

Entwicklung eines optischen Biosensor-Assays  
mit Elementen aus der Resistenzforschung  
zum Screening auf Tetracyclin-Rückstände  
in Lebensmitteln

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

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)

vorgelegte Dissertation

von

Nadine Möller

Wuppertal

2007

Diese Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20070559

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3A468-20070559>]

## Abstract

A tetracycline specific-screening assay for residue analysis in honey and raw milk using the surface plasmon resonance (SPR) technology is described. For this purpose the principle of the most frequent bacterial resistance mechanism against tetracycline in gram negative bacteria was utilized as guide for method development. The synthesis of a tetracycline efflux protein is regulated by the repressor protein TetR, which normally bound to a short DNA sequence representing the tetracycline operator *tetO*. When tetracycline enters a resistant bacterial cell, it induces a conformational change of the TetR protein and its release from the *tetO* DNA sequence with succeeding synthesis of the efflux protein.

Three different assay formats based on TetR and *tetO* were compared. In the direct assay TetR was immobilised on a sensor chip and tetracycline was injected over the chip surface to be bound to the protein. The mass bound to the chip is directly correlated to signal height. Correspondingly, this format showed a rather poor sensitivity due to the low molecular weight of tetracycline. Therefore an alternative assay format was developed with immobilising *tetO* onto the sensor chip. The repressor TetR was added to the sample prior to SPR analysis. Within absence of tetracyclines, TetR was able to couple to *tetO* and caused an SPR signal. Correlated to the amount of tetracyclines being present in the sample, the association of TetR and *tetO* was partially or fully blocked. In a third assay format, the first step was to load TetR to the chip-bound *tetO*. TetR was then released when injecting a tetracycline containing solution over the chip. This format using the molecular mass protein for indirect detection of tetracycline resulting in the highest test sensitivity and was used for further studies.

Several TetR variants - BD, S135L, V113A, P184Q and scTetR – were expressed as recombinant proteins and purified over ion-exchange and gel filtration chromatography. The variants were compared with respect to their assay sensitivity and cross reactivity for tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline and doxycycline. BD and S135L showed the best sensitivity while V113A exhibited a uniform cross reactivity for all tetracyclines. BD was chosen for the development of the tetracycline-specific SPR assay. Since the use of tetracycline in honey production is not approved by the European Union, residue analytical methods should be as sensitive as possible to identify non-compliant samples. Test optimizations therefore aimed at high sensitivity.

The analysis of tetracyclines in honey was possible after diluting the samples 1 to 10 with buffer. No differences between raw honey and blended commercial honeys were observed. The analysis of 20 different honey samples showed a high variation between the individual blanks leading to a limit of detection (LOD) of 14 µg/kg tetracycline in honey, when applying the mean of blank honey signals plus 3 times standard deviation for calculating the LOD.

In order to reduce the matrix effects of raw milk, the samples had to be defatted, diluted 1 to 5 with buffer and heated for a short time prior SPR analysis. Applying this sample preparation the limit of detection could be estimated within 31 µg/kg. This was sufficient to use the assay as a routine screening method for tetracycline residues in milk to survey the maximum residue limit of 100 µg/kg.

## **Dank**

Die hier vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2002 bis einschließlich November 2006 im Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften der Bergischen Universität Wuppertal in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Michael Petz angefertigt.

Danken möchte ich Prof. Dr. Petz für die Überlassung des Themas und der weitgehenden Freiheit bei der Bearbeitung der Fragestellungen. Zudem möchte ich ihm für seine stete Diskussionsbereitschaft danken.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hillen möchte ich für die Möglichkeit der Isolierung der Repressor-Proteine und Herrn Dr. Oliver Scholz für die hilfreichen Tipps und die Beantwortung all meiner Fragen bezüglich dieser Proteine danken.

Einen herzlichen Dank möchte ich an Herrn Prof. Dr. Aldert A. Bergwerff, Frau Gertie C. A. M. Bokken und Frau Betty G. M. Jongerius-Grotemaker für die Möglichkeit der Messung am Biacore 3000<sup>®</sup>, die vielen konstruktiven Ideen und das nette Arbeitsklima an der Universität Utrecht richten.

