machen kann. Die unspezifische Bindung von Matrix-Bestandteilen an

den Sensor-Chip konnte durch eine Hitze-Behandlung und die Zugabe von löslichem Carboxymethyldextran auf ein konstantes und niedriges Level reduziert werden, so dass auch in den individuellen Rohmilch-Proben Benzylpenicillin an dem festgesetzten MRL-Wert nachgewiesen werden konnte mit einer Nachweisgrenze für Benzylpenicillin von 2 ng/ml. In den gepoolten Rohmilch-Proben konnten Benzylpenicillin, Ampicillin, Amoxicillin, Cloxacillin, Cephalexin und Cefoperazon unterhalb der Konzentrationen, die dem jeweiligen MRL-Wert entsprechen, nachgewiesen werden. Da die Analysen jedoch mit einer limitierten Anzahl an Rohmilch-Proben durchgeführt worden sind und die modellhafte Feldstudie nur mit Benzylpenicillin durchgeführt wurde, sind für eine abschließende Evaluierung und Validierung weitere Analysen mit einer größeren Anzahl an Rohmilch-Proben unterschiedlicher Herkunft notwendig. Damit das Verfahren in der Routineanalytik eingesetzt werden kann, müssen des Weiteren SPR-Biosensor-Analysen mit sämtlichen veterinärmedizinisch genutzten  $\beta$ -Lactam-Antibiotika durchgeführt werden. Die Entwicklung eines vollständig routinetauglichen und validierten Assays lag jedoch außerhalb des Rahmens dieser Arbeit.

Einen Einfluss auf die Nachweisgrenze für ein bestimmtes  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum haben nicht nur Matrix-Interferenzen sondern auch die Affinität des PBP 2x\* gegenüber einem bestimmten Penicillin oder Cephalosporin. Das in dieser Arbeit eingesetzte PBP 2x\* besitzt, auf der Basis der publizierten  $k_2/K$ -Werte, die geringste Affinität gegenüber Cephalexin, so dass eine Abnahme der  $\Delta$  Response-Werte erst bei großen Konzentrationen beobachtet wurde. Darüber hinaus war im Konzentrationsbereich der MRL-Werte der Unterschied zu den Blank-Proben weniger ausgeprägt als z.B. bei Benzylpenicillin. Dies hat zur Folge, dass bei hohen Matrixinterferenzen die Nachweisgrenze für Cephalexin über dem festgesetzten MRL-Wert liegen kann. Für die weitere Entwicklung zu einem wirklichen Gruppen-spezifischen Screening-Assay für  $\beta$ -Lactam-Antibiotika sollte eine weitere Optimierung insbesondere mit diesem Cephalosporin erfolgen. Wenn Cephalexin eindeutig am MRL-Wert nachgewiesen kann, so können die anderen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika aufgrund der größeren  $k_2/K$ -Werte ebenfalls deutlich von den Blank-Proben unterschieden werden.

#### **6.4.8 Stabilität des Sensor-Chips**

Nach ca. 250 Analysen mit den individuellen Rohmilch-Proben wurden erneut Digoxigenin-spezifische Antikörper in einer bis zu diesem Zeitpunkt nicht verwendeten Flusszelle immobilisiert. Beide Flusszellen wurden für weitere 250 Analysen der individuellen Rohmilch-Proben verwendet. Obwohl mit den frisch-immobilisierten Antikörpern um den Faktor 1,5 höhere  $\Delta$  Response-Werte gemessen wurden, lieferten beide Flusszellen vergleichbare und auswertbare Ergebnisse. Eine Flusszelle konnte daher für mindestens 500 Analysen verwendet werden. Dies ist ein für die Routine-Analytik ausreichender Wert.

## 7 Schlussbetrachtung und Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit wurde der Grundstein für die Entwicklung eines schnellen und sensitiven Screening-Assays für  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-Rückstände in Milch gelegt, der für die Routine-Analytik geeignet ist. Als  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-spezifisches Rezeptorprotein wurde ein Penicillin-bindendes Protein (PBP), das PBP 2x\* aus *Streptococcus pneumoniae*, verwendet. Daher ist der Test spezifisch für Penicilline und Cephalosporine mit intaktem  $\beta$ -Lactam-Ring.

Im Hinblick auf die natürliche Schwankungsbreite der Zusammensetzung von Rohmilch und der damit einhergehenden Matrixinterferenzen sollte während der Analyse von Feld-Proben eine ausreichende Anzahl an definierten Rohmilch-Blank-Proben und dotierten Rohmilch-Proben analysiert werden. Mit einer derartigen Matrix-Kalibrierung können die mit der natürlichen Schwankungsbreite der Zusammensetzung einhergehenden Matrixinterferenzen berücksichtigt werden.

Diese Arbeit ist zudem ein Beispiel für die Flexibilität von SPR-Biosensoren bei bioanalytischen Fragestellungen. Durch die Verwendung eines bifunktionellen Moleküls, das nach zwei verschiedenen Mechanismen erkannt wird, konnte das Problem der kovalenten Bindung zwischen Rezeptor (PBP) und Ligand ( $\beta$ -Lactam-Antibiotikum) umgangen werden und die biomolekulare Interaktionsanalyse in Form einer einfachen Antigen/Antikörper-Reaktion durchgeführt werden. Für andere Antibiotika können direkte oder kompetitive Assays mit entsprechenden Rezeptoren, wie an Resistenzmechanismen beteiligten Proteinen, Ribosomen, DNA-Gyrasen und anderen Target-Proteinen, entwickelt werden, wenn Rezeptor und Antibiotikum keine kovalente Bindung bilden.

Insbesondere für das Screening auf chemisch sehr heterogene Gruppen von Tierarzneimitteln, für welche die Gewinnung Gruppen-spezifischer Antikörper problematisch ist, könnten Target-Proteine oder Resistenz-Proteine eine Alternative zu Antikörpern sein.

Die Empfindlichkeit des Assays könnte durch die Injektion eines PBP 2x\*-spezifischen Antikörpers nach der Injektion der Proben- oder Standard-Lösung gesteigert werden. Die PBP 2x\*-Antikörper würden an die von den immobilisierten Digoxigenin-spezifischen Antikörpern festgehaltenen PBP 2x\*/DIG-AMPI-Konjugaten binden und aufgrund der damit einhergehenden Zunahme des Molekulargewichtes, zu einer Erhöhung des Responses führen. Neben der Steigerung der Empfindlichkeit würde die Injektion eines PBP 2x\*-spezifischen Antikörpers auch die Selektivität des Verfahrens verbessern. Der Nachweis der PBP 2x/DIG-AMPI-Konjugate würde, vergleichbar mit einem Sandwich-ELISA, auf zwei immunchemischen Reaktionen basieren, wobei jeder Antikörper ein anderes Epitop erkennt.



Für den Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Milch ist eine Vielzahl von Screening-Tests kommerziell erhältlich, die sowohl im Labor als auch auf Erzeugerebene durchgeführt werden können. Diese Tests sind mit wenigen Handgriffen durchzuführen und ausreichend sensitiv, um Penicilline und Cephalosporine spezifisch im Konzentrationsbereich der festgelegten MRL-Werte zu erfassen. Ein limitierender Faktor ist die geringe Anzahl an parallel analysierbarer Proben, da die einzelnen Untersuchungsergebnisse zu definierten Zeiten, in der Regel nach fünf bis zehn Minuten, visuell abgelesen werden müssen. Für größere Probenserien eignen sich Tests wie ELISA, die in 96-Loch-Mikrotiterplatten in etwa zwei bis drei Stunden durchgeführt werden können. Screening-Tests im Mikrotiterplattenformat sind jedoch für  $\beta$ -Lactam-Antibiotika kommerziell nicht erhältlich. Die Tatsache, dass die große Mehrzahl der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-spezifischen Screening-Tests nur für die Matrix Milch entwickelt wurde, stellt für die Routine-Analytik ebenfalls einen limitierenden Faktor dar. Für die Untersuchung von z.B. Fleisch sind diese Tests überwiegend ungeeignet. Obwohl die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika auf dem Gebiet der Rückstandsanalytik sicherlich zu den bestuntersuchten Tierarzneimitteln gehören, besteht noch weiterer Forschungsbedarf, für ein Gruppen-spezifisches Screening in anderen Lebensmittelmatrices außer Milch.

Der Einsatz von Biosensoren kann als eine weitere Stufe in der Entwicklung von Screening-Verfahren betrachtet werden. Insbesondere SPR-Biosensoren besitzen den Vorteil, dass Analysen vollautomatisiert durchgeführt und Rezeptor/Ligand-Wechselwirkungen in Echtzeit verfolgt werden können. Geräte mit mehreren Flusszellen, die unterschiedlich belegt sind und in Reihe verwendet werden können, erlauben, dass ein Lebensmittel auf mehrere Substanzen in einem Lauf untersucht werden kann. Die Analysenzeit pro Probe liegt bei Geräten, die nicht für high-throughput Messungen ausgelegt sind, in der Größenordnung von fünf bis zehn Minuten, so dass die Gesamtanalysenzeit für eine in einer Mikrotiterplatte vorgelegten Probenserie acht bis 16 Stunden dauert. Zwar kann mit einem ELISA dieselbe Anzahl an Proben innerhalb von drei Stunden analysiert werden, dennoch ist ein Probendurchsatz von ca. 100 Proben pro Tag speziell im Vergleich zu chemisch-physikalischen Analyseverfahren äußerst leistungsfähig. Weiterhin besitzen Ergebnisse aus SPR-Biosensor-Assays im Vergleich zu herkömmlichen Screening-Verfahren (z.B. ELISA) eine größere Präzision. Diese Eigenschaften machen SPR-Biosensoren für die Routineanalytik besonders interessant.

Um zu verhindern, dass Antibiotika-Rückstände in die Nahrungskette gelangen, sollten Rückstandsuntersuchungen bereits auf dem Schlachthof durchgeführt werden. Die Untersuchungen sollten nicht nur punktuell erfolgen, sondern möglichst alle Tiere erfassen. Automatisierte Analyseverfahren, die z.B. mit SPR-Biosensoren durchgeführt werden, sind diesen

hohen Anforderungen am ehesten gewachsen. Die Analyse vor Ort würde den Zeitaufwand für den Transport ins Labor eliminieren, so dass Befunde schneller verfügbar wären. Erste Machbarkeitsstudien haben gezeigt, dass es technisch möglich ist, SPR-Biosensoren direkt im Schlachthof einzusetzen<sup>273,274</sup>.

In einem EU-Projekt wurde ein Prototyp eines high-throughput SPR-Biosensors mit acht parallelen Flusszellen und einer Injektionsnadel pro Flusszelle zum Nachweis von Tierarzneimittelrückständen getestet<sup>274</sup>. Mit diesem Prototyp konnte entweder ein Analyt in acht verschiedenen Proben bestimmt werden oder acht Analyten in einer Probe. Dieser Prototyp verkürzte die Analysen-Zeit für 96 Proben in einer Mikrotiterplatte vorgelegt von 540 Minuten (mit einem „herkömmlichen“ vollautomatisierten Biosensor) auf 50 Minuten. Erst mit einem solchen Probendurchsatz können SPR-Biosensoren in die Routineanalytik Eingang finden, wenn z.B. eine lückenlose Rückstandskontrolle im Schlachthof stattfinden soll.

Eine auch für die Tierarzneimittel-Rückstandsanalytik interessante neuere Entwicklung ist die Kombination der biomolekularen Interaktionsanalyse mit der Massenspektrometrie (BIA/MS)<sup>275</sup>. Mittels BIA/MS könnten positive Screening-Befunde unmittelbar nach der Screening-Analyse bestätigt werden. Voraussetzung hierfür ist, dass die biomolekulare Interaktionsanalyse in Form eines direkten Assays durchgeführt wird, da die gebundenen Rückstände für die massenspektrometrische Detektion vom Sensor-Chip wiedergewonnen werden müssen.

## 8 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein Screening-Test mit einem Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Biosensor (SPR-Biosensor) entwickelt, um  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-Rückstände in Milch nachzuweisen. Als biomolekulare Erkennungspartner für Penicilline und Cephalosporine wurden Penicillin-bindende Proteine (PBP) eingesetzt. PBP sind das Target der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika im bakteriellen Stoffwechsel. Sie binden spezifisch Penicilline und andere  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, wobei die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika kovalent an das aktive Zentrum der PBP binden und PBP/ $\beta$ -Lactam-Konjugate entstehen. Der Screening-Test basiert auf der Bindung eines Markermolekül-markierten Ampicillin-Derivates an ein PBP. Die PBP/Ampicillin-Konjugate werden durch eine SPR-Biosensor-Analyse mit Markermolekül-spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Verschiedene PBP, markierte Ampicillin-Derivate und Markermolekül-spezifische Antikörper wurden untersucht, um  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-Rückstände im Konzentrationsbereich der innerhalb der EU festgelegten Rückstandshöchstmengen (MRL-Werte) nachzuweisen. PBP wurden zum einen aus den solubilisierten Membranproteinen von *Streptococcus thermophilus* und *Bacillus stearothermophilus* mittels Ampicillin-Affinitätschromatographie isoliert. Zum anderen wurde ein lösliches PBP 2x-Derivat aus *Streptococcus pneumoniae* (PBP 2x\*) als rekombinantes Protein in *Escherichia coli* überexprimiert. Aufgrund der höheren Affinitäten gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika wurde das PBP 2x\* als biomolekularer Erkennungspartner für die SPR-Biosensor-Analysen eingesetzt.

Ampicillin (AMPI) wurde mit Digoxigenin- (DIG), 2,4-Dinitrophenyl- (DNP) und Fluorescein-Derivaten (FLU) markiert. Als Markermolekül-spezifische Antikörper wurden verschiedene polyklonale und monoklonale DIG-, DNP- und FLU-spezifische Antikörper untersucht. Von den PBP 2x\*/Ampicillin-Konjugaten konnte durch die SPR-Biosensor-Analyse nur das PBP 2x\*-Konjugat mit DIG-markiertem Ampicillin (DIG-AMPI) und einem monoklonalen DIG-spezifischen Antikörper mit ausreichender Sensitivität und Reproduzierbarkeit bestimmt werden.

Milch-Proben wurden in einem ersten Reaktionsschritt mit einer definierten Menge PBP 2x\* versetzt. Anschließend wurde DIG-AMPI zugegeben, ein bifunktionelles Molekül, das sowohl von PBP 2x\* als auch von DIG-spezifischen Antikörpern gebunden wird. Der Reaktionsansatz mit PBP 2x\* und DIG-AMPI wurde mittels SPR-Biosensor analysiert, wobei auf dem Sensor-Chip die DIG-spezifischen Antikörper immobilisiert waren. In Rückstands-negativen Proben haben die PBP 2x\*-Moleküle ausschließlich DIG-AMPI-Moleküle gebunden und die entstandenen PBP 2x\*/DIG-AMPI-Konjugate (Molekulargewicht > 78 kDa) wurden in der

SPR-Biosensor-Analyse über den DIG-Marker von den immobilisierten Antikörpern gebunden. In Rückstands-positiven Proben haben die PBP 2x\*-Moleküle in dem ersten Reaktionsschritt die vorhandenen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-Rückstände gebunden, so dass für die DIG-AMPI-Moleküle weniger PBP 2x\*-Moleküle zur Verfügung standen und nach dem zweiten Reaktionsschritt überschüssige DIG-AMPI-Moleküle (Molekulargewicht < 1 kDa) vorhanden waren. Deshalb haben die immobilisierten DIG-spezifischen Antikörper in der SPR Biosensor-Analyse Rückstands-positiver Proben mehr freie DIG-AMPI-Moleküle als PBP 2x\*/DIG-AMPI-Konjugate gebunden.

Da die Signalhöhe in einer SPR-Biosensor-Analyse von dem Molekulargewicht der gebundenen Moleküle abhängig ist, lieferten die Rückstands-negativen Proben ein größeres Detektorsignal als die Rückstands-positiven Proben.

Benzylpenicillin, Ampicillin, Amoxicillin, Cloxacillin, Cephalexin und Cefoperazon konnten mit diesen Reagenzien (PBP 2x\*, DIG-AMPI und monoklonaler DIG-spezifischer Antikörper) in entfetteter Vollmilch und Rohmilch unterhalb der für diese  $\beta$ -Lactam-Antibiotika festgesetzten Rückstandshöchstmenge nachgewiesen werden. Die Analyse von individuellen Rohmilch-Proben von 20 Kühen bestätigte die Erfahrung, dass die unspezifische Bindung von Matrix-Komponenten an den Sensor-Chip ein kritischer Faktor ist, der die Nachweisgrenze eines SPR-Biosensor-Assays erhöhen kann. Die Matrixinterferenzen konnten durch eine Hitze-Behandlung und die Zugabe von Carboxymethyldextran zu den analysierenden Proben auf ein konstantes und niedriges Niveau reduziert werden. Mit dieser Probenvorbereitung konnte Benzylpenicillin auch in den individuellen Rohmilch-Proben an der festgesetzten Rückstandshöchstmenge nachgewiesen werden.

## 9 Arbeitsvorschriften

### 9.1 Partielle Aufreinigung der DD-Carboxypeptidasen

PBP wurden mit einigen Modifikationen in Anlehnung an Blumberg und Strominger<sup>276</sup> mittels Penicillin-Affinitätschromatographie aus den Membranen Gram-positiver Bakterien isoliert.

#### Materialien und Geräte

Brutschrank (Typ BK 5060 E, Heraeus, Hanau)

French Pressure Cell Press (American Instrument Company, Silver Spring, Maryland, USA)

2-Liter-Schikanen-Kolben (Roth, Karlsruhe)

Impföse (Roth, Karlsruhe)

Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Typ L7-55, Krefeld)

HiTrap-NHS-Säulen (Amersham Biosciences, Freiburg)

Einwegspritzen 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml (Roth, Karlsruhe)

Dialyseschlauch, Ausschlussgröße 12-14 kDa (Medicell International, USA)

Zentrifugen-Filtereinheiten (Centriprep 10, Millipore, Schwalbach)

#### Reagenzien

Triton X-100 (Sigma, Taufkirchen)

Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA) (Sigma, Taufkirchen)

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Fluka, Taufkirchen)

Hydroxylamin (Fluka, Taufkirchen)

Di-Natriumhydrogenphosphat (Roth, Karlsruhe)

Kaliumdihydrogenphosphat (Roth, Karlsruhe)

Natriumchlorid (Fluka, Taufkirchen)

Salzsäure (Roth, Karlsruhe)

Reinstwasser (Reinstwasseranlage Milli Q, Millipore, Eschborn)

Deoxyribonuclease (DNase) (Sigma, Taufkirchen)

Ribonuclease (RNase) (Fluka, Taufkirchen)

#### Bakterienstämme

DD-Carboxypeptidasen wurden aus *Streptococcus thermophilus* DS 224 (DSM Food Specialties, Dortmund) und *Bacillus stearothermophilus* DSM 3299 (DSMZ, Braunschweig) isoliert.

Nährmedien

Nutrient-Agar mit 10 mg/l  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ :

Pepton aus Fleisch (Roth, Karlsruhe)	5 g
Fleischextrakt (Roth, Karlsruhe)	3 g
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Fluka, Taufkirchen)	0,01 g
Agar (Roth, Karlsruhe)	15 g
Wasser	1 l

2xNutrient-Broth:

Pepton aus Fleisch	10 g
Fleischextrakt	6 g
Wasser	1 l

M17-Broth (Oxoid, Wesel):

Trypton	5 g
Sojapepton	5 g
Lab-Lemco powder	5 g
Ascorbinsäure	0,5 g
Dinatriumglycerophosphat	19 g
Magnesiumsulfat	0,25
Hefeextrakt	2,5 g
pH	$6,9 \pm 0,2$

M17-Broth mit 1 % Lactose:

37,25 g M 17-Broth wurden in 950 ml Wasser gelöst und wie unten beschrieben autoklaviert. Nach Abkühlung auf 50 °C wurden 50 ml einer separat autoklavierten 20 %-igen Lactoselösung zugegeben.

Alle verwendeten Nährmedien wurden 16 Minuten bei 121 °C und 1,2 bar autoklaviert.

Stammhaltung

*Streptococcus thermophilus* wurde in M17-Broth mit 1 % Lactose bei 42 °C im Brutschrank ohne Belüftung kultiviert. Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden 0,7 ml einer stationären Kultur mit 0,3 ml Glycerin vermischt und bei -80 °C gelagert.

*Bacillus stearothermophilus* wurde in 2xNutrient-Broth bei 60 °C im Schüttelwasserbad bei 250 rpm in Schikanenkolben kultiviert. Als Inoculum wurde eine Sporensuspension, die zuvor 10 Minuten in kochendem Wasser aktiviert wurde, verwendet. Zur Herstellung der Sporensuspension wurde *Bacillus stearothermophilus* drei Tage auf Schrägagarröhrchen (Nutrient-Agar mit 10 mg/ml  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ) bei 55 °C im Trockenschrank kultiviert. Die Kolonien wurden mit sterilem Wasser abgeschwemmt und anschließend dreimal mit sterilem Wasser gewaschen. Die wässrige Sporensuspension wurde bei 4 °C gelagert.

#### Isolierung der Membran-Fraktion und Solubilisierung der Membranproteine

Acht Liter M 17-Broth mit 1 % Lactose wurden mit 800 ml einer über Nacht angezogenen Vorkultur von *Streptococcus thermophilus* angeimpft. Die Zellen wurden bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase ( $\text{OD}_{600}$  0,8 - 1,0) inkubiert und anschließend durch Zentrifugation (20 Minuten, 6.000 x g) sedimentiert. Die sedimentierten Zellen wurden einmal mit eiskaltem PBS (10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 116 mM NaCl; pH 7,2) gewaschen und durch Zentrifugation (20 Minuten, 6.000 x g) gesammelt. Die Zellen wurden in 35 ml eiskaltem PBS suspendiert und über Nacht bei -20 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurde die Suspension mit PMSF\* (Endkonzentration 1 mM), EDTA (Endkonzentration 1 mM) und einigen Kristallen DNase und RNase versetzt. Anschließend wurden die Zellen durch vier French Press-Zyklen bei 18.000 psi aufgeschlossen und danach 30 Minuten auf Eis gestellt. Nicht aufgeschlossene Zellen sowie die Debris-Fraktion wurden durch Zentrifugation (30 Minuten, 6.000 x g bzw. 20 Minuten 19.000 x g) abgetrennt. Die Membran-Fraktion wurde durch Ultrazentrifugation (1 h, 100.000 x g) sedimentiert.

Das erhaltene Membran-Pellet wurde in 15 ml PBS suspendiert und die Membranproteine über Nacht durch Zugabe von 2 % (w/v) Triton X-100 in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,2 mit 500 mM NaCl solubilisiert. Das Verhältnis von Protein zu Detergenz betrug 1:5 (w/w).

Zur Isolierung der solubilisierten Membranproteine aus *Bacillus stearothermophilus* wurden Zellen, die in 1,5 l 2xNutrient-Broth bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase ( $\text{OD}_{600}$  0,8 - 1,0) kultiviert wurden, eingesetzt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie in diesem Abschnitt beschrieben.

#### Ampicillin-Affinitätschromatographie

Die Ampicillin-Affinitätschromatographie wurde in Anlehnung an Nicholas *et al.*<sup>277</sup> durchgeführt. Ampicillin wurde über dessen Aminogruppe an NHS-aktivierte Sepharose (HiTrap NHS-Säulen, Säulenvolumen 1 ml) nach Herstellerangaben (Amersham Biosciences) gebunden. Sämtliche Lösungen wurden mit 2 ml oder 10 ml Einwegspritzen mit einer maxima-

---

\* Da PMSF hydrolyseempfindlich ist, wurde die Stammlösung (100 mM) in DMSO angesetzt.

len Geschwindigkeit von 0,5 Tropfen/sec durch die Säule gedrückt. Abschließend wurde die Säule mit acht Säulenvolumina Waschpuffer (50 mM Phosphatpuffer pH 7,2 mit 1 M NaCl und 0,1 % Triton X-100) konditioniert.

Die solubilisierten Membranproteine wurden vor der Affinitätschromatographie mittels Centriprep 10 auf ein Volumen von ca. 9 ml aufkonzentriert und in 1 ml-Portionen auf die Säule gegeben. Nach jedem ml wurde der Fluss gestoppt und die Säule 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Aufgabe des gesamten Volumens wurde die Säule mit sechs Säulenvolumina Waschpuffer gespült, um am Säulenmaterial unspezifisch adsorbierte Proteine zu entfernen. Die PBP wurden mit 1 ml Elutionspuffer (0,8 M neutralisiertes Hydroxylamin, 0,5 M NaCl und 1 % Triton X-100 in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,2) eluiert. Die Säule wurde nach Aufgabe des Elutionspuffers 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die PBP/Ampicilloyl-Konjugate zu spalten. Die Elution wurde zweimal wiederholt. Zuletzt wurde die Säule mit 1 ml Waschpuffer gewaschen. Die Eluate und die Waschfraktion wurden gepoolt und über Nacht gegen fünf Liter PBS mit 0,1 % Triton X-100 dialysiert.

### 9.1.1 DD-Carboxypeptidase-Aktivitäts-Assays

Die DD-Carboxypeptidase-Aktivität wurde in Anlehnung an Granier *et al.*<sup>278</sup> bestimmt. Anstelle von 2,2'-Azinodi(3-ethylbenzthiazolinsulfonat) (ABTS) wurde Tetramethylbenzidin (TMB) als chromogenes Substrat für die Meerrettichperoxidase eingesetzt (TMB-Assay). Daneben wurde der Assay nicht in Küvetten durchgeführt, sondern auf Mikrotiterplatten übertragen. Alternativ wurde die DD-Carboxypeptidase-Aktivität nach Gutheil *et al.*<sup>250</sup> mit Amplex-Red als fluoreszierendes Meerrettichperoxidase-Substrat (Amplex-Red-Assay) bestimmt. Abweichend von der Originalvorschrift wurde der Assay nicht in Mikrotiterplatten sondern in Mikroküvetten (500 µl) durchgeführt.

#### TMB-Assay

##### Materialien und Geräte

96-Loch-Mikrotiterplatten (Roth, Karlsruhe)

Mikrotiterplattenreader (Bio Rad Model 680, Bio Rad, München)

##### Reagenzien

Citronensäure-Monohydrat (Fluka, Taufkirchen)

Kaliumhydroxid (Fluka, Taufkirchen)

Benzylpenicillin, Kaliumsalz (Fluka, Taufkirchen)

Cloxacillin, Natriumsalz (Fluka, Taufkirchen)

D-Aminosäureoxidase, Suspension 5 mg Protein pro ml Ammoniumsulfat-Lösung (Sigma, Taufkirchen)



Flavinadenindinucleotid (FAD) (Fluka, Taufkirchen)  
 Meerrettichperoxidase (HRP), Typ VI A (Sigma, Taufkirchen)  
 Wasserstoffperoxid 30 % (Fluka, Taufkirchen)  
 Schwefelsäure (Roth, Karlsruhe)  
 Tetramethylbenzidin (TMB) (Sigma, Taufkirchen)  
 D-Alanin (Sigma, Taufkirchen)  
 Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) (Serva, Heidelberg)  
*N* $\alpha$ ,*N* $\epsilon$ (Acetyl)<sub>2</sub>-L-Lys-D-Ala-D-Ala (Ac<sub>2</sub>-KAA) (Bachem, Heidelberg)  
*N* $\alpha$ (Acetyl)-L-Lys-D-Ala-D-Ala (Ac-KAA) (Bachem, Heidelberg)

### Lösungen

HRP: 250  $\mu$ g/ml in Reinstwasser

FAD: 100  $\mu$ g/ml in 100 mM TRIS-HCl pH 8,0

TMB: 50 mg in 10 ml (Aceton/Methanol) (1/9; v/v)

PBS: 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,3

0,21 mol/l Citratpuffer pH 4,0:

4,4 g Citronensäuremonohydrat

30 ml 1 M KOH

70 ml Reinstwasser

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Assay-Lösung:

Citratpuffer : TMB : HRP, 100 : 1 : 1 (v/v/v)

Enzym-Coenzym-Lösung:

FAD : D-Aminosäureoxidase, 30 : 1 (v/v)

Ac<sub>2</sub>-KAA oder Ac-KAA: 12 mg/ml in PBS

D-Alanin-Standardlösungen: 80  $\mu$ g/ml, 40  $\mu$ g/ml, 20  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml und 5  $\mu$ g/ml in PBS

2 M Schwefelsäure

Benzylpenicillin, Kaliumsalz: 200 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,3 ng/ml  
 und 3,1 ng/ml in PBS

### Assay-Durchführung

Der DD-Carboxypeptidase-Aktivitäts-Assay wurde in 96-Loch-Mikrotiterplatten bei 37 °C entsprechend den unten aufgeführten Pipettierschemata durchgeführt. Zur Kontrolle, ob die Bestimmung im linearen Bereich war, wurden D-Alanin-Standardlösungen vermessen. Nachdem die enzymatischen Reaktionen durch Schwefelsäure gestoppt wurden, wurden die Extinktionen mit dem Mikrotiterplattenreader bei 450 nm gemessen.

**DD-Carboxypeptidase-Aktivität:**

Volumen [ $\mu\text{l}$ ]	Lösung	Inkubationszeit [Minuten]
40	PBS	
10	DD-Carboxypeptidase	15
10	Ac <sub>2</sub> -KAA	30
10	Enzym-Coenzym-Lösung	10
80	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Assay-Lösung	10
50	2 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2

**Verbleibende DD-Carboxypeptidase-Aktivität nach Inhibierung:**

Volumen [ $\mu\text{l}$ ]	Lösung	Inkubationszeit [Minuten]
40	$\beta$ -Lactam-Antibiotikum	
10	DD-Carboxypeptidase	15
10	Ac <sub>2</sub> -KAA	30
10	Enzym-Coenzym-Lösung	10
80	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Assay-Lösung	10
50	2 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2

**Reagenzien-Leerwert:**

Volumen [ $\mu\text{l}$ ]	Lösung	Inkubationszeit [Minuten]
40	PBS	
10	DD-Carboxypeptidase	15
10	PBS	30
10	Enzym-Coenzym-Lösung	10
80	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Assay-Lösung	10
50	2 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2

**D-Alanin-Standardlösungen:**

Volumen [ $\mu$ l]	Lösung	Inkubationszeit [Minuten]
50	D-Alanin	15
10	PBS	30
10	Enzym-Coenzym-Lösung	10
80	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Assay-Lösung	10
50	2 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2

**Amplex-Red-Assay****Materialien und Geräte**

1 cm Fluoreszenz-Mikroküvetten (500  $\mu$ l) (Hellma, Müllheim/Baden)

Fluorimeter (Typ SFM 25, Kontron, Zürich)

Reaktionsgefäße aus Polypropylen, 1,5 ml (Roth, Karlsruhe)

**Reagenzien**

Amplex-Red (Mebitec, Göttingen)

Flavinadenindinucleotid (FAD) (Fluka, Taufkirchen)

D-Aminosäureoxidase, Suspension 5 mg Protein pro ml Ammoniumsulfat-Lösung und 15 U pro mg Protein (Sigma, Taufkirchen)

Meerrettichperoxidase (HRP), Typ X, 5 mg Protein pro ml, 15 U pro mg Protein (Sigma, Taufkirchen)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Fluka, Taufkirchen)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) (Serva, Heidelberg)

Benzylpenicillin, Kaliumsalz (Fluka, Taufkirchen)

Cloxacillin, Kaliumsalz (Fluka, Taufkirchen)

*N* $\alpha$ ,*N* $\epsilon$ (Acetyl)<sub>2</sub>-L-Lys-D-Ala-D-Ala (Ac<sub>2</sub>-KAA) (Bachem, Heidelberg)

D-Alanin (Sigma, Taufkirchen)

**Lösungen**

Amplex-Red: 5 mg/ml in DMSO

Ac<sub>2</sub>-KAA: 12 mg/ml

FAD: 200  $\mu$ g/ml in 100 mM TRIS-HCl pH 8,0

Benzylpenicillin-Stopplösung: 100  $\mu$ g/ml in PBS

Benzylpenicillin-Standardlösungen: 200 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,3 ng/ml und 3,1 ng/ml in PBS

D-Alanin-Standardlösungen: 535 ng/ml, 446 ng/ml, 356 ng/ml, 267 ng/ml, 179 ng/ml, 89 ng/ml und 45 ng/ml in PBS

D-Alanin-Detektionsreagenz:

10 µl Amplex-Red

100 µl FAD

20 µl D-Aminosäureoxidase

10 µl HRP

200 µl Benzylpenicillin-Stopplösung

ad 10 ml mit 100 mM TRIS-HCl pH 8,5

### Assay-Durchführung

Der DD-Carboxypeptidase-Aktivitäts-Assay wurde in Reaktionsgefäßen (1,5 ml) entsprechend den unten aufgeführten Pipettierschemata durchgeführt. Das D-Alanin-Detektionsreagenz enthielt Benzylpenicillin, um die DD-Carboxypeptidase nach dem zweiten Inkubationsschritt vollständig zu inhibieren und nur das bis zu diesem Zeitpunkt abgespaltene D-Alanin zu erfassen. Zur Kontrolle, ob die Bestimmung im linearen Bereich war, wurden D-Alanin-Standardlösungen vermessen.

Nach Ablauf der dritten Inkubationszeit wurden 350 µl 100 mM TRIS-HCl pH 8,5 zu den Reaktionslösungen gegeben. Die Lösungen wurden in die Mikroküvetten überführt und fluorimetrisch vermessen (Anregungswellenlänge 546 nm, Emissionswellenlänge 595 nm), wobei die relative Fluoreszenz (RFU) gegen die konzentrierteste D-Alanin-Standardlösung bestimmt wurde.

### **DD-Carboxypeptidase-Aktivität:**

Volumen [µl]	Lösung	Inkubationszeit [Minuten]*
30	PBS	
10	DD-Carboxypeptidase	15 (37 °C)
10	Ac <sub>2</sub> -KAA	30 (37 °C)
150	D-Alanin-Detektionsreagenz	75 (RT)

\*in Klammern die Temperatur, bei welcher die enzymatischen Reaktionen durchgeführt wurden.

Der Reaktionsansatz wurde nach Zugabe des D-Alanin-Detektionsreagenz bei Raumtemperatur inkubiert, da Amplex-Red hitzelabil ist.

**Verbleibende DD-Carboxypeptidase-Aktivität nach Inhibierung:**

Volumen [ $\mu$ l]	Lösung	Inkubationszeit [Minuten]
30	$\beta$ -Lactam-Antibiotikum	
10	DD-Carboxypeptidase	15 (37 °C)
10	Ac <sub>2</sub> -KAA	30 (37 °C)
150	D-Alanin-Detektionsreagenz	75 (RT)

**Reagenzien-Leerwert:**

Volumen [ $\mu$ l]	Lösung	Inkubationszeit [Minuten]
30	PBS	
10	DD-Carboxypeptidase	15 (37 °C)
10	PBS	30 (37 °C)
150	D-Alanin-Detektionsreagenz	75 (RT)

**D-Alanin-Standardlösungen:**

Volumen [ $\mu$ l]	Lösung	Inkubationszeit [Minuten]
50	D-Alanin-Standardlösung	15 (37 °C)
-	-	30 (37 °C)
150	D-Alanin-Detektionsreagenz	75 (RT)

**9.2 Expression und Aufreinigung von PBP 2x\***

PBP 2x\* wurde als Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein (GST-Fusionsprotein) in *Escherichia coli* BL21 überexpressiert. *E. coli* BL21 enthielt das Plasmid pGEX-tet-PBP 2x\*, welches das PBP 2x\*-GST-Fusionsprotein codiert, wobei das GST-Protein an das Amino-Ende des PBP 2x\* fusioniert ist. *E. coli* BL21 (pGEX-tet-PBP 2x\*) wurde freundlicherweise von Frau Prof. Regine Hakenbeck (Universität Kaiserslautern) zur Verfügung gestellt. Auf dem Plasmid befindet sich zwischen den GST- und PBP-codierenden Genen eine Nucleotidsequenz, welche eine Aminosäuresequenz codiert, die von einer spezifischen Protease (Prescission-Protease, Amersham Biosciences, Freiburg) gespalten wird<sup>259</sup>. Dies bietet den Vorteil, dass das GST-Protein vom intakten Fusionsprotein nach affinitätschromatographischer Aufreinigung abgespalten werden kann und das PBP 2x\* freigesetzt wird.