Ferner möchte ich mich bei der Firma Biacore (Uppsala, Schweden) für die Bereitstellung des Biacore Q<sup>®</sup> und insbesondere bei Herrn Terry McGrath und Herrn Simon Haughey (beide Xenosense, Belfast, UK) bzw. Herrn Dr. Heiko Meyer und Frau Dr. Steffi Bachem (beide Biacore<sup>®</sup>) für die steten Diskussionen und hilfreichen Tipps bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Siegmar Gäb und Herrn Dr. Oliver Schmitz möchte ich mich für die Möglichkeit und die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der Messungen mittels Affinitäts-Kapillarelektrophorese bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Erika Müller-Seitz für ihr stets offenes Ohr und ihre vielen hilfreichen Vorschläge und Diskussionen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) möchte ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit danken.

Meinen Kollegen möchte ich für das angenehme Arbeitsklima, unter dem diese Arbeit entstanden ist herzlich danken. Insbesondere möchte ich an dieser Stelle auch den Kollegen des Faches Biochemie für die Hilfestellung bei biochemischen und molekularbiologischen Fragestellungen danken.

Meiner Familie möchte ich meinen herzlichen Dank ausdrücken, die mir eine akademische Laufbahn ermöglicht hat und mir immer unterstützend zur Seite gestanden hat.

Schließlich danke ich Herrn Dr. Andreas Fischbach für seine stete Geduld und seelische Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit.

Ihnen allen sei an dieser Stelle gedankt.

## Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Tetracycline</b> .....	<b>1</b>
<b>2.1</b>	<b>Geschichte der Tetracycline</b> .....	<b>1</b>
<b>2.2</b>	<b>Chemie</b> .....	<b>2</b>
2.2.1	Struktur .....	2
2.2.2	Umlagerungs- und Dehydratationsprodukte .....	4
2.2.2.1	Epimerisierung .....	4
2.2.2.2	Keto-Enol-Tautomerie und Protonierung .....	5
2.2.2.3	Isomerisierung .....	8
2.2.2.4	Bildung von Anhydrotetracyclinen .....	9
2.2.3	Komplexbildung .....	10
<b>2.3</b>	<b>Biologische Wirkung</b> .....	<b>11</b>
2.3.1	Struktur-Wirkungsbeziehung .....	11
2.3.2	Pharmakokinetik .....	12
2.3.3	Wirkungsspektrum und Anwendungsgebiete in der Veterinärmedizin .....	14
2.3.4	Aufnahme von Tetracyclin in die Bakterienzelle .....	14
2.3.5	Wirkmechanismus .....	15
2.3.6	Toxikologie .....	16
<b>2.4</b>	<b>Tetracyclin-Resistenz</b> .....	<b>17</b>
2.4.1	Reduktion der Antibiotika-Konzentration im Cytoplasma .....	17
2.4.1.1	Geringe Permeabilität der Zellwand .....	17
2.4.1.2	Ausschleusen des Antibiotikums (Efflux) .....	18
2.4.2	Ribosomale Schutzproteine .....	20
2.4.3	Enzymatische Inaktivierung .....	20
<b>2.5</b>	<b>Das Operator-Repressor-System</b> .....	<b>21</b>
2.5.1	Tetracyclin-Repressoren .....	21
2.5.2	Der Tetracyclin-Operator .....	23
2.5.3	Induktion des Repressors durch [TC-Mg] <sup>+</sup> .....	23
<b>2.6</b>	<b>Rechtliche Regelungen zum Einsatz von Tetracyclinen bei lebensmittelliefernden Tieren</b> .....	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>Rückstandsanalytik von Tetracyclinen</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b>Mikrobiologische und immunchemische Verfahren</b> .....	<b>26</b>
3.1.1	Hemmstofftests .....	26
3.1.2	Immunchemische Verfahren .....	27
3.1.3	Rezeptor-Tests .....	28
<b>3.2</b>	<b>Chemisch-physikalische Verfahren</b> .....	<b>28</b>
3.2.1	Extraktion und Clean-up .....	29
3.2.2	Chromatographische Trennung .....	30
3.2.3	Detektion .....	30
<b>3.3</b>	<b>Biosensor-Verfahren</b> .....	<b>31</b>
3.3.1	Grundlagen der Oberflächen-Plasmon-Resonanz .....	31
3.3.2	Detektionsprinzip .....	34
3.3.3	Aufbau eines SPR-Spektrometers .....	35
3.3.4	Sensorchips .....	36
3.3.5	Anwendung der SPR in der Rückstandsanalytik von Antibiotika .....	38
3.3.6	Einsatz von Biosensoren zum Nachweis von Tetracyclinen .....	41
<b>4</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>45</b>

<b>5</b>	<b><i>Aufbau der möglichen Assay-Formate</i></b> .....	<b>47</b>
5.1	indirekter Assay .....	47
5.2	Direkter Assay .....	48
5.3	Indirekter Assay mit <i>tetO</i> und TetR.....	49
5.4	Indirekter Gleichgewichts-Assay.....	51
<b>6</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b> .....	<b>53</b>
<b>6.1</b>	<b>Ribosome als Bindungspartner für einen tetracyclinspezifischen SPR-Assay</b> .....	<b>53</b>
6.1.1	Isolierung von Ribosomen.....	53
6.1.2	Bestimmung der Aktivität der Ribosome .....	55
6.1.2.1	ELISA mit Konkurrenz zwischen Ribosom und Primärantikörper .....	55
6.1.2.2	Affinitäts-Kapillarelektrophorese .....	58
6.1.2.3	Gleichgewichtsanalysen.....	60
6.1.3	Versuche zur Herstellung von Tetracyclin-Derivaten für einen indirekten SPR-Assay..	61
<b>6.2</b>	<b>SPR-Untersuchungen mit dem Tetracyclin Operator-Repressor- System</b> .....	<b>64</b>
<b>6.3</b>	<b>Aufbau der Repressor-Proteine</b> .....	<b>64</b>
<b>6.4</b>	<b>Expression und Isolierung der Repressor-Proteine TetR(BD) und TetR(BD)S135L..</b>	<b>67</b>
<b>6.5</b>	<b>Vergleich der Assay-Formate</b> .....	<b>70</b>
<b>6.6</b>	<b>Charakteristika von Injektionszyklen und Messreihen im indirekten Assay mit <i>tetO</i> und TetR</b> .....	<b>75</b>
<b>6.7</b>	<b>Regeneration der Chipoberfläche</b> .....	<b>78</b>
<b>6.8</b>	<b>Belegung mit <i>tet</i>-Operator</b> .....	<b>82</b>
6.8.1	Belegungsdichte.....	82
6.8.2	Belegung mit unterschiedlichen Flussraten und Nachbelegung eines bereits genutzten Chips .....	85
6.8.3	<i>tetO</i> -Varianten .....	87
6.8.4	Reproduzierbarkeit der Belegung .....	92
<b>6.9</b>	<b>Anbindung des Tet-Repressors</b> .....	<b>93</b>
6.9.1	Dissoziation des Operator-Repressor- Komplexes .....	93
6.9.2	Änderung der Kontaktzeit der TetR-Lösung mit der <i>tetO</i> -Oberfläche .....	94
6.9.3	Änderung der TetR-Konzentration .....	96
6.9.4	Zunahme der Repressor-Bindung während einer Messreihe .....	98
<b>6.10</b>	<b>Repressor-Varianten</b> .....	<b>100</b>
6.10.1	Kalibrierkurven.....	101
<b>6.11</b>	<b>Selektivität und Kreuzreaktivität</b> .....	<b>103</b>
<b>6.12</b>	<b>Chipstabilität</b> .....	<b>106</b>
<b>6.13</b>	<b>Bestimmung von Tetracyclin in Rohmilch und Honig</b> .....	<b>110</b>
6.13.1	Behandlung der Milchproben vor einer SPR-Analyse und Optimierung des Erhitzungsschrittes.....	110
6.13.2	Kalibrierkurven von Tetracyclin in Rohmilch.....	112
6.13.3	Untersuchung von Rohmilchproben unterschiedlicher Kühe .....	113
6.13.4	Kalibrierkurven von Tetracyclin in Honig .....	117
6.13.5	Bestimmung von Entscheidungsgrenze und Nachweisvermögen von Tetracyclin in Honig .....	118
<b>6.14</b>	<b>Zusammenfassung der Optimierungsschritte des indirekten Assays mit <i>tetO</i> und TetR</b> .....	<b>122</b>