Materialien und Geräte

Inkubator-Schüttler (Typ Innova 4000, New Brunswick Scientific, New Jersey, USA)

2-L-Schikanenkolben (Roth, Karlsruhe)

Glassäule (1 x 10 cm) mit Luer-Lock-Anschluss und Flussadapter (Sigma, Taufkirchen)

Peristaltische Pumpe (Typ 2232, LKB/Bromma, Schweden)

0,22 µm Spritzenfilter, steril (Roth, Karlsruhe)

Reagenzien

Glutathion-Agarose (Sigma, Taufkirchen) oder Glutathion-Sepharose (Amersham Biosciences, Freiburg)

Reduziertes Glutathion (Fluka, Taufkirchen)

Prescission-Protease (Amersham Biosciences, Freiburg)

Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) (Roche Applied Science, Mannheim)

Dithiothreitol (DTT) (Sigma, Taufkirchen)

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Fluka, Taufkirchen)

Deoxyribonuclease (DNase) (Sigma, Taufkirchen)

Ribonuclease (RNase) (Fluka, Taufkirchen)

Tetracyclin (Sigma, Taufkirchen)

Reinstwasser (Reinstwasseranlage Milli Q, Millipore, Eschborn)

Nährmedium

2xTY-Medium mit 15 mg/l Tetracyclin:

Zusammensetzung:	
Trypton (Roth, Karlsruhe)	16 g
Hefeextrakt (Roth, Karlsruhe)	10 g
NaCl (Fluka, Taufkirchen)	5 g
Wasser	1 l

Das Nährmedium wurde 16 Minuten bei 121 °C und 1,2 bar autoklaviert. Nach Abkühlung auf 50 °C wurden zu dem Medium 10 ml einer sterilfiltrierten Tetracyclin-Lösung (1,5 mg/ml in Methanol/Wasser (1/9; v/v) gegeben.

### Plasmid pGEX-tet-PBP 2x\*<sup>279</sup>

Das Plasmid pGEX-tet-PBP 2x\* wurde von Shwan Rachid im Arbeitskreis von Frau Prof. Regine Hakenbeck hergestellt. Das PBP 2x\*-Gen wurde aus dem Plasmid pCG31<sup>258</sup> mittels PCR amplifiziert. pCG31 codiert ein PBP 2x-Derivat ohne das Transmembranpeptid ( $\Delta$  Aminosäuren 19 - 48)<sup>258</sup>. Das PCR-Produkt wurde zunächst in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy (Promega, Mannheim) ligiert. Die korrekte DNA-Sequenz wurde anschließend in einen modifizierten Expressionsvektor pGEX-6P-1 (Amersham Biosciences, Freiburg) kloniert. Das pGEX-6P-1-Derivat enthielt ursprünglich ein  $\beta$ -Lactamase-Gen, so dass transformierte Klone mit Ampicillin selektiert werden konnten. Das birgt jedoch das Risiko, dass bereits während der Expression PBP und Ampicillin ein Konjugat bilden. Bei der anschließenden Aufreinigung würde auch dieses Konjugat, welches keine weiteren  $\beta$ -Lactame binden kann, isoliert. Um  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in einem PBP-exprimierenden Klon zu vermeiden, wurde die Tetracyclin-Resistenzkassette aus pBR322 mit Oligonucleotiden, die *Pst*I- und *Not*I-Enden enthielten, amplifiziert und in das mit *Pst*I und *Not*I verdaute pGEX-6P-1 geklont. Dadurch wurde das  $\beta$ -Lactamase-Gen inaktiviert. Das resultierende Plasmid wurde pGEX-tet-PBP 2x\* genannt, in *E. coli* BL21 transformiert und die Klone konnten mit Tetracyclin selektiert werden. Durch die Inaktivierung des  $\beta$ -Lactamase-Gens bzw. der Möglichkeit mit Tetracyclin selektieren zu können, konnte dieses Problem umgangen werden.

### Expression und Aufreinigung

*E. coli* BL21 (pGEX-tet-PBP 2x\*) wurde in insgesamt 1,5 l 2xTY-Medium mit 15 mg/l Tetracyclin bei 37 °C und 250 rpm in 2 l Schikanenkolben kultiviert, wobei 10 ml einer Übernachtskultur in 500 ml frischem 2xTY-Medium mit 15 mg/l Tetracyclin verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 angezogen wurden. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert und die Zellen weitere drei Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (20 Minuten, 6.000 x g) sedimentiert. Die sedimentierten Zellen wurden einmal mit eiskaltem PBS (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl; pH 7,3) gewaschen und wieder durch Zentrifugation (20 Minuten, 6.000 x g) gesammelt. Die Zellen wurden über Nacht bei 20 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in 20 ml PBS mit 2 mM PMSF, 5 mM Dithiothreitol, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und einigen Kristallen DNase und RNase suspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch drei French Press-Zyklen bei 18.000 psi aufgeschlossen. Nach Zentrifugation bei 4.700 x g für 10 Minuten und 30.000 x g für 15 Minuten wurde das GST-PBP 2x\*-Fusionsprotein aus diesem Rohextrakt mittels Glutathion-Affinitätschromatographie aufgereinigt.

Die Glutathion-Affinitätschromatographie wurde bei Raumtemperatur in einer Glassäule mit 5 ml Glutathion-Agarose oder Glutathion-Sepharose und einer peristaltischen Pumpe durch-

geführt. Nachdem das Säulenmaterial mit zehn Säulenvolumina PBS konditioniert worden war (Fluss 0,4 ml/Minute), wurde der Rohextrakt über die Säule gegeben (Fluss 0,4 ml/Minute). Anschließend wurde das Säulenmaterial mit zehn Säulenvolumina PBS gewaschen (Fluss 2 ml/min). Das GST-PBP 2x\*-Fusionsprotein wurde mit 10 ml 10 mM reduziertem Glutathion in 50 mM TRIS-HCl pH 8 eluiert, wobei der erste ml verworfen wurde. Die restlichen 9 ml Eluat (Proteingehalt 9 mg) wurden mit 1 ml Protease-Puffer 1 (0.5 M Tris, 1,5 M NaCl, 10 mM EDTA und 10 mM Dithiothreitol; pH 7.0) und 200 Units Prescission-Protease versetzt und für 24 h bei 4 °C inkubiert, um das GST-Protein vom PBP 2x\* abzuspalten. Der Verdau wurde anschließend gegen 5 l Protease-Puffer 2 (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA und 1 mM Dithiothreitol; pH 7.0) für 24 h dialysiert.

Bei der Prescission-Protease handelt es sich ebenfalls um ein GST-Fusionsprotein, so dass GST-Protein und Prescission-Protease gemeinsam durch einen zweiten Affinitätschromatographischen Schritt entfernt werden konnten.

Diese zweite Glutathions-Affinitätschromatographie wurde im Batch-Verfahren mit 1 ml Glutathion-Agarose durchgeführt. Das PBP 2x\* befand sich dabei in der nicht-adsorbierten Fraktion. Das aufgereinigte PBP 2x\* wurde nach Zugabe von Glycerin (Endkonzentration 10 %) bei -20 °C gelagert. Die Expression und die Aufreinigung des PBP wurde mittels SDS-PAGE mit 10 % Acrylamid-Gelen und Anfärbung mit Coomassie-Brillant-Blau verfolgt. Der Proteingehalt wurde nach Bradford<sup>280</sup> mit BSA als Standardprotein bestimmt und lag im Bereich von 100 bis 400 µg/ml für das PBP 2x\* und etwa 1 mg/ml für das GST-PBP 2x\*.

### 9.2.1 Bocillin FL-Assay

Der Nachweis der Penicillin-bindenden Aktivitäten der isolierten Proteine GST-PBP 2x\* und PBP 2x\* erfolgte mit Bocillin FL<sup>261</sup> und Gelfiltrationschromatographie mit nachfolgender Fluoreszenzdetektion.

#### Materialien

HPLC-Vials aus Glas mit Mikroeinsätzen (CS – Chromatographie Service, Langerwehe)

#### Chromatographisches System

Merck Hitachi LaChrom-HPLC-System (VWR International, Darmstadt):

- Pumpe Typ L-7100
- Autosampler Typ L-7250
- Fluoreszenzdetektor Typ L-7485
- Integrator Typ D-7500



Analytische Trennsäulen:

Zorbax GF 250 (250 x 9,4 mm, 4  $\mu$ m, 150 Å) (Agilent, Waldbronn)

Phenomenex Biosep S 2000 (300 x 7,8 mm, 5  $\mu$ m, 145 Å) (Phenomenex, Aschaffenburg)

Lösungsmittel:

Acetonitril HPLC-grade (Roth, Karlsruhe)

### Reagenzien

di-Natriumhydrogenphosphat (Sigma, Taufkirchen)

Kaliumdihydrogenphosphat (Fluka, Taufkirchen)

Bocillin FL (Mobitec, Göttingen)

Benzylpenicillin, Kaliumsalz (Fluka, Taufkirchen)

### Lösungen

Bocillin FL 1mg/ml in DMSO

Benzylpenicillin 1  $\mu$ g/ml in PBS

100 mM Phosphat-Puffer pH 6,8

### **GST-PBP 2x\***

GST-PBP 2x\* (5  $\mu$ l Eluat 1 Glutathion-Affinitätschromatographie) wurde in einem Reaktionsgefäß (1,5 ml) mit 10  $\mu$ l PBS verdünnt. Nach Zugabe von 30  $\mu$ l Bocillin FL (4  $\mu$ g/ml in PBS) wurde die Lösung erneut für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Spezifität der Bindung wurde mit einem nicht-kompetitiven Inhibierungsassay überprüft. Dafür wurde zum GST-PBP 2x\* anstelle von PBS eine Benzylpenicillin-Lösung (1  $\mu$ g/ml in PBS) gegeben.

Die Ansätze wurden mit 100  $\mu$ l PBS verdünnt und 50  $\mu$ l mittels Gelfiltrationschromatographie analysiert. Die chromatographische Trennung erfolgte unter den nachfolgend aufgeführten Bedingungen:

Säule	:	Zorbax GF 250
Eluent	:	Acetonitril/100 mM Phosphat-Puffer pH 6,8 (20/80, v/v)
Fluss	:	1,5 ml/Minute
Druck	:	80 bar
Detektionswellenlänge	:	$\lambda_{\text{Ex}}$ 480 nm, $\lambda_{\text{Em}}$ 520 nm

**PBP 2x\***

Das nach 9.2 isolierte PBP 2x\* wurde in PBS auf eine Proteinkonzentration von 20 µg/ml verdünnt. 20 µl dieser verdünnten Lösung wurden in einem Reaktionsgefäß (1,5 ml) mit 20 µl PBS verdünnt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Zugabe von 20 µl Bocillin FL (2 µg/ml in PBS, entspricht 60 pmol Bocillin FL, Molekulargewicht Bocillin FL 661,46 g/mol) wurde die Lösung erneut für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Spezifität der Bindung wurde mit einem nicht-kompetitiven Inhibierungssassay überprüft. Dafür wurde zum PBP 2x\* anstelle von PBS eine Benzylpenicillin-Lösung (1 µg/ml in PBS) gegeben. Die Ansätze wurden mit 60 µl PBS verdünnt und 50 µl mittels Gelfiltrationschromatographie analysiert.

Die chromatographische Trennung erfolgte mit den nachfolgend aufgeführten Bedingungen:

Säule	:	Biosep S 2000
Eluent	:	Eluent A: 100 mM Phosphat-Puffer pH 6,8 Eluent B: Acetonitril 0 – 10 Minuten 100 % A 10 – 12 Minuten 50 % A 12 – 30 Minuten 50 % A 30 – 32 Minuten 100 % A 32 – 45 Minuten 100 % A
Fluss	:	1 ml/Minute
Druck	:	40 bar
Detektionswellenlänge	:	$\lambda_{\text{Ex}}$ 480 nm, $\lambda_{\text{Em}}$ 520 nm

Die Konzentration an aktiven PBP 2x\* wurde in Anlehnung an die von Jamin *et al.*<sup>256</sup> beschriebene „active site titration“ mit einem nicht-kompetitiven Assay mit Ampicillin und Bocillin FL bestimmt. PBP 2x\* (10 µl, 39 µg/ml) wurde mit verschiedenen Mengen Ampicillin (24 pmol, 12 pmol, 6 pmol, 3 pmol und 1,5 pmol in 90 µl PBS) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von Bocillin FL (60 pmol, 10 µl) wurde die verbleibende Penicillin-bindende Aktivität wie oben beschrieben bestimmt. Die Menge an aktiven PBP 2x\* wurde auf der Basis eines stöchiometrischen Komplexes zwischen PBP 2x\* und Ampicillin über die Kalibrierreihe mit Ampicillin extrapoliert.

### 9.3 Markierung von Ampicillin

Fluorescein-, Digoxigenin- und Dinitrophenyl-Derivate wurden als aktivierte *N*-Hydroxysuccinimidester an die Aminogruppe von Ampicillin gebunden.

#### Reagenzien

Fluorescein-5(6)-carbamidocaprinsäure-*N*-succinimidylester (FLU-NHS) (Fluka, Taufkirchen)

6-(2,4-dinitrophenyl)aminohexansäure-*N*-succinimidylester DNP-NHS (Mobitec, Göttingen)

Digoxigenin-3-*O*-methylcarbonyl- $\epsilon$ -aminocaprinsäure-*N*-hydroxysuccinimidester (DIG-NHS) (Roche Applied Science, Mannheim)

Fluorescein, Natriumsalz (Fluka, Taufkirchen)

Ampicillin, Natriumsalz (Fluka, Taufkirchen)

Dimethylsulfoxid (Sigma, Taufkirchen)

Dimethylformamid (Fluka, Taufkirchen)

2 mol/l Salzsäure

Ethylacetat (VWR International, Darmstadt)

Ammoniumacetat (Fluka, Taufkirchen)

Reinstwasser (Reinstwasseranlage Milli Q, Millipore, Eschborn)

#### Lösungen

Fluorescein-Standardlösungen in 25 mM Ammoniumacetat

#### Chromatographisches System

HPLC-Anlage : Merck Hitachi LaChrom-HPLC-System (VWR International, Darmstadt):

- Pumpe Typ L-7100
- Autosampler Typ L-7250
- UV/VIS-Detektor Typ L-7420
- Fluoreszenzdetektor Typ L-7485
- Integrator Typ D-7500

### 9.3.1 Fluorescein-markiertes Ampicillin

Fluorescein-markiertes Ampicillin wurde in Anlehnung an Lakaye *et al.*<sup>263</sup> synthetisiert. Abweichend davon wurden nicht die *N*-Hydroxysuccinimidester von 5(6)-Carboxyfluorescein sondern ein Gemisch der 5'- und 6'-Isomere von Fluoresceincarbamidocaprönsäure an die Aminogruppe von Ampicillin gebunden.

5 mg (13 µmol) Ampicillin wurden in 60 µl Wasser gelöst und zu 5 mg FLU-NHS (9 µmol), das zuvor in 60 µl Dimethylformamid gelöst wurde, gegeben. Der Ansatz wurde für vier Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt.

Nach Zugabe von 500 µl Wasser wurde mit 2 mol/l Salzsäure ein pH-Wert von 2,0 eingestellt und das Reaktionsprodukt mit Ethylacetat extrahiert. Ampicillin liegt bei diesem pH-Wert als Kation vor und bleibt in der wässrigen Phase. Die organische Phase wurde abgenommen und mit 1 ml Wasser versetzt. Die wässrige Phase wurde anschließend mit 1 mol/l Natronlauge auf pH 7,0 eingestellt, um die Reaktionsprodukte in die wässrige Phase zu überführen. Um die zwei Phasen vollständig zu trennen, wurde das Phasengemisch für 5 Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Danach wurde die wässrige Phase abgenommen und in Aliquots von 100 µl bei -20 °C gelagert (Stocklösung).

Der Verlauf der Synthese, die Reinheitskontrolle und die Quantifizierung von FLU-AMPI erfolgten mittels HPLC unter folgenden Bedingungen:

Säule	: Supelcosil LC308 RP 8 (Sigma, Taufkirchen) (250 x 4,6 mm, 5 µm, 300 Å)
Eluent	: Eluent A: 25 mM Ammoniumacetat Eluent B: 25 mM Ammoniumacetat/Acetonitril (70/30; v/v) A/B (50/50; v/v)
Injektionsvolumen	: 50 µl
Fluss	: 1 ml/Minute
Detektionswellenlänge	: 490 nm

Zur Identifizierung der FLU-AMPI-Peaks wurde die Stocklösung 1:1.000 verdünnt und chromatographisch analysiert. Anschließend wurden 100 µl der verdünnten Lösung mit 2 µl  $\beta$ -Lactamase-Lösung (Difco, Detroit, USA) versetzt, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und ebenfalls per HPLC untersucht. Die zwei Peaks, deren Retentionszeiten sich nach Zugabe der  $\beta$ -Lactamase verschoben, wurden FLU-AMPI zugeordnet.

Die Quantifizierung erfolgte über eine externe Kalibrierreihe mit Fluorescein, die sich über 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, 1,5 µg/ml, 2 µg/ml und 2,5 µg/ml erstreckte. Der Gehalt an FLU-AMPI (Summe beider Isomere) lag bei 3,9 mg/ml.

### Interaktion mit GST-PBP 2x\*

GST-PBP 2x\* (15  $\mu$ l, Eluat 1 Glutathion-Affinitätschromatographie) wurde in einem Reaktionsgefäß (1,5 ml) mit 10  $\mu$ l PBS verdünnt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10  $\mu$ l FLU-AMPI (4  $\mu$ g/ml in PBS) wurde die Lösung erneut für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Spezifität der Bindung wurde mit einem nicht-kompetitiven Inhibierungsassay überprüft. Dafür wurde zum GST-PBP 2x\* anstelle von PBS eine Benzylpenicillin-Lösung (1 mg/ml in PBS) gegeben. Die Ansätze wurden mit 100  $\mu$ l PBS verdünnt und 20  $\mu$ l mittels Gelfiltrationschromatographie analysiert. Die chromatographische Trennung erfolgte mit den nachfolgend aufgeführten Bedingungen:

Säule	: Biosep S 2000 (Phenomenex, Aschaffenburg)
Eluent	: 100 mM Phosphat-Puffer pH 6,8
Fluss	: 1 ml/Minute
Druck	: 40 bar
Detektionswellenlänge	: $\lambda_{\text{Ex}}$ 480 nm, $\lambda_{\text{Em}}$ 520 nm

### **9.3.2 Digoxigenin-markiertes Ampicillin**

DIG-AMPI wurde in Anlehnung an Weigel *et al.*<sup>264</sup> synthetisiert. 5 mg DIG-NHS (8  $\mu$ mol) wurden in 120  $\mu$ l Dimethylformamid gelöst und zu einer wässrigen Ampicillin-Lösung (10 mg in 120  $\mu$ l, entspricht 27  $\mu$ mol) gegeben. Der Ansatz wurde vier Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Zugabe von 500  $\mu$ l Wasser wurde DIG-AMPI mittels HPLC unter den nachfolgenden Bedingungen aufgereinigt und die entsprechende Fraktion aufgefangen.

Säule	: Supelcosil LC308 RP 8 (Sigma, Taufkirchen) (250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m, 300 Å)
Eluent	: Eluent A: 25 mM Ammoniumacetat Eluent B: 25 mM Ammoniumacetat/Acetonitril (70/30; v/v) A/B (15/85; v/v)
Injektionsvolumen	: 50 $\mu$ l
Fluss	: 1 ml/Minute
Detektionswellenlänge	: 230 nm

Um den DIG-AMPI-Peak zu identifizieren, wurde der Reaktionsansatz um den Faktor 100 in PBS und in einer PBP 2x\*-Lösung (Proteingehalt 190  $\mu$ g/ml) verdünnt und mittels HPLC analysiert. Der Peak, dessen Fläche nach Zugabe von PBP 2x\* abnahm, wurde DIG-AMPI zugeordnet. Die einzelnen Fraktionen wurden vereint und Acetonitril unter Stickstoff abge-

dampft. Die verbleibende Lösung wurde gefriergetrocknet und das aufgereinigte DIG-AMPI in 500  $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen. Diese DIG-AMPI-Stocklösung wurde in Aliquots von 50  $\mu\text{l}$  bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Konzentration an DIG-AMPI wurde mit einem nicht-kompetitiven Assay mit PBP 2x\* und Bocillin FL bestimmt, da DIG keine spezifischen Absorptionseigenschaften besitzt. PBP 2x\* (10  $\mu\text{l}$ , 5 pmol) wurde mit 90  $\mu\text{l}$  einer DIG-AMPI-Lösung (Stocklösung verdünnt um den Faktor 1.000, 5.000 und 10.000 in PBS) oder verschiedenen Mengen Ampicillin (24 pmol, 12 pmol, 6 pmol, 3 pmol und 1,5 pmol in 90  $\mu\text{l}$  PBS) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von Bocillin FL (60 pmol, 10  $\mu\text{l}$ ) wurde die verbleibende Penicillin-bindende Aktivität wie unter 9.2.1 beschrieben bestimmt ( $n = 3$ ). Die für DIG-AMPI erhaltenen Werte wurden mit denen von Ampicillin verglichen und der Gehalt an DIG-AMPI über die Kalibrierreihe mit Ampicillin extrapoliert. Die Konzentration an gebundenem Ampicillin entsprach 107  $\mu\text{g/ml}$ , was einer relativen DIG-AMPI-Konzentration von 257  $\mu\text{g/ml}$  entspricht.

### 9.3.3 Dinitrophenyl-markiertes Ampicillin

5 mg DNP-NHS (13  $\mu\text{mol}$ ) wurden in 120  $\mu\text{l}$  Dimethylsulfoxid gelöst und zu einer wässrigen Ampicillin-Lösung (15 mg in 120  $\mu\text{l}$ , entspricht 38  $\mu\text{mol}$ ) gegeben. Der Ansatz wurde vier Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Wasser wurde DNP-AMPI mittels HPLC unter den nachfolgenden Bedingungen aufgereinigt und manuell fraktioniert.

Säule	: Supelcosil LC308 RP 8 (Sigma, Taufkirchen) (250 x 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ , 300 Å)
Eluent	: Wasser/Acetonitril (70/30; v/v)
Injektionsvolumen	: 50 $\mu\text{l}$
Fluss	: 1 ml/Minute
Detektionswellenlänge	: 350 nm

Die weitere Aufreinigung und Charakterisierung erfolgte analog der Aufreinigung von DIG-AMPI.

### 9.3.4 Massenspektrometrische Analysen

#### Geräte

HPLC-Anlage:

Waters 2690 Trennmodul

Waters 2996 Photo-Dioden-Array-Detektor

Massenspektrometer:

Micromass Q-TOF Ultima API (kalibriert mit Phosphorsäure)

Steuerungs- und Auswertungssoftware: MassLynx 3.5

- Desolvation-Gas-Flow (250 L h<sup>-1</sup>)
- Temperatur (180 °C)
- Capillary-Spannung (2.800 V)
- Source-Temperatur (95 °C)
- Cone-Spannung (40 V)
- TOF-Spannung (10.150 V)

FLU-AMPI wurde mittels LC/MS mit den unter 9.3.1 aufgeführten chromatographischen Bedingungen analysiert. DIG-AMPI wurde mit einer Spritzen-Pumpe (Harvard Apparatus) in Acetonitril/Wasser (50:50, v/v) als Lösungsmittel bei einem Fluss von 5 µl/min direkt in das Massenspektrometer injiziert. Für die Kalibrierung des Massenspektrometers wurde 0,002 % Phosphorsäure in Acetonitril/Wasser (50:50, v/v) als interner Standard in das Massenspektrometer injiziert. Phosphorsäure bildet über einen großen Massen-Bereich Cluster-Verbindungen, wobei die Signale mit einer vergleichbaren Masse wie die der Analyten als Referenz-Masse verwendet werden können. Die Abweichung der bestimmten Massen von den theoretisch berechneten Massen war unter diesen Bedingungen < 5 ppm.

## 9.4 SPR-Biosensor-Analysen

### Geräte

Biacore 3000 (Biacore, Uppsala, Schweden)

Heizblock

Schüttler für Mikrotiterplatten

Zentrifuge für 1,5 ml-Reaktionsgefäße (Typ 5415C, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf)

### Materialien

96-Loch-Mikrotiterplatten (Greiner-Bio One, Alphen a/d Rijn, Niederlande)

1,5 ml-Reaktionsgefäße (Roth, Karlsruhe)

Sensor-Chips CM5 (Biacore, Uppsala, Schweden)

Zentrifugen-Filtereinheiten (YM-3, YM-10 und YM-100, Millipore, Amsterdam, Niederlande)

### Reagenzien und Lösungen

HBSEP-Puffer (10 mM 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure, 3 mM EDTA, 150 mM NaCl and 0,005% Surfactant P-20; pH 7,4) (Biacore, Uppsala, Schweden)

50 mM NaOH (Biacore, Uppsala, Schweden)

10 mM Natriumacetat pH 4,5 (Biacore, Uppsala, Schweden)

10 mM Glycin pH 2,2 (Biacore, Uppsala, Schweden)

0,5 % (w/v) SDS (Biacore, Uppsala, Schweden)

Amin-Kopplungs-Kit (Englische Produktbezeichnung „amine coupling kit“) (Biacore, Uppsala, Schweden)

Enthält:

- 100 mM *N*-Hydroxysuccinimid (NHS)

- 400 mM *N*-Ethyl-*N'*-3-dimethylaminopropylcarbodiimidhydrochlorid (EDC)

- 1 M Ethanolaminhydrochlorid (pH 8,5)

Digoxigenin-markiertes Rinderserumalbumin (eigene Herstellung)

Dinitrophenyl-markiertes Rinderserumalbumin (Novabiochem, Bad Soden)

Fluorescein-markiertes Streptavidin (Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK)

Acetonitril (Roth, Karlsruhe)

Benzylpenicillin, Kaliumsalz (Fluka, Taufkirchen)

Ampicillin, Natriumsalz (Fluka, Taufkirchen)

Cloxacillin, Natriumsalz (Fluka, Taufkirchen)

Cephalexin (Sigma, Taufkirchen)

Cefoperazon (Sigma, Taufkirchen)

Amoxicillin (Fluka, Taufkirchen)

Carboxymethyldextran, Natriumsalz (Fluka, Taufkirchen)



### Allgemeine Bedingungen

Mit Ausnahme der Milchproben wurden sämtliche Reagenzien- und Standardlösungen in HBSEP-Puffer angesetzt oder verdünnt. Die SPR-Biosensor-Analysen wurden bei einem Fluss von 5  $\mu$ l/Minute mit HBSEP-Puffer als Lauf-Puffer und einer Temperatur von 25 °C durchgeführt. Für die Konzentrationsbestimmungen wurde die Differenz zwischen den Response-Werten ( $\Delta$  Response-Werte [RU]), die 5 sec vor der Injektion und 30 sec nach der Injektion der Proben- oder Standard-Lösungen gemessen wurden, herangezogen, wobei die Biacore-Kontroll-Software die Differenz automatisch berechnete. Als Reaktionsgefäße wurden 96-Loch-Mikrotiterplatten verwendet.

#### **9.4.1 Immobilisierung der Antikörper**

Folgende Markermolekül-spezifische Antikörper (AK) wurden auf dem Sensor-Chip mit dem Amin-Kopplungs-Kit immobilisiert.

- monoklonaler Anti-Fluorescein-AK Klon F4/1 (Alexis, Grünberg)
- monoklonaler Anti-Fluorescein-AK Klon 2A3 (Acris, Hiddenhausen)
- monoklonaler Anti-Fluorescein-AK Klon DE3 (Biotrend, Köln)
- monoklonaler Anti-Digoxigenin-AK Klon 1.71.256 (Roche Applied Science, Mannheim)
- polyklonaler Anti-Digoxigenin-AK (Roche Applied Science, Mannheim)
- polyklonaler Anti-Dinitrophenyl-AK (Zytomed, Berlin)
- monoklonaler Anti-Dinitrophenyl-AK Klon SPE 7 (Sigma, Taufkirchen)

Die Antikörper wurden auf eine Konzentration von 100  $\mu$ g/ml in 10 mM Natriumacetat pH 4,5 verdünnt. Mit Ausnahme des monoklonalen Anti-Fluorescein-AK Klon F4/1 wurden 100  $\mu$ l der Antikörperlösungen zweimal mittels Zentrifugen-Filtereinheiten (Ausschlussgröße 3.000 Da) in 10 mM Natriumacetat pH 4,5 umgepuffert. Der Anti-Fluorescein-AK Klon F4/1 wurde mittels Zentrifugen-Filtereinheiten mit einer Ausschlussgröße von 100.000 Da umgepuffert, da die vom Hersteller vertriebene Stammlösung 0,1 % Rinderserumalbumin enthielt. Rinderserumalbumin besitzt ein Molekulargewicht von 66.000 Da, so dass es mit den Zentrifugen-Filtereinheiten mit der größeren Ausschlussgrenze abgetrennt werden konnte. Andernfalls wäre neben dem Antikörper auch das Rinderserumalbumin immobilisiert worden, was einen höheren Level an immobilisierten Antikörpern vorgetäuscht hätte.

Um die Sensor-Chip-Oberfläche zu aktivieren, wurden 35  $\mu$ l EDC/NHS (1:1; v/v) in einer der vier vorhandenen Flusszellen injiziert. Anschließend wurden 35  $\mu$ l der umgepufferten Antikörper-Lösung injiziert (ein Antikörper je Flusszelle) und bis zu einem Level von

10.000 - 15.000 RU immobilisiert. Nicht-reagierte NHS-Ester wurden durch Injektion von 35  $\mu$ l 1 M Ethanolamin deaktiviert.

#### 9.4.2 Ermittlung der Regenerierungsbedingungen

Da im Bioacore 3000 vier Flusszellen in Reihe verwendet werden können, konnten die Regenerierungslösungen für jede Markermolekül-Gruppe und die zugehörigen Antikörper parallel untersucht werden. Die Regenerierungsbedingungen wurden mit Fluorescein-markiertem Streptavidin, Digoxigenin-markiertem Rinderserumalbumin und Dinitrophenyl-markiertem Rinderserumalbumin ermittelt.

Digoxigenin-markiertes Rinderserumalbumin wurde gemäß Hersteller-Angaben (Roche Applied Science) zur Markierung von Proteinen mit Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- $\epsilon$ -aminocaprinsäure-*N*-hydroxysuccinimidester (DIG-NHS) hergestellt.

DIG-NHS (10  $\mu$ l, 25 mg/ml in DMSO) wurde zu einer Rinderserumalbumin-Lösung (1 ml, 1 mg/ml in 100 mM Phosphat-Puffer pH 8,0) gegeben. Die Lösung wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden Nebenprodukte und DIG-NHS, das nicht reagiert hatte, mittels Zentrifugen-Filtereinheiten (Ausschlussgröße 10.000 Da) oder Dialyse (Ausschlussgröße 10.000 Da) abgetrennt.

Für die SPR-Biosensor-Analyse wurden die markierten Proteine in HBSEP-Puffer verdünnt (10  $\mu$ g/ml) und 15  $\mu$ l zur Analyse eingesetzt. Nach der Protein-Lösung wurden 5  $\mu$ l Regenerierungslösung injiziert, wobei die nachfolgenden Lösungen untersucht wurden<sup>228,265</sup>:

- 10 mM Glycin pH 2,2
- 5 mM NaOH
- 10 mM NaOH
- 25 mM NaOH
- 50 mM NaOH
- 5 mM NaOH mit 5 % Acetonitril
- 5 mM NaOH mit 10 % Acetonitril
- 5 mM NaOH mit 5 % Methanol
- 5 mM NaOH mit 10 % Methanol
- 1. Injektion 10 mM Glycin pH 2,2, 2. Injektion 0,05 % SDS (w/v in HBSEP-Puffer)
- 1. Injektion 5 mM NaOH, 2. Injektion 0,05 % SDS (w/v in HBSEP-Puffer)

Die Regenerierung wurde als ausreichend beurteilt, wenn der Variationskoeffizient des Mittelwertes der  $\Delta$  Response-Werte von vier hintereinander durchgeführten Messungen kleiner 5 % war.

### 9.4.3 Schachbretttitrationsen

#### DIG-AMPI

Verschiedene Mengen PBP 2x\* (43 pmol, 17 pmol, 8,6 pmol und 4,3 pmol) und DIG-AMPI (28,8 pmol, 9,6 pmol, 3,2 pmol, 1,1 pmol, 0,4 pmol, 0,1 pmol und 0,04 pmol) wurden gemischt (Gesamtvolumen 100  $\mu$ l) und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 15  $\mu$ l mittels SPR-Biosensor analysiert, wobei auf dem Sensor-Chip der monoklonale Digoxigenin-spezifische Antikörper immobilisiert war (9.4.1). Die Sensor-Chip-Oberfläche wurde nach Injektion der Standardlösungen mit 5  $\mu$ l 5 mM NaOH mit 10 % Acetonitril regeneriert.

#### FLU-AMPI

Die Schachbretttitration wurde wie die DIG-AMPI-Titration mit den nachfolgenden Mengen an PBP 2x\* und FLU-AMPI durchgeführt:

PBP 2x\*: 40 pmol, 20 pmol, 10 pmol, 5 pmol, 2,5 pmol und 1,3 pmol,

FLU-AMPI: 475 pmol, 158 pmol, 53 pmol, 18 pmol, 6 pmol, 2 pmol, 0,98 pmol, 0,49 pmol, 0,24 pmol, 0,12 pmol und 0,06 pmol

Für die Regenerierung wurden zunächst 5  $\mu$ l 10 mM Glycin pH 2,2 und anschließend 5  $\mu$ l 0,05 % SDS (w/v, in HBSEP-Puffer) injiziert.

### 9.4.4 Nachweis von $\beta$ -Lactam-Antibiotika

Der Nachweis von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika erfolgte mit PBP 2x\*, DIG-AMPI und den monoklonalen Digoxigenin-spezifischen Antikörper. Die Immobilisierung der Antikörper erfolgte wie unter 9.4.1 beschrieben. Die Sensor-Chip-Oberfläche wurde nach Injektion der Proben- oder Standardlösungen mit 5  $\mu$ l 5 mM NaOH mit 10 % Acetonitril regeneriert.

### 9.4.5 Voruntersuchungen und Optimierung

100  $\mu$ l HBSEP-Puffer (Blank) oder Penicillin-Lösung (Benzylpenicillin, Ampicillin, Amoxicillin oder Cloxacillin) wurden mit 8,6 pmol PBP 2x\* (10  $\mu$ l) versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur vorsichtig geschüttelt, wobei für jedes Penicillin verschiedene Konzentrationen (33 ng/ml, 17 ng/ml, 8 ng/ml, 4 ng/ml und 2 ng/ml) eingesetzt wurden. Nach Zugabe von 1,1 pmol DIG-AMPI (10  $\mu$ l) und einem weiteren Inkubationsschritt von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden 15  $\mu$ l mittels SPR-Biosensor analysiert. Die weitere Optimierung erfolgte durch Variation der eingesetzten Mengen an PBP 2x\* (4,3 pmol) und DIG-AMPI (0,9 pmol und 0,6 pmol) sowie der injizierten Volumina (20  $\mu$ l und 25  $\mu$ l).

#### 9.4.6 Dotierung der Milch-Proben

Penicillin- und Cephalosporin-Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/ml wurden in HBSEP-Puffer (Benzylpenicillin, Ampicillin und Cloxacillin) oder HBSEP-Puffer mit 20 % Acetonitril (Amoxicillin, Cephalexin und Cefoperazon) angesetzt. Diese Lösungen wurden anschließend in HBSEP-Puffer verdünnt, um Arbeitslösungen mit einer Konzentration von 100 ng/ml für Benzylpenicillin, Ampicillin und Amoxicillin, 1.000 ng/ml für Cloxacillin und Cefoperazon und 10.000 ng/ml für Cephalexin herzustellen. Die Milch-Proben wurden in Reaktionsgefäßen aus Polypropylen mit den Arbeitslösungen bis zu den unten angegebenen Konzentrationen dotiert (Endvolumen 1 ml) und eine Stunde bei 4 °C gelagert.