<b>7</b>	<b><i>Diskussion</i></b> .....	<b>123</b>
<b>7.1</b>	<b>Ribosome als Bindungspartner für einen tetracyclinspezifischen SPR-Assay</b> .....	<b>123</b>
<b>7.2</b>	<b>Versuche zur Derivatisierung des Tetracyclins für einen indirekten SPR-Assay</b> .....	<b>125</b>
<b>7.3</b>	<b>SPR-Biosensor mit dem Tetracyclin Operator-Repressor-System</b> .....	<b>126</b>
7.3.1	Vergleich der untersuchten Assay-Formate.....	126
7.3.2	Charakteristika des indirekten Assays mit <i>tetO</i> und TetR.....	127
7.3.3	Repressor-Bindung an Operator-DNA bei unterschiedlichen Belegungsdichten.....	130
7.3.4	$\Delta$ RU bei unterschiedlicher Repressor-Belegung .....	131
7.3.5	Zunahme der Repressor-Bindung während einer Messreihe .....	134
7.3.6	TetR-Varianten .....	137
7.3.7	Kreuzreaktivitäten der Tetracycline .....	139
7.3.8	Nachweis und Quantifizierung von Tetracyclin in Milch und Honig.....	140
7.3.8.1	Notwendigkeit der Matrixkalibrierung .....	140
7.3.8.2	Nachweisvermögen für Tetracyclin in Rohmilch und Honig .....	141
7.3.8.3	Vergleich mit veröffentlichten Daten .....	144
<b>8</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b> .....	<b>146</b>
<b>9</b>	<b><i>Ausblick</i></b> .....	<b>150</b>
<b>10</b>	<b><i>Material und Methoden</i></b> .....	<b>152</b>
<b>10.1</b>	<b>Isolierung von Ribosomen</b> .....	<b>152</b>
<b>10.2</b>	<b>Bestimmung der Bindung von Tetracyclin an Ribosome</b> .....	<b>155</b>
10.2.1	ELISA mit Competition zwischen Ribosom und Primär-Antikörper.....	156
10.2.2	Affinitäts-Kapillarelektrophorese .....	157
10.2.3	Gleichgewichtsanalysen .....	158
<b>10.3</b>	<b>Herstellung eines Tetracyclin-Derivates</b> .....	<b>158</b>
10.3.1	Bedingungen der Dünnschichtchromatographie.....	160
<b>10.4</b>	<b>Isolierung und Reinigung der Repressor-Proteine TetR(BD) und TetR(BD)S135L</b> .	<b>160</b>
10.4.1	Transformation des TetR-codierenden Plasmids .....	163
10.4.2	Expression der Repressor-Proteine und Aufschluss der Zellen.....	164
10.4.3	Isolierung und Aufreinigung der Repressor-Proteine .....	164
10.4.4	SDS-Gelelektrophorese .....	165
10.4.5	Photometrische Quantifizierung der Repressor-Proteine .....	165
10.4.6	Aktivitätstest.....	166
<b>10.5</b>	<b>Herstellung der <i>tet</i>-Operatoren</b> .....	<b>168</b>
<b>10.6</b>	<b>SPR-Analyse</b> .....	<b>170</b>
10.6.1	Präparation der Sensorchips .....	171
10.6.2	Belegung des chipgebundenen <i>tetO</i> mit TetR .....	173
10.6.3	Ermittlung geeigneter Regenerationsbedingungen .....	173
10.6.4	Analyse von Rohmilch und Honig .....	175
10.6.4.1	Dotierung der Proben .....	175
10.6.4.2	Rohmilchproben.....	176
10.6.4.3	Honigproben .....	176
10.6.4.4	Bestimmung der Kreuzreaktivität .....	178
10.6.5	Lagerung der mit <i>tetO</i> belegten Chips.....	179
<b>11</b>	<b><i>Abkürzungsverzeichnis</i></b> .....	<b>180</b>
<b>12</b>	<b><i>Literatur</i></b> .....	<b>182</b>

## 1 Einleitung

Tetracycline sind Breitbandantibiotika und weisen als solche ein breites Wirkungsspektrum gegen grampositive und gramnegative Bakterien auf. Bereits kurz nach ihrer Entdeckung wurden sie zum integralen Bestandteil der Behandlung von Infektionskrankheiten in der Human- und Veterinärmedizin und sind es bis heute geblieben. Sie sind leicht herzustellen, kostengünstig und zeigen eine gute Verträglichkeit [1]. Dies mögen Gründe dafür sein, dass Tetracycline zu den in der Veterinärmedizin mengenmäßig am häufigsten verwendeten Antibiotika gehören [2]. Im Laufe der Zeit wurde das Spektrum der Tetracycline durch teilsynthetisch und vollsynthetisch hergestellte Varianten erweitert. Dadurch wurden eine Verbesserung von Wirkungsspektrum und Anwendbarkeit erreicht und gebildete Resistenzen umgangen [3].