#### 9.4.7 Analyse von Vollmilch

Verschiedene Chargen handelsüblicher Vollmilch mit 3,5 % Fett (pasteurisiert und homogenisiert) wurden in einem Supermarkt (Utrecht, Niederlande) gekauft und mit den nachfolgend aufgeführten Penicillinen bis zu den angegebenen Konzentrationen dotiert, die dem zweifachen, einfachen und halben MRL-Wert entsprechen:

- Benzylpenicillin, Ampicillin und Amoxicillin: 8 ng/ml, 4 ng/ml und 2 ng/ml
- Cloxacillin: 60 ng/ml, 30 ng/ml und 15 ng/ml

Blank-Vollmilch-Proben und dotierte Vollmilch-Proben wurden vor den Analysen durch Zentrifugation (14.000 g, 15 Minuten) entfettet. Anschließend wurden 10 µl PBP 2x\*-Lösung (4,3 pmol) zu 100 µl entfetteter Milch gegeben. Diese Lösungen wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur vorsichtig geschüttelt. In einem zweiten Reaktionsschritt wurden 10 µl DIG-AMPI-Lösung (0,9 pmol) zugegeben und die Lösungen erneut für 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Für die SPR-Biosensor-Analyse wurden 25 µl der vorbereiteten Milch-Proben in das System injiziert. Um die Bindung von Matrixkomponenten an den Sensor-Chip zu untersuchen, wurden entfettete Vollmilch-Proben ohne DIG-AMPI oder PBP 2x\* analysiert.

#### 9.4.8 Analyse von Rohmilch

Rohmilch wurde von der Forschungs-Farm der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Utrecht (Niederlande) zur Verfügung gestellt. Die SPR-Biosensor-Analysen wurden sowohl mit dem Rohmilchgemisch des gesamten Bestandes (24 Tiere der Rasse Holstein-Friesian) (gepoolte Rohmilch) als auch mit dem Gemelk einzelner Kühe durchgeführt. Das Rohmilch-Proben der gesamten Herde wurde wie die Vollmilch-Proben analysiert. Die gepoolten Rohmilch-Proben wurden mit den oben aufgeführten Penicillinen und zusätzlich

mit Cephalexin und Cefoperazon dotiert (Endkonzentration Cephalexin 200 ng/ml, 100 ng/ml und 50 ng/ml und Endkonzentration Cefoperazon 100 ng/ml, 50 ng/ml und 25 ng/ml).

#### **9.4.9 Analyse von Rohmilch einzelner Kühe**

Um den Einfluss von Matrixinterferenzen auf den entwickelten Assay zu untersuchen, wurden Rohmilch-Proben von 20 einzelnen Kühen untersucht. Alle Proben wurden als Blank-Proben oder nach Dotierung mit Benzylpenicillin (Endkonzentration 4 ng/ml) analysiert. Die für Vollmilch ermittelten Bedingungen konnten jedoch für Rohmilch-Proben einzelner Kühe nicht angewandt werden, da in Voruntersuchungen festgestellt wurde, dass die Bindung von Matrixkomponenten an die Sensor-Chip-Oberfläche eine Auswertung unmöglich machte. Daher wurden die Rohmilch-Proben einzelner Kühe in Anlehnung an Gustavsson<sup>244</sup> für 3 Minuten bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben für 15 Minuten bei 15.000 x g zentrifugiert und zu 100 µl entfetteter Milch wurden 4,3 pmol PBP 2x\* (10 µl) gegeben. Nach einem ersten Inkubationsschritt (15 Minuten bei Raumtemperatur) wurden 0,45 pmol DIG-AMPI (5 µl) zugegeben, wobei DIG-AMPI zuvor in HBSEP-Puffer mit 6 % Carboxymethyl-dextran (w/v) verdünnt wurde (Endkonzentration DIG-AMPI 0,1 nmol/ml). Um die unspezifische Bindung von Matrixkomponenten an den Sensor-Chip zu untersuchen, wurden entfettete Rohmilch-Proben ohne Zusatz von DIG-AMPI und PBP 2x\* analysiert.

### **9.5 Verwendete Software**

#### SPR-Biosensor-Analysen

Biacore Control Software, Version 3.1.1 (Biacore, Uppsala, Schweden)

BIAevaluation Software, Version 3.1 (Biacore, Uppsala, Schweden)

#### Grafik

Microsoft Visio Professional Version 2002 (Microsoft, Unterschleißheim)

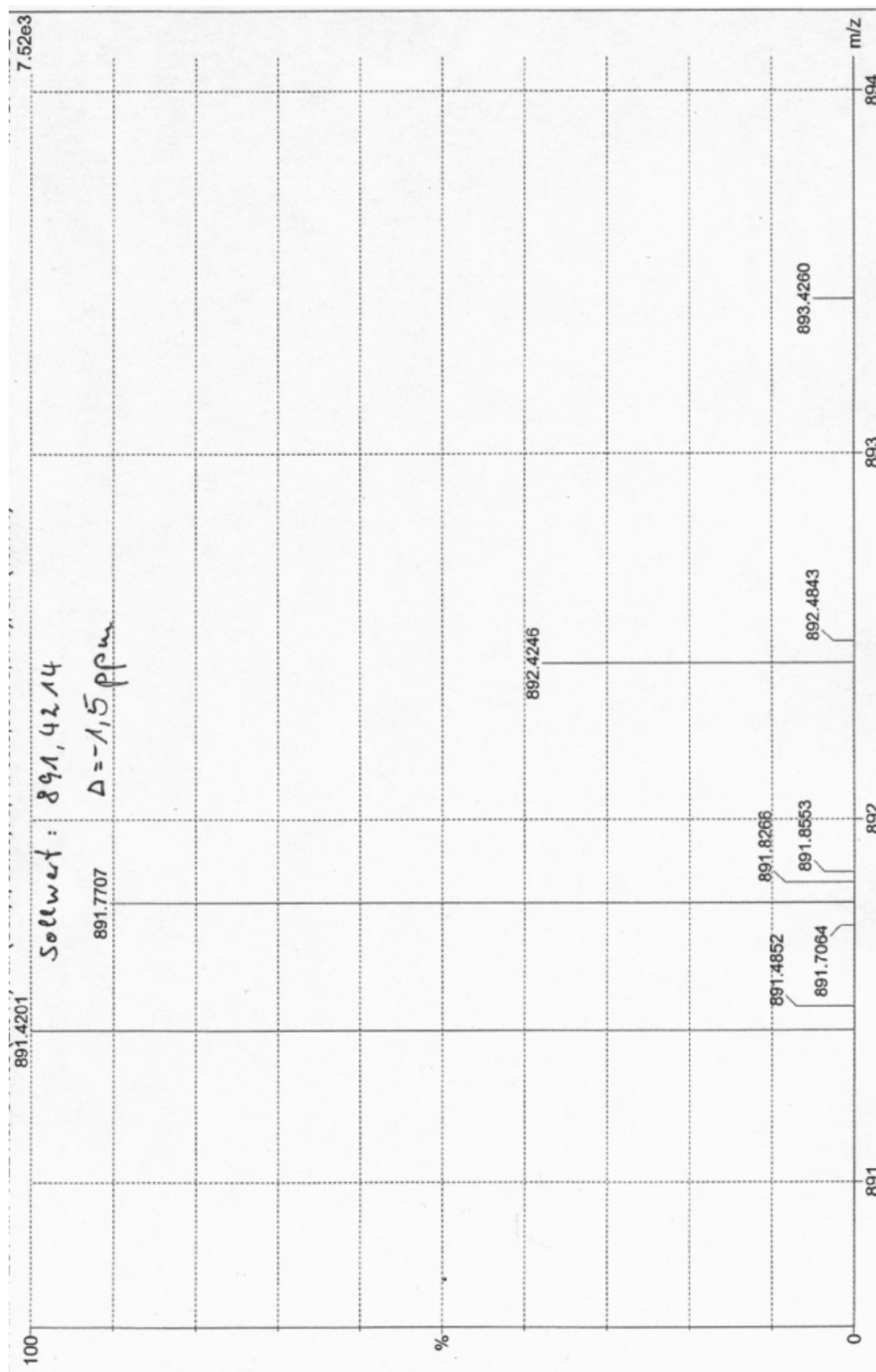
ISIS Draw Version 2.4 (MDL Information System, San Leandro, USA)

#### Datenauswertung

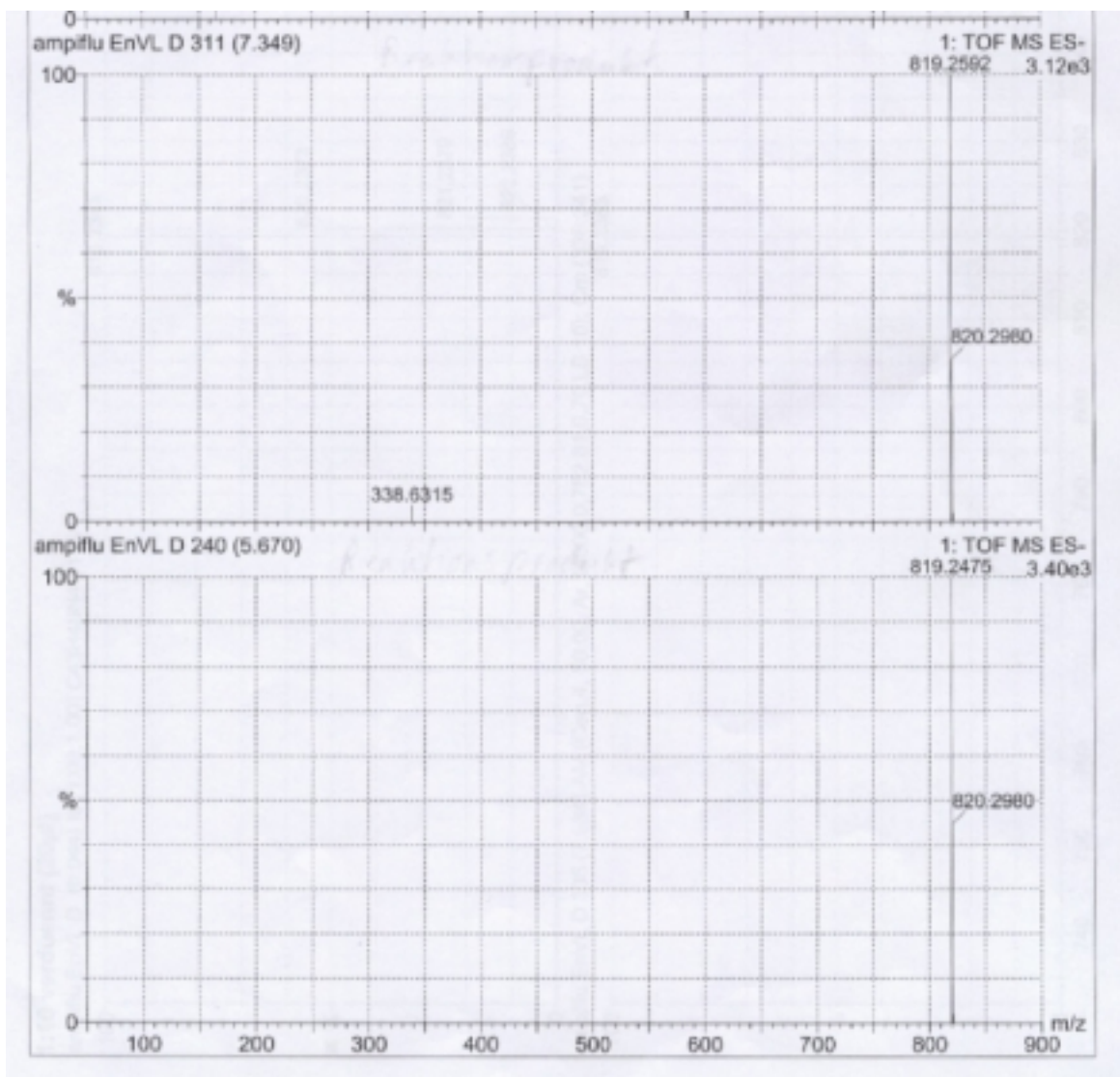
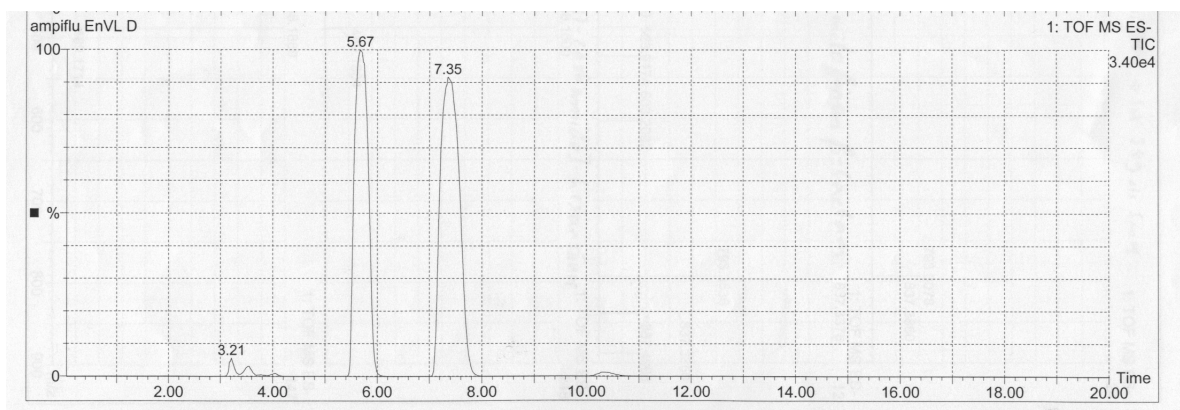
Microsoft Excel Office Version 2002 (Microsoft, Unterschleißheim)

## Anhang

Massenspektrum von DIG-AMPI



## Massenspektren von FLU-AMPI



## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AMOXI	Amoxicillin
AMPI	Ampicillin
6-APA	6-Aminopenicillansäure
API	Atmospheric pressure ionization
BlaR	Sensorprotein, das an der Induktion der $\beta$ -Lactamase in <i>Bacillus licheniformis</i> beteiligt ist
BSA	Rinderserumalbumin
CEFO	Cefoperazon
CEFTI	Ceftiofur
CEPHA	Cephalexin
CLOXA	Cloxacillin
CTD	Carboxy-terminale Domäne
CV	Variationskoeffizient
Da	Dalton
DD-CPase	DD-Carboxypeptidase
DICLOXA	Dicloxacillin
DIG	Digoxigenin
DIG-BSA	Digoxigenin-markiertes Rinderserumalbumin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Deoxyribonuclease
DNP	2,4-Dinitrophenyl
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EIA	Enzyme Immuno Assay
ESI	Electrospray ionization
FLU	Fluoresceincarbamidocaprinsäure
GST	Glutathion-S-Transferase
HBSEP	HEPES-gepufferte Kochsalz-Lösung mit EDTA und Surfactant P 20
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HMW PBP	PBP mit großem Molekulargewicht
HPLC	High performance liquid chromatography
IC	Inhibition concentration
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid



LC	Liquid chromatography
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
MG	Molekulargewicht
MRL-Wert	Maximum residue limit
MS	Massenspektrometrie
NAF	Nafcillin
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
OXA	Oxacillin
Pen G	Benzylpenicillin
Pen V	Phenoxymethylpenicillin
PBP	Penicillin-bindendes Protein
PBS	Phosphate-buffered saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Q	Quadrupol
RNase	Ribonuclease
rpm	Rounds per minute
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPR	Surface plasmon resonance
TMB	Tetramethylbenzidin
TOF	Time of flight
TQ	Triple-Quadrupol

## Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> Ungemach FR (1999) Antibiotika und Resistenzproblematik. Deutsches Tierärzteblatt 47: 224-226
- <sup>2</sup> Futtermittelverordnung vom 23.11.2000 (BGBl. I Nr.51, S. 1605), geändert durch Verordnung vom 3.4.2003 (BGBl. I S. 408)
- <sup>3</sup> Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung (ABI L 268, 29-43)
- <sup>4</sup> Mitchell JM, Griffiths MW, McEwen SA, McNab WB, Yee AJ (1998) Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. J Food Protect 61: 742-756
- <sup>5</sup> Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs vom 26.6.1990 (ABI L 224, S. 1), geändert durch Verordnung vom 28.4.2003 (ABI L 106, S. 9)
- <sup>6</sup> Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln in der Fassung vom 11.12.1998 (BGBl. I S. 3586), geändert am 19.7.2002 (BGBl. I S. 2674)
- <sup>7</sup> Goffin C, Ghuysen JM (1998) Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 1079-1093
- <sup>8</sup> Holbrook KA, Lowy FD (1998)  $\beta$ -Lactam antibiotics. Cancer Investigation 16: 405-412
- <sup>9</sup> Verbrauch von Antibiotika 1997, Quelle: FEDESA, (1998) Deutsches Tierärzteblatt 11:1093
- <sup>10</sup> Löscher W, Ungemach FR, Kroker R (2003) Grundlagen der Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. 6. Auflage, Verlag Paul Parey, Berlin, S. 214-223
- <sup>11</sup> Crowfoot D, Bunn CW, Rogers-Low BW, Turner-Jones A (1949) The x-ray crystallographic investigation of the structure of penicillin. In Clark HT, Johnson JR, Robinson R (Hrsg) The chemistry of penicillin. Princeton University Press, Princeton, S. 310-366
- <sup>12</sup> Elander RP (2003) Industrial production of  $\beta$ -lactam antibiotics. Appl Microbiol Biotechnol 61:385-392
- <sup>13</sup> Rolinson GN (1998) Forty years of  $\beta$ -lactam research. J Antimicrob Chemother 41:589-603
- <sup>14</sup> Arroyo M, de la Mata I, Acebal C, Pilar Castellón M (2003) Biotechnological applications of penicillin-acylases: state of the art. Appl Microbiol Biotechnol 60:507-514
- <sup>15</sup> Gräfe U (1992) Biochemie der Antibiotika: Struktur-Biosynthese-Wirkmechanismus. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 178-199
- <sup>16</sup> McGregor DN (1984) Penicillins. In Lwowski W (Hrsg) Comprehensive heterocyclic chemistry. Band 7, Pergamon Press, Oxford, S. 299-339
- <sup>17</sup> Dürckheimer W, Blumbach J, Lattrell R, Scheunemann KH (1985) Neuere Entwicklungen auf dem Gebiet der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Angew Chem 97: 182-205
- <sup>18</sup> Testa B, Mayer JM (2003) Hydrolysis in drug and prodrug metabolism. Chemistry, biochemistry and enzymology. Wiley-VCH, Weinheim, S.163-234
- <sup>19</sup> Proctor P, Gensmantel NP, Page MI (1982) The chemical reactivity of penicillins and other  $\beta$ -lactam antibiotics. J Chem Soc Perkin Trans II: 1185-1192
- <sup>20</sup> Van Krimpen PC, Van Bennekom WP, Bult A (1987) Penicillins and cephalosporins: Physicochemical properties and analysis in pharmaceutical and biological matrices. Pharm Weekbl Sci Ed 9: 1-23
- <sup>21</sup> Bundgaard H, Larsen C (1978) Kinetics and mechanism of reaction of benzylpenicillin and ampicillin with carbohydrates and polyhydric alcohols in aqueous solution. Arch Pharm Chem Sci 6: 184-200