Zur Behandlung von lebensmittelliefernden Tieren sind innerhalb der Europäischen Union nur die vier Tetracycline Oxytetracyclin, Tetracyclin, Chlortetracyclin und Doxycyclin zugelassen [4; 5]. Dabei müssen nach der Behandlung der Tiere gesetzlich vorgeschriebene Wartezeiten eingehalten werden, bevor das Tier geschlachtet oder dessen Milch bzw. Eier verkauft werden dürfen. Diese Maßnahme dient dem Schutz des Verbrauchers vor zu hoher Belastung mit Antibiotika [6]. Zu diesem Zweck wurden auch gesetzliche Höchstmengen eingeführt (maximum residue limit, MRL), die beim Verkauf eines Lebensmittels nicht überschritten werden dürfen. Zur Kontrolle der Einhaltung der MRL-Werte werden sowohl nationale als auch europaweite Rückstandskontrollen durchgeführt.

## 2 Tetracycline

### 2.1 Geschichte der Tetracycline

Erstmals wurde ein Tetracyclin im Jahre 1948 von Benjamin Minge Duggar beschrieben [7]. Er fand eine gelbe Substanz, die er aus *Streptomyces aureofaciens* isolieren konnte und die er aufgrund ihrer Färbung Aureomycin (das spätere Chlortetracyclin) nannte. Ein Jahr später meldete er das erste von vielen Patenten im Bereich der Tetracyclinforschung an. Bereits zwei Jahre darauf meldete die Firma Pfizer und Co. ein Patent auf eine Substanz mit ähnlichen Eigenschaften an, die aus *S. rimosus* isoliert und Terramycin (das spätere Oxytetracyclin)

genannt wurde [3]. Die Strukturaufklärung der beiden Substanzen erwies sich als schwierig und konnte erst 1953 von Woodward erreicht werden [8; 9; 10]. Bei seinen Arbeiten wurde durch Abspaltung eines Chloratoms von Aureomycin eine dritte Substanz entdeckt, die später auch aus Fermentationsansätzen von *S. aureofaciens*, *S. rimosus* und *S. viridofaciens* isoliert werden konnte [11]. Sie wurde Deschloroaureomycin genannt und ist heute unter dem Namen Tetracyclin bekannt [3].

In den folgenden Jahren wurden weitere Tetracycline isoliert (z.B. das Demethylchlortetracyclin aus *S. aureofaciens*) und teilsynthetisch gewonnen [11]. Da Tetracycline im physiologischen pH-Bereich nur eine geringe Löslichkeit aufweisen (ca. 1 mg/ml) [12], ging die Forschung neben einer verstärkten Wirkung (Methacyclin, Doxycyclin) und der Umgehung von Resistenzen (Minocyclin und die Gruppe der Glycylcycline) sowie der Verringerung von Nebenwirkungen auch in die Richtung einer verbesserten Löslichkeit (Rolitetracyclin und Lymecyclin).

Bald nach der Entdeckung der Tetracycline versuchte man diese auch totalsynthetisch herzustellen. Die komplexe Stereochemie der Tetracycline und ihre hohe Reaktionsfreudigkeit gegenüber sauren, alkalischen oder reduzierend wirkenden Agenzien erschwerten die Totalsynthese. Erst 1962 gelang Woodward die Herstellung eines biochemisch aktiven Tetracyclins, dem 6-Desmethyl-6-desoxytetracyclin, auf rein chemischem Weg über eine insgesamt 22-stufige Reaktionsfolge, zitiert in [12]. Die Totalsynthese erwies sich jedoch als zu ineffektiv. Heute werden Tetracycline fermentativ oder teilsynthetisch hergestellt.