- 
- <sup>22</sup> Kheiriloom A, Kazemi-Vaysari A, Ardjmand M, Baradar-Khoshfetrat A (1999) The combined effects of pH and temperature on penicillin G decomposition and its stability modelling. *Process biochemistry* 35: 205-211
- <sup>23</sup> Rose MD, Bygrave J, Farrington WHH, Shearer G (1997) The effect of cooking on veterinary drug residues in food. *Analyst* 122: 1095-1099
- <sup>24</sup> Hou JP, Poole JW (1971)  $\beta$ -Lactam antibiotics: their physicochemical properties and biological activities in relation to the structure. *J Pharm Sci* 60: 503-532
- <sup>25</sup> Page MI (1984) The mechanism of reactions of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Acc Chem Res* 17: 144-151.
- <sup>26</sup> Page MI (1987) The mechanism of reactions of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Adv Phys Org Chem* 23: 165-270
- <sup>27</sup> Llinás A, Vilanova B, Frau J, Munoz F, Doloso J, Page MI (1998) Chemical reactivity of penicillins and cephalosporins. Involvement of the acyl-amido side chain. *J Org Chem* 63: 9052-9062
- <sup>28</sup> Kaiser GV, Kukulja S (1972) Modification of the  $\beta$ -lactam system. In Flynn EH (Hrsg) *Cephalosporins and penicillins: chemistry and biology*. Academic Press, New York, S 125-133
- <sup>29</sup> Yamana T, Tsuji A (1976) Comparative stability of cephalosporins in aqueous solution: kinetics and mechanism of degradation. *J Pharm Sci* 65: 1563-1574
- <sup>30</sup> Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H, Wecke J (1998) Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol Mol Bio Rev* 62: 1371-1414
- <sup>31</sup> Delcour J, Ferain T, Deghorain M, Palumbo E, Hols P (1999) The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76:159-184
- <sup>32</sup> Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2002) *Brock Mikrobiologie*. Goebel W (Dt Hrsg), Spektrum, Akademischer Verlag, Berlin, S 76-84
- <sup>33</sup> Lengeler JW, Drews G, Schlegel HG (1999) *Biology of the prokaryotes*. Thieme, Stuttgart, S 27-36
- <sup>34</sup> Sleytr UB, Messner P, Minnikin DE, Heckels JE, Virji M, Russell RBB (1988) Structure of bacteria and their envelopes. In Hancock IC, Poxton IR (Hrsg) *Bacterial cell surface techniques*. John Wiley & Sons, Chichester, S 1-30
- <sup>35</sup> Wise Jr EM, Park JT (1965) Penicillin: its basic site of action as an inhibitor of peptide cross-linking reaction in cell wall mucopeptide synthesis. *Microbiology* 54: 75-81
- <sup>36</sup> Ghuysen JM, Tipper DJ, Strominger JL (1966) Enzymes that degrade bacterial cell walls. *Methods Enzymol* 8: 685-699
- <sup>37</sup> Linnett PE, Strominger JL (1974) Amidation and cross-linking of enzymatically synthesized peptidoglycan of *Bacillus stearothermophilus*. *J Biol Chem* 249: 2489-2496
- <sup>38</sup> Koch AL, Woeste S (1992) Elasticity of the sacculus of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174: 4811-4819
- <sup>39</sup> Höltje JV (1998) Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 181-203
- <sup>40</sup> Van Heijenoort J (2001) Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* 11: 25R-36R
- <sup>41</sup> Terrak M, Ghosh TK, van Heijenoort J, Van Beeumen J, Lampilas M, Aszodi J, Ayala JA, Ghuysen JM, Nguyen-Disteche M (1999) The catalytic, glycosyl transferase and acyl transferase module of the cell wall peptidoglycan-polymerizing penicillin-binding protein 1 b of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 34:350-364
- <sup>42</sup> Nakagawa J, Shigeo T, Shigeo T, Matsushashi M (1984) Functional biosynthesis of cell wall peptidoglycan by polymorphic bifunctional polypeptides. Penicillin-binding protein 1Bs of *Escherichia coli* with activities of transglycosylase and transpeptidase. *J Biol Chem* 259: 13937-13946

- 
- <sup>43</sup> Jackson GED, Strominger JL (1984) Synthesis of peptidoglycan by high molecular weight penicillin-binding proteins of *Bacillus subtilis* and *Bacillus stearothermophilus*. *J Biol Chem* 259: 1483-1490
- <sup>44</sup> Koch AL (2000) The exoskeleton of bacterial cells (the sacculus): still a highly attractive target for antibacterial agents that will last for a long time. *Crit Rev Microbiol* 26: 1-35
- <sup>45</sup> Höltje JV, Heidrich C (2001) Enzymology of elongation and constriction of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *Biochimie* 83: 103-108
- <sup>46</sup> Höltje JV (1995) From growth to autolysis: the murein hydrolases in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* 164: 243-254
- <sup>47</sup> Bayles KW (2000) The bactericidal action of penicillin: new clues to an unsolved mystery. *Trends Microbiol* 8: 274-278
- <sup>48</sup> Rothfield L (2003) New insights into the developmental history of the bacterial cell division site. *J Bacteriol* 185: 1125-1127
- <sup>49</sup> Tipper DJ, Strominger JL (1965) Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 54: 1133-1141
- <sup>50</sup> Frau J, Price SL (1996) On the conformational and steric similarity of lactams compounds and the natural substrate for bacterial cell-wall synthesis. *J Comput-Aided Mol Des* 10:107-122
- <sup>51</sup> Lamotte J, Dive G, Ghuysen JM (1991) Conformational analysis of  $\beta$ -lactams and  $\gamma$ -lactams. *Eur J Med Chem* 26:43-50
- <sup>52</sup> Grail BM, Payne JW (2002) Conformational analysis of bacterial cell wall peptides indicates how particular conformations have influenced the evolution of penicillin-binding proteins,  $\beta$ -lactam antibiotics and antibiotic resistance mechanism. *J Mol Recognit* 15: 113-125
- <sup>53</sup> McDonough MA, Anderson JW, Silvaggi NR, Pratt RF, Knox JR, Kelly JA (2002) Structures of two kinetic intermediates reveal species specificity of penicillin-binding proteins. *J Mol Biol* 322: 111-222
- <sup>54</sup> Goffin C, Ghuysen JM (2002) Biochemistry and comparative genomics of SXXK superfamily acyltransferases offer a new clue to the mycobacterial paradox: presence of penicillin-susceptible target proteins versus lack of efficiency of penicillin as therapeutic agent. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 702-738
- <sup>55</sup> Ghuysen JM (1991) Serine  $\beta$ -lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microbiol* 45: 37-67
- <sup>56</sup> Waxman DJ, Strominger JL (1983) Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Annu Rev Biochem* 52: 825-869
- <sup>57</sup> Thomas B, Wang Y, Stein RL (2001) Kinetic and mechanistic studies of penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae*. *Biochemistry* 40: 15811-15823
- <sup>58</sup> Frère JM, Ghuysen JM, Perkins HR (1975) Interaction between exocellular DD-carboxypeptidase-transpeptidase from *Streptomyces* R61, substrate and  $\beta$ -lactam antibiotics. *Eur J Biochem* 57:353-359
- <sup>59</sup> Nicholas RA, Strominger JL (1988) Site-directed mutants of a soluble form of penicillin-binding protein 5 from *Escherichia coli* and their catalytic properties. *J Biol Chem* 263: 2034-2040
- <sup>60</sup> Williamson R, Hakenbeck R, Tomasz A (1980) The penicillin-binding proteins of *Streptococcus pneumoniae* grown under lysis-permissive and lysis-protective (tolerant) conditions. *FEMS Microbiol Lett* 7:127-131
- <sup>61</sup> Adriaens P, Meesschaert B, Frère JM, Vanderhaege H, Degelaen J, Ghuysen JM, Eyssen H (1978) Stability of D-5,5-dimethyl- $\Delta^2$ -thiazoline-4-carboxylic acid in relation to its possible occurrence as a degradation product of penicillin by the exocellular DD-carboxypeptidase-transpeptidase from *Streptomyces* R61 and the membrane-

- 
- bound DD-carboxypeptidase from *Bacillus stearothermophilus*. J Biol Chem 253: 3660-3665
- <sup>62</sup> Spratt BG (1977) Properties of the penicillin-binding properties of *Escherichia coli* K12. Eur J Biochem 72:341-352
- <sup>63</sup> Kelly JA, Kuzin AP, Charlier P, Fonze E (1998) X-ray studies of enzymes that interact with penicillins. Cell Mol Life Sci 54: 353-358
- <sup>64</sup> Waxman DJ, Strominger JL (1980) Sequence of active site peptides from penicillin-sensitive D-alanine carboxypeptidase of *Bacillus subtilis*. Mechanism of penicillin action and sequence homology to  $\beta$ -lactamases. J Biol Chem 255:3964-3976
- <sup>65</sup> Sun Y, Bauer MD, Lu W (1998) Identification of the active site serine of penicillin-binding protein 2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by electrospray mass spectrometry. J Mass Spectrom 33: 1009-1016
- <sup>66</sup> van der Linden MPG, de Haan L, Dideberg O, Keck W (1994) Site-directed mutagenesis of proposed active-site residues of penicillin-binding protein 5 from *Escherichia coli*. Biochem J 303: 357-362
- <sup>67</sup> Schwartz B, Markwalder JA, Wang Y (2001) Lipid II: total synthesis of the bacterial cell wall precursor and utilization as a substrate for glycosyltransfer and transpeptidation by penicillin-binding protein (PBP) 1b of *Escherichia coli*. J Am Chem Soc 123: 11638-11643
- <sup>68</sup> Frère JM, Ghuysen JM, Iwatsubo M (1975) Kinetics of interaction between exocellular DD-carboxypeptidase-transpeptidase from *Streptomyces* R61 and  $\beta$ -lactam antibiotics. Eur J Biochem 57: 343-351
- <sup>69</sup> Blumberg PM, Strominger JL (1971) Inactivation of D-alanine carboxypeptidase by penicillins and cephalosporins is not lethal in *Bacillus subtilis*. Proc Nat Acad Sci 68: 2814-2817
- <sup>70</sup> Lu WP, Kincaid E, Sun Y, Bauer MD (2001) Kinetics of  $\beta$ -lactam interactions with penicillin-susceptible and -resistant penicillin-binding protein 2x proteins from *Streptococcus pneumoniae*. J Biol Chem 276: 31494-31501
- <sup>71</sup> Lepage S, Lakaye B, Galleni M, Thamm I, Crine M, Gros Lambert S, Frère JM (1995) Saturation of penicillin-binding protein 1 by  $\beta$ -lactam antibiotics in growing cells of *Bacillus licheniformis*. Mol Microbiol 16: 365-372
- <sup>72</sup> Di Guilmi AM, Mouz N, Andrieu JP, Hoskins J, Jaskunas SR, Gagnon J, Dideberg O, Vernet T (1998) Identification, purification and characterization of transpeptidase and glycosyltransferase domains of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 1a. J Bacteriol 180: 5652-5659
- <sup>73</sup> Duez C, Vanhove M, Gallet, Bouillenne F, Docquier JD, Brans A, Frère JM (2001) Purification and characterization of PBP4a, a new low-molecular weight penicillin-binding protein from *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 182:1595-1599
- <sup>74</sup> Nicholas RA, Krings S, Tomberg J, Nicola G, Davies C (2003) Crystal structure of wild-type penicillin-binding protein from *Escherichia coli*. J Biol Chem 278: 52826-52833
- <sup>75</sup> Baquero F (1997) Gram-positive resistance: challenge for the development of new antibiotics. J Antimicrob Chemother 39 Supplement A: 1-6
- <sup>76</sup> Stürenburg E, Mack D (2003) Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. J Infect 47: 273-295
- <sup>77</sup> McCormick AW, Whitney CG, Farley MM, Lynfield R, Harrison LH, Bennett NM, Schaffner W, Reingold A, Hadler J, Cieslak P, Samore MH, Lipsitch M (2003) Geographic diversity and temporal trends of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* in the United States. Nature Medicine 9: 424-430
- <sup>78</sup> Olesky M, Hobbs M, Nicholas RA (2002) Identification and analysis of amino acid mutations in porin IB that mediate intermediate-level resistance to penicillin and tetracycline in *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob Agents Chemother 46: 2811-2820

- <sup>79</sup> Massova I, Kollman PA (2002) pKa, MM and QM studies of mechanisms of  $\beta$ -lactamases and penicillin-binding proteins: acylation step. *J Comp Chem* 23: 1559-1576
- <sup>80</sup> Abraham EP, Chain E (1940) An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 146: 837
- <sup>81</sup> Ambler RP (1980) The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond (Biol)* 289: 321-331
- <sup>82</sup> Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA (1995) A functional classification for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1211-1233
- <sup>83</sup> Philippon A, Dusart J, Joris B, Frère JM (1998) The diversity, structure and regulation of  $\beta$ -lactamases. *Cell Mol Life Sci* 54: 341-346
- <sup>84</sup> Joris B, Ledent P, Dideberg O, Fonze E, Lamotte-Brasseur J, Kelly JA, Ghuysen JM, Frère JM (1991) Comparison of sequences of class A  $\beta$ -lactamases and of the secondary structure elements of penicillin-recognizing proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 2294-2301
- <sup>85</sup> Massova I, Mobashery S (1998) Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1-17
- <sup>86</sup> Koch AL (2000) Penicillin-binding proteins,  $\beta$ -Lactams and lactamases: offensives, attacks and defensive countermeasures. *Crit Rev Microbiol* 26: 205-220
- <sup>87</sup> Peimbert M, Segovia L (2003) Evolutionary engineering of a  $\beta$ -lactamase activity on D-Ala-D-Ala transpeptidase fold. *Protein Eng* 16: 27-35
- <sup>88</sup> Saves I, Bulet-Schlitz O, Swarén P, Lefèvre F, Masson JM, Promé JC, Samama JP (1995) The asparagine to aspartic acid substitution at position 276 of TEM-35 and TEM-36 is involved in the  $\beta$ -lactamase resistance to clavulanic acid. *J Biol Chem* 270: 18240-18245
- <sup>89</sup> Hakenbeck R, Coyette J (1998) Resistant penicillin-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* 54: 332-340
- <sup>90</sup> Dougherty TJ (1985) Involvement of change in penicillin target and peptidoglycan structure in low-level resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 28: 90-95
- <sup>91</sup> Hakenbeck R, Tarpay M, Tomasz A (1980) Multiple changes of penicillin-binding proteins in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 17: 364-371
- <sup>92</sup> Laible G, Hakenbeck R (1991) Five independent combinations can result in low-affinity penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 173: 6986-6990
- <sup>93</sup> Nagai K, Davies TA, Jacobs MR, Appelbaum PC (2002) Effects of amino acid alterations in penicillin-binding proteins (PBPs) 1a, 2b and 2x on PBP affinities of penicillin, ampicillin, amoxicillin, cefditoren, cefuroxime, cefprozil and cefaclor in 18 clinical isolates of penicillin-susceptible, -intermediate and -resistant pneumococci. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 1273-1280
- <sup>94</sup> Grebe T, Hakenbeck R (1996) Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 829-834
- <sup>95</sup> Ropp PA, Hu M, Olesky M, Nicholas RA (2002) Mutations in *ponA*, the gene encoding penicillin-binding protein 1 and a novel locus, *penC*, are required for high-level chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 769-777
- <sup>96</sup> Hartman BJ, Tomasz A (1984) Low-affinity penicillin-binding protein associated with  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 158: 513-516
- <sup>97</sup> Ligozzi M, Pittaluga F, Fontana R (1996) Modification of penicillin-binding protein 5 associated with high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 354-357