## 2.2 Chemie

### 2.2.1 Struktur

Der Grundkörper aller Tetracycline besteht aus 4 linear angeordneten sechsgliedrigen Ringen, die gemäß IUPAC mit A bis D bezeichnet werden. Die Nummerierung der Kohlenstoffatome erfolgt analog zum Naphthalen, beginnend in Ring A und von dort aus gegen den Uhrzeigersinn. Abbildung 2-1 zeigt das Grundgerüst der Tetracycline inklusive der Benennung der Ringe von A-D und der Kohlenstoffatome. Tabelle 2-1 gibt eine Übersicht über wichtige Vertreter der Tetracycline.

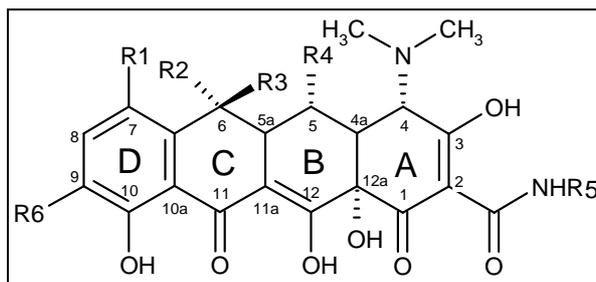


Abbildung 2-1 Allgemeine Grundstruktur der Tetracycline

Name	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Tetracyclin	H	CH <sub>3</sub>	OH	H	H	H
Oxytetracyclin	H	CH <sub>3</sub>	OH	OH	H	H
Chlortetracyclin	Cl	CH <sub>3</sub>	OH	H	H	H
Doxycyclin	H	CH <sub>3</sub>	H	OH	H	H
Sancyclin	H	H	H	H	H	H
Methacyclin	H	=CH <sub>2</sub>		OH	H	H
Rolitetracyclin	H	CH <sub>3</sub>	OH	H		H
Lymecyclin	H	CH <sub>3</sub>	OH	OH		H
Desmethyl-chlortetracyclin	Cl	H	OH	H	H	H
Tertiär-butylglycylamido-minocyclin	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H	H	H	
Minocyclin	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H	H	H	H

Tabelle 2-1 Chemische Strukturen wichtiger Tetracycline

Mit Ausnahme von Ring A ist das Tetracyclin-Molekül annähernd planar. Ring A ist aufgrund der sterischen Anordnung der Reste an C4a und C12a etwas aus der Ebene herausgebogen. Das Molekül hat mit Ring D nur einen aromatischen Ring. Die Kohlenstoffatome 4, 4a, 5a, 6 und 12a sind asymmetrisch, was das Molekül optisch aktiv macht. Je nach Substitution weisen die unterschiedlichen Tetracycline mehr oder weniger Asymmetriezentren (z.B. Oxytetracyclin: 6 oder Minocyclin: 3) auf (siehe Tabelle 2-1). Der Chromophor der Ringe BCD des Tetracyclins absorbiert Licht der Wellenlängen 225, 285, 320 und 360 nm und 262 nm (Ring A-Chromophor). Eine Absorptionsbande bei 275 nm setzt sich aus mehreren Absorptionen zusammen [12].

## 2.2.2 Umlagerungs- und Dehydratationsprodukte

Tetracycline sind anfällig für Umlagerungen und Abbauprozesse unter verschiedenen physikochemischen Gegebenheiten. Dabei werden vor allem die Epimerisierung am C4-Atom, verschiedene Keto-Enol-Umlagerungen und die Isomerisierung in Ring B als Umlagerungen beschrieben. Die Tetracyclin-Literatur beschränkt die Begriffe „Isomerisierung“ und „Iso-“, allein auf die Lactonbildung in Ring C bei alkalischen pH-Werten (siehe Abschnitt 2.2.2.3, Seite 8), obwohl auch andere Umlagerungen dem allgemeinen chemischen Sprachgebrauch entsprechend eine Isomerisierung darstellen. Um Missverständnisse zu vermeiden, wird in dieser Arbeit die Benennung der Umlagerungsprodukte konform mit der in der Tetracyclin-Literatur verwendeten Nomenklatur durchgeführt.

Als Dehydratationsprodukt werden die Anhydrotetracycline beschrieben (siehe Abschnitt 2.2.2.4, Seite 9). Sie entstehen durch Wasserabspaltung aus Tetracyclinen mit einer OH-Gruppe an C6.