- 
- <sup>98</sup> Sifaoui F, Arthur M, Rice L, Gutman L (2001) Role of penicillin-binding protein 5 in expression of ampicillin resistance and peptidoglycan structure in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 2594-2597
- <sup>99</sup> Pernot L, Chesnel L, Le Gouellec A, Croizé J, Vernet T, Dideberg O, Dessen A (2004) A PBP2x from a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae* exhibits an alternative mechanism for reduction of susceptibility to  $\beta$ -lactam antibiotics. *J Biol Chem* 279: 16463-16470
- <sup>100</sup> Lu WP, Sun Y, Bauer MD, Paule S, Koenigs PM, Kraft WG (1999) Penicillin-binding protein 2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: kinetic characterization of its interactions with  $\beta$ -lactams using electrospray mass spectrometry. *Biochemistry* 38: 6537-6546
- <sup>101</sup> Therrien C, Levesque RC (2000) Molecular basis of antibiotic resistance and  $\beta$ -lactamase inhibition by mechanism-based inactivators: perspectives and future directions. *FEMS Microbiol Rev* 24: 251-262
- <sup>102</sup> Wittkowski G (2002) Resistenzentwicklung und Folgen aus tierärztlicher Sicht. In Akademie für Tiergesundheit (Hrsg.) Schriftenreihe der Akademie für Tiergesundheit, Band 8: Zur Sicherheit von Tierarzneimitteln. Enke Verlag, Stuttgart, S. 153-158
- <sup>103</sup> Mayr A (1984) Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen und Agrarwissenschaftler. 5. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, S. 693-790
- <sup>104</sup> Kroker R (2002) Kompaktwissen Tierarzneimittelrückstände. Behrs Verlag, Hamburg, S. 12-17
- <sup>105</sup> Scholtan W (1963) Die Bindung der Antibiotika an die Eiweißkörper des Serums. *Arzneimittel-Forschung* 5: 347-360
- <sup>106</sup> Chambers HF, Neu HC (1995) Penicillins. In Mandell GK, Douglas R, Bennett JE (Hrsg.) Principles and practice of infectious diseases, 4. Auflage, Churchill Livingstone, New York, S. 233-246
- <sup>107</sup> Cole M, Kenig MD, Hewett VA (1973) Metabolism of penicillins to penicilloic acids and 6-aminopenicillanic acid in man and its significance in assessing penicillin absorption. *Antimicrob Agents Chemother* 3: 463-468
- <sup>108</sup> Suwanrhumpha S, Freas RB (1989) Identification of metabolites of ampicillin using liquid chromatography/thermospray mass spectrometry and fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Bio Environm Mass Spectrom* 18: 983-994
- <sup>109</sup> Moats WA, Anderson KL, Rushing JE, Buckley S (2000) Conversion of cephapirin to Deacetylcephapirin in milk and tissues of treated animals. *J Agric Food Chem* 48: 498-502
- <sup>110</sup> Heller DN, Kaplan DA, Rummel NG, von Bredow J (2000) Identification of cephapirin metabolites and degradants in bovine milk by electrospray ionization-ion trap tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 48: 6030-6035
- <sup>111</sup> Tune BM (1997) Nephrotoxicity of beta-lactam antibiotics: mechanism and strategies for prevention. *Pediatr Nephrol* 11: 768-772
- <sup>112</sup> Arroliga ME, Pien L (2003) Penicillin allergy: Consider trying penicillin again. *Cleve Clin J Med* 70: 313-326
- <sup>113</sup> Di Piro JT, Adkinson NF Jr, Hamilton RG (1993) Facilitation of penicillin haptentation to serum proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1463-1467
- <sup>114</sup> Levine BB, Redmond AP, Fellner MJ, Voss HE, Levytska V (1966) Penicillin allergy and the heterogeneous immune responses of man to benzylpenicillin. *J Clin Invest* 45: 1895-1906
- <sup>115</sup> Levine BB, Redmond AP (1968) The nature of the antigen-antibody complexes initiating specific wheal-and-flare reaction in sensitized man. *J Clin Invest* 47: 556-567
- <sup>116</sup> Yvon M, Wal JM (1988) Identification of lysine residues 199 of human serum albumin as binding site for benzylpenicilloyl groups. *FEBS Letters* 239: 237-240
- <sup>117</sup> Levine BB, Redmond AP (1969) Minor haptenic determinant-specific reagins of penicillin hypersensitivity in man. *Int Arch Allergy* 35: 445-455

- 
- <sup>118</sup> Gruchalla RS (1998) Drug allergies. *Primary Care* 25: 791-807
- <sup>119</sup> Adkinson NF JR (1984) Risk factors for drug allergy. *J Allerg Clin Immunol* 74: 567-572
- <sup>120</sup> Zhao Z, Baldo BA, Baumgart KW, Mallon DFJ (2001) Final structural recognition specificities of IgE antibodies distinguishing amoxicilloyl and amoxicillanyl determinants in allergic subjects. *J Mol Recognit* 14: 300-307
- <sup>121</sup> Bolzacchini E, Consonni V, Gramatica P, Meinardi S, Orlandi M, Rindone B, Todeschini R (1999) Toward an in vitro test for the diagnosis of allergy to penicillins. Synthesis, characterization, and use of  $\beta$ -lactam and  $\beta$ -lactam metabolite poly-L-lysines which recognize human IgE antibodies. *Bioconjugate Chem* 10: 332-337
- <sup>122</sup> Miranda A, Blanca M, Vega JM, Moreno F, Carmona MJ, Garcia JJ, Segurado E, Justicia JL, Juarez C (1996) Cross-reactivity between a penicillin and a cephalosporin with the same side chain. *J Allergy Clin Immunol* 98: 671-677
- <sup>123</sup> Zhao Z, Baldo A, Rimmer J (2002)  $\beta$ -Lactam allergenic determinants: final structural recognition of a cross-reacting determinant on benzylpenicillin and cephalotin. *Clin Exp Allergy* 32: 1644-1650
- <sup>124</sup> Dewdney JM, Edwards RG (1984) Penicillin hypersensitivity – is milk a significant hazard - a review. *J Roy Soc Med* 77: 866-877
- <sup>125</sup> Kanny G, Puygrenier J, Beaudoin E, Monret-Vautrin DA (1994) Alimentary anaphylactic shock: implication of penicillin residues. *Allerg Immunol (Paris)* 26: 181-183
- <sup>126</sup> Dewdney JM, Maes L, Raynaud JP, Blanc F, Scheid JP, Jackson T, Lens S, Verschuren C (1991) Risk assessment of antibiotic residues of  $\beta$ -Lactams and macrolides in food products with regard to their immuno-allergic potential. *Food Chem Toxicol* 29: 477-483
- <sup>127</sup> Dayan AD (1993) Allergy to antimicrobial residues in food: assessment of the risk to man. *Vet Microbiol* 35: 213-216
- <sup>128</sup> EMEA, Summary report, Penicillins
- <sup>129</sup> EMEA, Summary report, Cephalexin (1999)
- <sup>130</sup> EMEA, Summary report, Cefoperazone (1998)
- <sup>131</sup> Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen. In der Neufassung vom 9.9.1997, BGBl I 2296, zuletzt geändert am 22. 3.2004 BGBl I 454
- <sup>132</sup> Verordnung (EWG) Nr. 675/92 der Kommission von 18. März 1992 zur Änderung der Anhänge I und III der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs. *ABl. Eur. Gem. L* 73, 8-14 (1992)
- <sup>133</sup> Wilson CD (1964) The use of antibiotics in the control of mastitis. *Proc Roy Soc Med* 57: 1088-1090
- <sup>134</sup> Tolle A (1982) Die subklinische Kokkenmastitis des Rindes. *Zbl Vet Med B* 29: 329-358
- <sup>135</sup> Berridge NJ (1956) The rapid routine assay of low concentrations of penicillin in milk. *J Dairy Res* 23: 336-341
- <sup>136</sup> Petz M (1999) Comparison of chromatographic procedures for determining residues of penicillins. In: Agarwal VK [Hrsg] *Analysis of antibiotic/drug residues in food products of animal origin*, Plenum Press, New York, S. 147-163
- <sup>137</sup> Botsoglou NA, Fletouris DJ (2001) Drug residues in foods. *Pharmacology, food safety and analysis*. Marcel Dekker, New York, S. 549-1150
- <sup>138</sup> Produktinformation BRT-Hemmstofftestsysteme, Analytik in Milch Produktions- und Vertriebs-GmbH, München, Deutschland, [www.aim-bayern.de](http://www.aim-bayern.de)
- <sup>139</sup> Produktinformation Delvotest, DSM Food Specialties, Delft, Niederlande, [www.dsm.com](http://www.dsm.com)



- 
- <sup>140</sup> Produktinformation CMT - Copan Milk Test, Copan Italia, Brescia, Italien, [www.copanswabs.com](http://www.copanswabs.com)
- <sup>141</sup> Produktinformation Eclipse, Zeu Inmunotec, Zaragoza, Spanien, [www.zeu-inmunotec.com](http://www.zeu-inmunotec.com)
- <sup>142</sup> Produktinformation BR-Test® AS Brillant, DSM Food Specialties, Delft, Niederlande, [www.dsm.com](http://www.dsm.com)
- <sup>143</sup> Produktinformation PremiTest, DSM PremiTest, Heerlen, Niederlande, [www.premitest.com](http://www.premitest.com)
- <sup>144</sup> BVL (Hrsg), Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG 01.00 6, Nachweis von Hemmstoffen in Milch, Agar-Diffusionsverfahren, Blättchentest, Beuth Verlag, Berlin
- <sup>145</sup> Kraack J, Tolle A (1967) Brillantschwarz-Reduktionstest mit *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* zum Nachweis von Hemmstoffen in der Milch. *Milchwissenschaft* 11: 669-673
- <sup>146</sup> Althaus RL, Torres A, Montero A, Balasch S, Molina MP (2003) Detection limits of antimicrobials in ewe milk by Delvotest photometric measurements. *J Dairy Science* 86: 457-463
- <sup>147</sup> Medina MB, Poole DJ, Anderson MR (1998) A screening method for  $\beta$ -lactams in tissues hydrolyzed with penicillinase I and lactamase II. *J AOAC Int* 81: 963-972
- <sup>148</sup> Lottspeich F, Zorbas H (1998) *Bioanalytik*. Spektrum Verlag, Heidelberg, S. 67-102
- <sup>149</sup> Wal JM, Bories G, Mamas S, Dray F (1975) Radioimmunoassay of penicilloyl groups in biological fluids. *FEBS Letters* 57: 9-13
- <sup>150</sup> Crowther JR (1995) ELISA: theory and practice. In Walker JM (Hrsg) *Methods in molecular biology*, Vol. 42, Humana Press, Totowa
- <sup>151</sup> Märtlbauer E (1993) *Enzymimmuntests für antimikrobielle wirksame Stoffe*. Enke Verlag, Stuttgart, S. 92-140
- <sup>152</sup> Beier RC, Stanker LH (2000) Application of immunoassay for detection of antibiotics in foods and feed: A review. *Rec Res Devel Agric Food Chem* 4: 59-93
- <sup>153</sup> Benjamini E, Leskowitz S (1991) *Immunology: a short course*. 2. Auflage, Wiley-Liss, New York, S. 37-43
- <sup>154</sup> van Dorpe C, Cox E, Goddeeris B (1996) Induction of group-specific monoclonal antibodies for penicillins. In: Haagsma N und Ruiter A: *Euroresidue III: conference on residues of veterinary drugs in food*, S 387-391
- <sup>155</sup> Cliquet P, Cox E, Van Dorpe C, Schacht E, Goddeeris BM (2001) Generation of class-selective monoclonal antibodies against the penicillin group. *J Agric Food Chem* 49: 3349-3355
- <sup>156</sup> Litz S (1995) *Entwicklung und Charakterisierung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Penicillinen*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München
- <sup>157</sup> Usleber E, Litz S, Märtlbauer E (1998) Production and characterization of group-specific antibodies against penicillin antibiotics. *Food Agric Immunol* 10: 317-324
- <sup>158</sup> Dietrich R, Usleber E, Märtlbauer E (1998) The potential of monoclonal antibodies against ampicillin for the preparation of a multi-immunoaffinity chromatography for penicillins. *Analyst*. 123: 2749-2754
- <sup>159</sup> Strasser A (2003) *Entwicklung eines Biosensors zum Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden in Milch - Herstellung der immunchemischen Komponenten*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München
- <sup>160</sup> de Leuw P, Kapa G, Petz M, Schreurs FJG, Kan CA (1997) Induction and characterization of multianalyte antibodies against penicillins in egg yolk. *J AOAC Int* 80: 1220-1228
- <sup>161</sup> Huth SP, Warholic PSW, Devou JM, Chaney LK, Clark GH (2002) Parallax  $\beta$ -lactam: a capillary-based fluorescent immunoassay for the detection of penicillin G, ampicillin, cloxacillin, cephapirin and ceftiofur in bovine milk. *J AOAC Int* 85: 355-364

- 
- <sup>162</sup> Sternesjö Å, Johnsson G (1998) A novel rapid enzyme immunoassay (Fluorophos BetaScreen) for detection of  $\beta$ -lactam residues in ex-farm raw milk. *J Food Protect* 61: 808-811
- <sup>163</sup> Produktinformation, Testsysteme zum Nachweis von Antibiotika, Chr. Hansen, Hørslø, Dänemark
- <sup>164</sup> Charm SE, Chi R (1988) Microbial receptor assay for rapid detection and identification of seven families of antimicrobials in milk: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* 71: 304-316
- <sup>165</sup> Angelidis AS, Farver TB, Cullor JS (1999) Evaluation of the Delvo-X-Press assay for detecting antibiotic residues in milk samples from individual cows. *J Food Protect* 62: 1183-1190
- <sup>166</sup> Medina MB (1996) Particle concentration fluorescence assays for rapid detection of trace levels of antibiotics. *Veterinary drug residues ACS symposium series* 636: 132-143
- <sup>167</sup> Bell C, Rhoades JR, Neaves P, Scannella D (1995) An evaluation of the IDEXX SNAP test for the detection of  $\beta$ -lactam antibiotics in ex-farm raw milk. *Neth Milk Dairy J* 49: 15-25
- <sup>168</sup> Frère JM, Klein D, Ghuysen JM (1980) Enzymatic method for rapid and sensitive determination of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 18: 506-510
- <sup>169</sup> Chambers SJ, Wyatt GM, Morgan MRA (2001) Investigation of the interactions between  $\beta$ -lactams and a metallo- $\beta$ -lactamase from *Bacillus cereus* using a monoclonal antibody. *Anal Biochem* 288: 149-155
- <sup>170</sup> Stead S, Sharman M, Tarbin JA, Gibson E, Richmond S, Stark J, Geijp E (2004) Meeting maximum residues limits: an improved screening technique for the rapid detection of antimicrobial residues in animal food products. *Food Add Contam* 21:216-221
- <sup>171</sup> Lynas L, Currie D, Elliott CT, McEvoy DG, Hewitt SA (1998) Screening for chloramphenicol residues in the tissues and fluids of treated cattle by the four plate test, Charm II radioimmunoassay and Ridascreen CAP-glucuronid enzyme immunoassay. *Analyst* 123: 2773-2777
- <sup>172</sup> Diserens JM (2002) Schnelltestmethoden. Arbeitsgruppe „Pharmakologisch wirksame Stoffe“ in der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker), [www.gdch.de/strukturen/fg/lm/ag/pharma.htm](http://www.gdch.de/strukturen/fg/lm/ag/pharma.htm)
- <sup>173</sup> Entscheidung 2002/657/EG von der Kommission zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen vom 12. August 2002, (ABI L 221, S. 8)
- <sup>174</sup> Schenk FJ, Callery PS (1998) Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. *J Chromatogr A* 812: 99-109
- <sup>175</sup> Bergwerff AA, Schloesser J (2003) Residue Determination, In: B. Caballero, L Trugo, P Finglas (Hrsg) *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2nd Edition, Antibiotics and drugs, Vol. 1, Academic Press, London, S. 254-261.
- <sup>176</sup> Boison JO, Salisbury CDC, Chan W, MacNeil JD (1991) Determination of penicillin G residues in animal tissues by liquid chromatography. *J AOAC* 74: 497-501
- <sup>177</sup> Furusawa N (2000) Rapid liquid chromatographic determination of residual penicillin G in milk. *Fresenius J Anal Chem* 368: 624-626
- <sup>178</sup> Ibach A, Petz M (1998) HPLC-integrated solid phase extraction with photochemical post-column derivatization for the determination of oxacillin, cloxacillin and dicloxacillin in raw milk. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 207: 170-173
- <sup>179</sup> Lihl S, Rehorek A, Petz M (1996) High-performance liquid chromatographic determination of penicillins by means of automated solid-phase extraction and photochemical degradation with electrochemical detection. *J Chromatogr A* 729: 229-235

- 
- <sup>180</sup> Berger K (1992) Analytik von Penicillin Rückständen: Methodische Entwicklung zur Derivatisierung, Hochdruckflüssig- und Affinitätschromatographie. Dissertation, Bergische Universität Wuppertal
- <sup>181</sup> Mascher JH, Kikuta C (1998) Determination of amoxicillin in human serum and plasma by high performance liquid chromatography and on-line post-column derivatization. *J Chromatogr A*: 812: 221-226
- <sup>182</sup> Moats WA, Romanowski RD (1998) Multiresidue determination of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk and tissues with the aid of high-performance liquid chromatographic fractionation for clean up. *J Chromatogr A* 812: 237-247
- <sup>183</sup> Takeba K, Fujinuma K, Miyazaki T, Nakazawa H (1998) Simultaneous determination of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk by ion-pair liquid chromatography. *J Chromatogr A* 812: 205-211
- <sup>184</sup> Meetschen U, Petz M (1991) Gaschromatographische Analysenmethoden für Rückstände von sieben Penicillinen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs. *Z Lebensm Unters Forsch* 193: 334-343
- <sup>185</sup> Abjean JP, Lahogue V (1997) Planar chromatography for quantitative determination of ampicillin residues in milk and muscle. *J AOAC Int* 80:1171-1176
- <sup>186</sup> Hernández M, Borrull F, Calull M (1999) Determination of amoxicillin in plasma samples by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B* 731: 309-315
- <sup>187</sup> Boison JO (1992) Chromatographic methods of analysis for penicillins in food-animal tissues and their significance in regulatory programs for residue reduction and avoidance. *J Chromatogr* 624: 171-194
- <sup>188</sup> Harik-Khan R, Moats WA (1995) Identification and measurement of  $\beta$ -lactam antibiotic residues in milk: integration of screening kits with liquid chromatography. *J AOAC Int* 78: 978-986
- <sup>189</sup> Gee HE, Ho KB, Toothill J (1996) Liquid chromatographic determination of benzylpenicillin and cloxacillin in animal tissues and its application to a study of the stability at  $-20^{\circ}\text{C}$  of spiked and incurred residues of benzylpenicillin in ovine liver. *J AOAC Int* 79: 640-644
- <sup>190</sup> Daeseleire E, De Ruyck H, Van Renterghem R (2000) Confirmatory assay for the simultaneous detection of penicillins and cephalosporins in milk using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 14: 1404-1409
- <sup>191</sup> Heller DN, Ngoh MA (1998) Electrospray ionization and tandem ion trap mass spectrometry for the confirmation of seven  $\beta$ -lactam antibiotics in bovine milk. *Rapid Commun Mass Spectrom* 12: 2031-2040
- <sup>192</sup> Tyczkowska K, Voyksner RD, Aronson AL (1989) Development of an analytical method for penicillin G in bovine milk by liquid chromatography with ultraviolet-visible detection and confirmation by mass spectrometry. *J Chromatogr* 490: 101-113
- <sup>193</sup> Riediker S, Diserens JM, Stadler RH (2001) Analysis of  $\beta$ -lactam antibiotics in incurred raw milk by rapid test methods and liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 49: 4171-4176
- <sup>194</sup> Verdon E, Couëdor P (1999) Multiresidue analytical method for the determination of eight penicillin antibiotics in muscle tissue by ion-pair reversed-phase HPLC after pre-column derivatization. *J AOAC Int* 82: 1083-1095
- <sup>195</sup> Marchetti M, Schwaiger I, Schmid ER (2001) Determination of benzylpenicillin, oxacillin, cloxacillin, and dicloxacillin in cows' milk by ion-pair high-performance liquid chromatography after precolumn derivatization. *Fresenius J Anal Chem* 371: 64-67
- <sup>196</sup> Fagerquist CK, Lightfield AR (2003) Confirmatory analysis of  $\beta$ -lactam antibiotics in kidney tissue by liquid chromatography/electrospray ionization selective reaction monitoring ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17: 660-671
- <sup>197</sup> Ito Y, Ikai Y, Oka H, Matsamoto H, Miyazaki Y, Takeba K, Nagase H (2001) Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis IV. Confirmatory assay of benzylpenicillin, phenoxymethylpenicillin, oxacillin, nafcillin and cloxacillin in bovine tissues