### 2.2.2.1 Epimerisierung

Die häufigste Umlagerung im Tetracyclin-Molekül ist die Änderung der Konformation am asymmetrischen Kohlenstoffatom C4. Dabei handelt es sich um eine Isomerisierung, die unter dem Begriff Epimerisierung Einzug in die Tetracyclin-Literatur gefunden hat. Besonders im pH-Bereich zwischen 2 und 6 unterliegen die Tetracycline dieser Reaktion [12]. Sie verläuft über eine Enolform als Intermediat, wie es in Abbildung 2-2 dargestellt ist. Dabei bildet sich als Produkt das antibakteriell weitgehend inaktive 4-epi-Tetracyclin [13] (siehe auch Abschnitt 2.3.1, Seite 11).

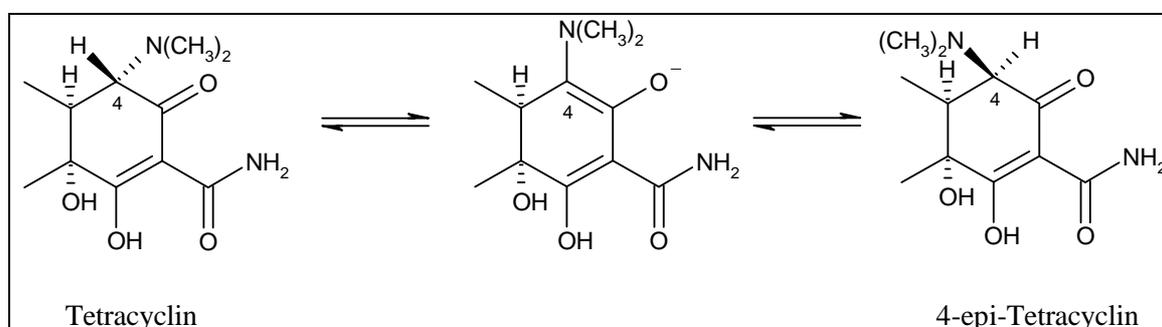


Abbildung 2-2 Epimerisierung an C4

Die Epimerisierung verläuft als Reaktion erster Ordnung und ist reversibel. Unter optimalen Bedingungen ist eine vollständige Wiederherstellung des biologisch aktiven Isomers im alkalischen Milieu bei Anwesenheit komplexierender Metallkationen möglich [13].

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Epimerisierung wird beeinflusst durch mehrere Faktoren. So spielen die Anwesenheit von Substanzen wie Phosphat, Citrat, Harnstoff, Lösungsvermittlern und mehrwertigen Metallkationen, aber auch die Temperatur eine große Rolle [12; 14; 15]. Hussar et al. untersuchten 1968 [14] die Abhängigkeit der Epimerisierungsgeschwindigkeit von der Temperatur und dem pH-Wert der Lösung. Sie fanden eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit mit abnehmendem pH-Wert und steigender Temperatur. Zudem stellten sie fest, dass Oxytetracyclin nur sehr langsam epimerisiert. Dies führten sie auf eine stabilisierende Wirkung der Hydroxygruppe an C5 zurück. Diese ist in der Lage, mit dem Stickstoff der Dimethylaminofunktion eine Wasserstoffbrücke auszubilden, was die Epimerisierung erschwert.

Die Lage des Gleichgewichtes ist zudem vom exakten pH-Wert und vom jeweiligen Tetracyclin abhängig. So konnten Remmers et al. nachweisen, dass bei einem pH-Wert von 3,2 etwa 55 % und bei einem pH-Wert von 6,0 nur 18 % als 4-epi-Tetracyclin vorliegen (Tabelle 2-2) [15].

pH-Wert	Anteil 4-epi-Tetracyclin im Gleichgewicht [%]
2,4	45
3,2	55
4,0	37
5,0	32
6,0	18

**Tabelle 2-2 Gleichgewichtskonzentrationen von 4-epi-Tetracyclin in 0,1 mol/L Phosphatpuffer bei unterschiedlichen pH-Werten bei einer Temperatur von 23 °C [15].**

### 2.2.2.2 Keto-Enol-Tautomerie und Protonierung

Tetracycline können an mehreren Stellen im Molekül protoniert oder deprotoniert werden. Sie sind also amphoter. Die Deprotonierung der Hydroxygruppe an C3 zeigt aufgrund einer sich leicht ausbildenden Keto-Enol-Tautomerie in Ring A (siehe Abbildung 2-3) den niedrigsten  $pK_a$ -Wert ( $pK_{a1}$  in Tabelle 2-3).