- by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 911: 217-223
- <sup>198</sup> Becker M, Zittlau E, Petz M (2004) Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 520: 19-32
- <sup>199</sup> Bruno F, Curini R, Di Corcia A, Nazzari M, Samperi R (2001) Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for trace determination of  $\beta$ -lactam antibiotics in bovine milk. *J Agric Food Chem* 49: 3463-3470
- <sup>200</sup> Brecht A, Gauglitz G (1995) Optical probes and transducers. *Biosens Bioelectron* 10: 923-936
- <sup>201</sup> Nakamura H, Karube I (2003) Current research activity in biosensors. *Anal Bioanal Chem* 377: 446-468
- <sup>202</sup> Bäumner AJ (2003) Biosensors for environmental pollutants and food contaminants. *Anal Bioanal Chem* (2003) 377: 434-445
- <sup>203</sup> Cooper MA (2003) Label-free screening of biomolecular interactions. *Anal Bioanal Chem* 377: 834-842
- <sup>204</sup> Mello LD, Kubota LT (2002) Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chem* 77: 237-256
- <sup>205</sup> Setford SJ, Van Es RM, Blankwater YJ, Kröger S (1999) Receptor binding protein amperometric affinity sensor for rapid  $\beta$ -lactam quantification in milk. *Anal Chim Acta* 398: 13-22
- <sup>206</sup> Rich RL, Myszkka DG (2001) A survey of the year 2000 commercial optical biosensor literature. *J Mol Recognit* 14: 273-294
- <sup>207</sup> Rich RL, Myszkka DG (2003) A survey of the year 2002 commercial optical biosensor literature. *J Mol Recognit* 16: 351-382
- <sup>208</sup> Raether H (1988) Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings. *Springer tracts in modern physics*, Vol 111, S. 4-34
- <sup>209</sup> Raether H (1980) Excitation of plasmons and interband transitions by electrons. *Springer tracts in modern physics*, Vol 88, S. 1
- <sup>210</sup> Kretschmann E, Raether H (1968) Radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light. *Z Naturforsch* 23a: 2135-2136
- <sup>211</sup> Homola J (2003) Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Anal Bioanal Chem* 377: 528-539
- <sup>212</sup> Baird CL, Myszkka DG (2001) Current and emerging commercial optical biosensors. *J Mol Recognit* 14: 261-268
- <sup>213</sup> Ekgasit S, Thammacharoen C, Knoll W (2004) Surface plasmon resonance spectroscopy based on evanescent field treatment. *Anal Chem* 76: 561-568
- <sup>214</sup> Homola J, Yee SS, Gauglitz G (1999) Surface plasmon resonance sensors: a review. *Sensors and Actuators B* 54: 3-15
- <sup>215</sup> Zacher T (2002) Utilisation of evanescent fields for the characterisation of thin biosensing layer systems. Dissertation, Technische Universität München
- <sup>216</sup> Nice EC, Catimel B (1999) Instrumental biosensors: new perspectives for the analysis of biomolecular interactions. *BioEssays* 21: 339-352
- <sup>217</sup> Fägerstam LG, Frostell-Karlsson Å, Karlsson R, Persson B, Rönnerberg I (1992) Bio-specific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis. *J Chromatogr* 597: 397-410
- <sup>218</sup> Liedberg B, Nylander C, Lundström I (1995) Biosensing with surface plasmon resonance – how it all started. *Biosens Bioelectron* 10: i-ix
- <sup>219</sup> Knoll W (1998) Interfaces and thin films as seen by bound electromagnetic waves. *Annu Rev Phys Chem* 49: 569-638

- 
- <sup>220</sup> Stenberg E, Persson B, Roos H, Urbaniczky C (1991) Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *J Colloid Interface Sci* 143: 513-526
- <sup>221</sup> Silin V, Plant A (1997) Biotechnological applications of surface plasmon resonance. *Tibtech* 15: 353-359
- <sup>222</sup> Produktinformation Fa. Biacore, An introduction to Biacore's SPR technology. [www.biacore.com](http://www.biacore.com)
- <sup>223</sup> Van der Merwe PA (2001) Surface plasmon resonance. In Harding EH, Chowdhry BZ (Hrsg) *Protein-Ligand Interactions: hydrodynamics and calorimetry*. Oxford University Press, Oxford, S 137-169
- <sup>224</sup> Karlsson R (2004) SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas. *J Mol Recognit* 17: 151-161
- <sup>225</sup> Indyk HE, Evans EA, Bostrom Caselunghe MC, Persson BS, Finglas PM, Woollard DC, Filonzi EL (2000) Determination of biotin and folate in infant formula and milk by biosensor-based immunoassay. *J AOAC Int* 83: 1141-1148
- <sup>226</sup> Haasnoot W, Olieman K, Cazemier G, Verheijen R (2001) Direct biosensor immunoassays for the detection of nonmilk proteins in milk powder. *J Agric Food Chem* 49: 5201-5206
- <sup>227</sup> Gillis EH, Gosling JP, Sreenan JM, Kane M (2002) Development and validation of a biosensor-based immunoassay for progesterone in bovine milk. *J Immunol Meth* 267: 131-138
- <sup>228</sup> Daly SJ, Keating GJ, Dillon PP, Manning BM, O'Kennedy R, Lee HA, Morgan MRA (2000) Development of a surface plasmon resonance-based immunoassay for aflatoxin B<sub>1</sub>. *J Agric Food Chem* 48: 5097-5104
- <sup>229</sup> Bokken GCAM, Corbee RJ, van Knapen F, Bergwerff AA (2003) Immunochemical detection of Salmonella group B, D and E using optical surface plasmon resonance biosensor. *FEMS Microbiol Lett* 222: 75-82
- <sup>230</sup> Davis TM, Wilson WD (2000) Determination of the refractive index increments of small molecules for correction of surface plasmon resonance data. *Anal Biochem* 284: 348-353
- <sup>231</sup> Sternesjö Å, Mellgren C, Björck L (1995) Determination of sulfamethazine residues in milk by surface plasmon resonance-based biosensor assay. *Anal Biochem* 226: 175-181
- <sup>232</sup> Crooks SRH, Baxter GA, O'Connor MC, Elliott CT (1998) Immunobiosensor – an alternative to enzyme immunoassay screening for residues of two sulfonamides in pigs. *Analyst* 123: 2755-2757
- <sup>233</sup> Haasnoot W, Bienenmann-Ploum M, Kohen F (2003) Biosensor immunoassay for the detection of eight sulfonamides in chicken serum. *Anal Chim Acta* 483: 171-180
- <sup>234</sup> Haasnoot W, Loomans EEMG, Cazemier G, Dietrich R, Verheijen R, Bergwerff AA, Stephany R (2002) Direct versus competitive biosensor immunoassays for the detection of (dihydro)streptomycin residues in milk. *Food Agric Immunol* 14: 15-27
- <sup>235</sup> Haasnoot W, Verheijen R (2001) A direct (non-competitive) immunoassay for gentamicin residues with an optical biosensor. *Food Agric Immunol* 13: 131-134
- <sup>236</sup> Gaudin V, Maris P (2001) Development of a biosensor-based immunoassay for screening of chloramphenicol residues in milk. *Food Agric Immunol* 13: 77-86
- <sup>237</sup> Mellgren C, Sternesjö Å (1998) Optical immunobiosensor assay for determining enrofloxacin and ciprofloxacin in bovine milk. *J AOAC Int* 81: 394-397
- <sup>238</sup> Haughey SA, Baxter GA, Elliott CT, Persson B, Jonson C, Bjurling P (2001) Determination of clenbuterol residues in bovine urine by optical immunobiosensor assay. *J AOAC Int* 84: 1025-1030
- <sup>239</sup> Elliott CT, Baxter GA, Hewitt SA, Arts CJM, van Baak M, Hellenäs KE, Johansson A (1998) Use of biosensors for rapid drug residue analysis without sample deconjugation or clean-up: a possible way forward. *Analyst* 123: 2469-2473

- 
- <sup>240</sup> Shelver WL, Smith DJ (2003) Determination of ractopamine in cattle and sheep urine samples using an optical biosensor analysis: comparative study with HPLC and ELISA. *J Agric Food Chem* 51: 3715-3721
- <sup>241</sup> Samsonova JV, Baxter GA, Crooks SHR, Elliott CT (2002) Biosensor immunoassay of ivermectin in bovine milk. *J AOAC Int* 85: 879-882
- <sup>242</sup> McCarney B, Traynor IM, Fodey TL, Crooks SRH, Elliott CT (2003) Surface plasmon resonance biosensor screening of poultry liver and eggs for nicarbazin residues. *Anal Chim Acta* 483: 165-169
- <sup>243</sup> Gaudin V, Fontaine J, Maris P (2001) Screening of penicillin residues in milk by surface plasmon resonance-based biosensor assay: comparison of chemical and enzymatic sample pre-treatment. *Anal Chim Acta* 436: 191-198
- <sup>244</sup> Gustavsson E (2003) SPR biosensor analysis of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala
- <sup>245</sup> Gustavsson E, Bjurling P, Degelaen J, Sternesjö Å (2002) Analysis of  $\beta$ -lactam antibiotics using a microbial receptor protein-based biosensor assay. *Food Agric Immunol* 14: 121-131
- <sup>246</sup> Gustavsson E, Bjurling P, Sternesjö Å (2002) Biosensor analysis of penicillin G in milk based on the inhibition of carboxypeptidase activity. *Anal Chim Acta* 468: 153-159
- <sup>247</sup> Gustavsson E, Degelaen J, Bjurling P, Sternesjö Å (2004) Determination of  $\beta$ -lactams in milk using a surface plasmon resonance-based biosensor. *J Agric Food Chem* 52: 2791-2796
- <sup>248</sup> Eng GY, Maxwell RJ (1996) Effect on immobilization on the penicillin binding and reactivity properties of DD-peptidase from *Streptomyces* R61. *J Mol Recognit* 9: 706-714
- <sup>249</sup> Bergström C, Sternesjö Å, Bjurling P, Löfås S (1999) Design and use of a general capturing surface in optical biosensor analysis of sulphamethazine in milk. *Food Agric Immunol* 11: 329-338
- <sup>250</sup> Gutheil WG, Stefanova ME, Nicholas RA (2000) Fluorescent coupled enzyme assays for D-alanine: application to penicillin-binding protein and vancomycin activity assays. *Anal Biochem* 287: 196-202
- <sup>251</sup> Frey A, Meckelein B, Externest D, Schmidt MA (2000) A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays. *J Immunol Methods* 233: 47-56
- <sup>252</sup> Frère JM, Joris B (1985) Penicillin-sensitive enzymes in peptidoglycan biosynthesis. *Crit Rev Microbiol* 11: 299-396
- <sup>253</sup> Duval V, Swinnen M, Lepage S, Brans A, Granier B, Franssen C, Frère JM, Joris B (2003) The kinetic properties of the carboxy terminal domain of the *Bacillus licheniformis* 749/I BlaR penicillin-receptor shed a new light on the derepression of  $\beta$ -lactamase synthesis. *Mol Microbiol* 48: 1553-1564
- <sup>254</sup> Adam M, Fraipont C, Rhazi N, Nguyen-Distèche M, Lakaye B, Frère JM, Devreese B, Van Beeumen J, van Heeijenoort Y, van Heeijenoort J, Ghuysen JM (1997) The bimodular G57-V577 polypeptide chain of the class B penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli* catalyzes peptide bond formation from thioesters and does not catalyze glycan chain polymerization from the lipid II intermediate. *J Bacteriol* 179: 6005-6009
- <sup>255</sup> Jamin M, Hakenbeck R, Frère JM (1993) Penicillin-binding protein 2x as a major contributor to intrinsic  $\beta$ -lactam resistance of *Streptococcus pneumoniae*. *FEBS Letters* 331: 101-104
- <sup>256</sup> Jamin M, Damblon C, Millier C, Hakenbeck R, Frère JM (1993) Penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*: enzymic activities and interactions with  $\beta$ -lactams. *Biochem J* 292: 735-741
- <sup>257</sup> Zhao G, Yeh WK, Carnahan RH, Flokowitsch J, Meier TI, Alborn jr. WE, Becker GW, Jaskunas SR (1997) Biochemical characterization of penicillin-resistant and -sensitive penicillin-binding protein 2x transpeptidase activities of *Streptococcus pneumoniae* and

- 
- mechanistic implications in bacterial resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *J Bacteriol* 179: 4901-4908
- <sup>258</sup> Laible G, Keck W, Lurz R, Mottl H, Frère JM, Jamin M, Hakenbeck R (1992) Penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*. Expression in *Escherichia coli* and purification of a soluble enzymatically active derivative. *Eur J Biochem* 207: 943-949
- <sup>259</sup> Hakenbeck R, Universität Kaiserslautern, persönliche Mitteilung
- <sup>260</sup> Pares S, Mouz N, Pétilot Y, Hakenbeck R, Dideberg O (1996) X-ray structure of *Streptococcus pneumoniae* PBP 2x, a primary penicillin target enzyme. *Nat Struct Biol* 3: 284-289
- <sup>261</sup> Zhao G, Meier TI, Kahl SD, Gee KR, Blaszcak LC (1999) Bocillin FL, a sensitive and commercially available reagent for detection of penicillin-binding proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1124-1128
- <sup>262</sup> Galleni M, Lakaye B, Lepage S, Jamin M, Thamm I, Joris B, Frère JM (1993) A new high sensitive method for the detection and quantification of penicillin-binding proteins. *Biochem J* 291: 19-21
- <sup>263</sup> Lakaye B, Damblon C, Jamin M, Galleni M, Lepage S, Joris B, Marchand-Brynaert J, Frydrych C, Frère JM (1994) Synthesis, purification and kinetic properties of fluorescein-labelled penicillins. *Biochem J* 300: 141-145
- <sup>264</sup> Weigel LM, Belisle JT, Radolf JD, Norgard MV (1994) Digoxigenin-ampicillin conjugate for detection of penicillin-binding proteins by chemiluminescence. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 330-336
- <sup>265</sup> Andersson K, Hämäläinen M, Malmqvist (1999) Identification and optimization of regeneration conditions for affinity-based biosensor assays. A multivariate cocktail approach. *Anal Chem* 71: 2485
- <sup>266</sup> Nieba L, Krebber A, Plückthun A (1996) Competition BIAcore for measuring true affinities: large differences from values determined from binding kinetics. *Anal Biochem* 234: 155-165
- <sup>267</sup> Indyk HE, Filonzi EL (2004) Direct optical biosensor analysis of folate-binding protein in milk. *J Agric Food Chem* 52: 3253-3258
- <sup>268</sup> Andrew SM (2000) Effect of fat and protein content of milk from individual cows on the specificity rates of antibiotic residues screening tests. *J Dairy Science* 83: 2992-2997
- <sup>269</sup> Angelidis AS, Farver TB, Cullor JS (1999) Evaluation of the Delvo-X-Press assay for detecting antibiotic residues in milk samples from individual cows. *J Food Protect* 62: 1183-1190
- <sup>270</sup> Andrew SM, Frobish RA, Paape MJ, Maturin LJ (1997) Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual cows and examination of factors that effect the probability of false-positive outcomes. *J Dairy Sci* 80: 3050-3057
- <sup>271</sup> Bokken GCAM, Universität Utrecht, persönliche Mitteilung
- <sup>272</sup> Delépine B, Morétain JP (2004) Antibiotic residues in milk: LC/MS-MS confirmation (identification and quantification) of positive results obtained with microbial screening tests. Vortrag EuroResidue V – Noordwijkerhout, 10 -12. 2004
- <sup>273</sup> Guggisberg D, Widmer T, Koch H (2001) Analytik im Schlachthof und im Labor: Quantitativer Nachweis von Sulfamethazin im Schweinefleisch mit dem Biosensor Biacore Q. *Mitt Lebensm Hyg* 92: 535-545
- <sup>274</sup> Situ C, Crooks SRH, Baxter AG, Ferguson J, Elliot CT (2002) Online detection of sulfamethazine and sulfadiazine in porcine bile using a multi-channel high-throughput SPR biosensor. *Anal Chim Acta* 473: 143-149
- <sup>275</sup> Mattei B, Borch J, Roepstorff P (2004) Biomolecular interaction analysis and MS. *Anal Chem* 76: 19A-25A
- <sup>276</sup> Blumberg PM, Strominger JL (1972) Isolation by covalent affinity chromatography of the penicillin-binding components from membranes of *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 3751-3755

- 
- <sup>277</sup> Nicholas RA, Ishino F, Park W, Matsubishi M, Strominger JL (1985) Purification and sequencing of the active site tryptic peptide from penicillin-binding protein 5 from the *dacA* mutant strain of *Escherichia coli* (TMRL 1222). *J Biol Chem* 260: 6394-6397
- <sup>278</sup> Granier B, Jamin M, Galleni M, Lakaye B, Fraipont C, Joris B, Duez C, Nguyen-Distèche M, Coyette J, Leyh-Bouillé M, Dusart J, Christiaens L, Frère JM, Ghuysen JM (1994) Serine-type D-Ala-D-Ala peptidases and penicillin-binding proteins. *Methods Enzymol* 244: 249-266
- <sup>279</sup> Brückner R, Universität Kaiserslautern, persönliche Mitteilung
- <sup>280</sup> Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254