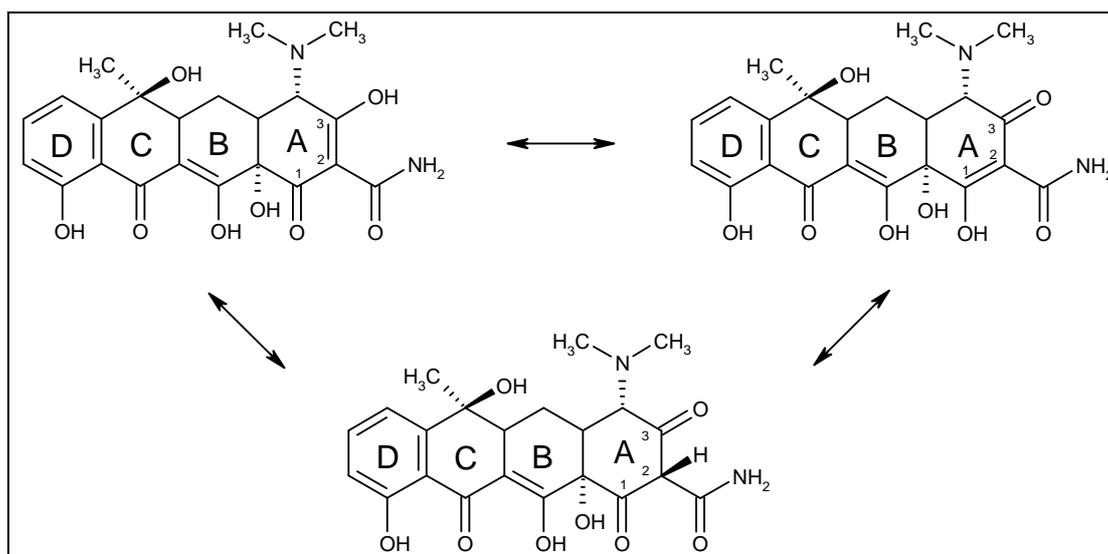


Abbildung 2-3 Keto-Enol-Tautomerie in Ring A des Tetracyclins [3]

Eine weitere Keto-Enol-Tautomerie lässt sich in den Ringen B und C finden. Hier formen die Substituenten an den C 11, 11a und 12 ein System mit einem höheren  $pK_{a2}$ -Wert ( $pK_{a2}$ ). Die Dimethylaminogruppe schließlich weist einen basischen Charakter auf ( $pK_{a3}$ ). Bei den  $pK_{a}$ -Werten zeigen sich Unterschiede zwischen den einzelnen Tetracyclinen. Tabelle 2-3 gibt eine Aufstellung der  $pK_{a}$ -Werte einiger Tetracycline, wie sie von Qiang und Adams [16] bestimmt wurden.

	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$pK_{a3}$
Tetracyclin-HCl	3,2	7,5	8,9
Oxytetracyclin-HCl	3,3	7,8	9,6
Chlortetracyclin-HCl	3,3	7,6	9,3
Doxycyclin-HCl	3,0	8,0	9,2

Tabelle 2-3  $pK_{a}$ -Werte einiger Tetracyclin-Hydrochloride [16].

Die nahe beieinander liegenden Werte für  $pK_{a2}$  und  $pK_{a3}$  zeigt, dass Tetracycline in wässrigen Lösungen meist als Mischung von unterschiedlich protonierten Formen vorkommen. Wie Abbildung 2-4 A zeigt, liegt das neutrale Tetracyclin als Zwitterion vor. Diese Abbildung stellt die unterschiedlich protonierten Formen von Tetracyclin bei Änderung des pH-Wertes vom Säuren ins Basische dar. In Abbildung 2-4 B ist ein Verteilungsschema der Formen bei entsprechenden pH-Werten gezeigt. Bei dieser Abbildung wurden Epimerisierung, Isomerisierung und die Bildung von Anhydrotetracycline außer Acht gelassen.

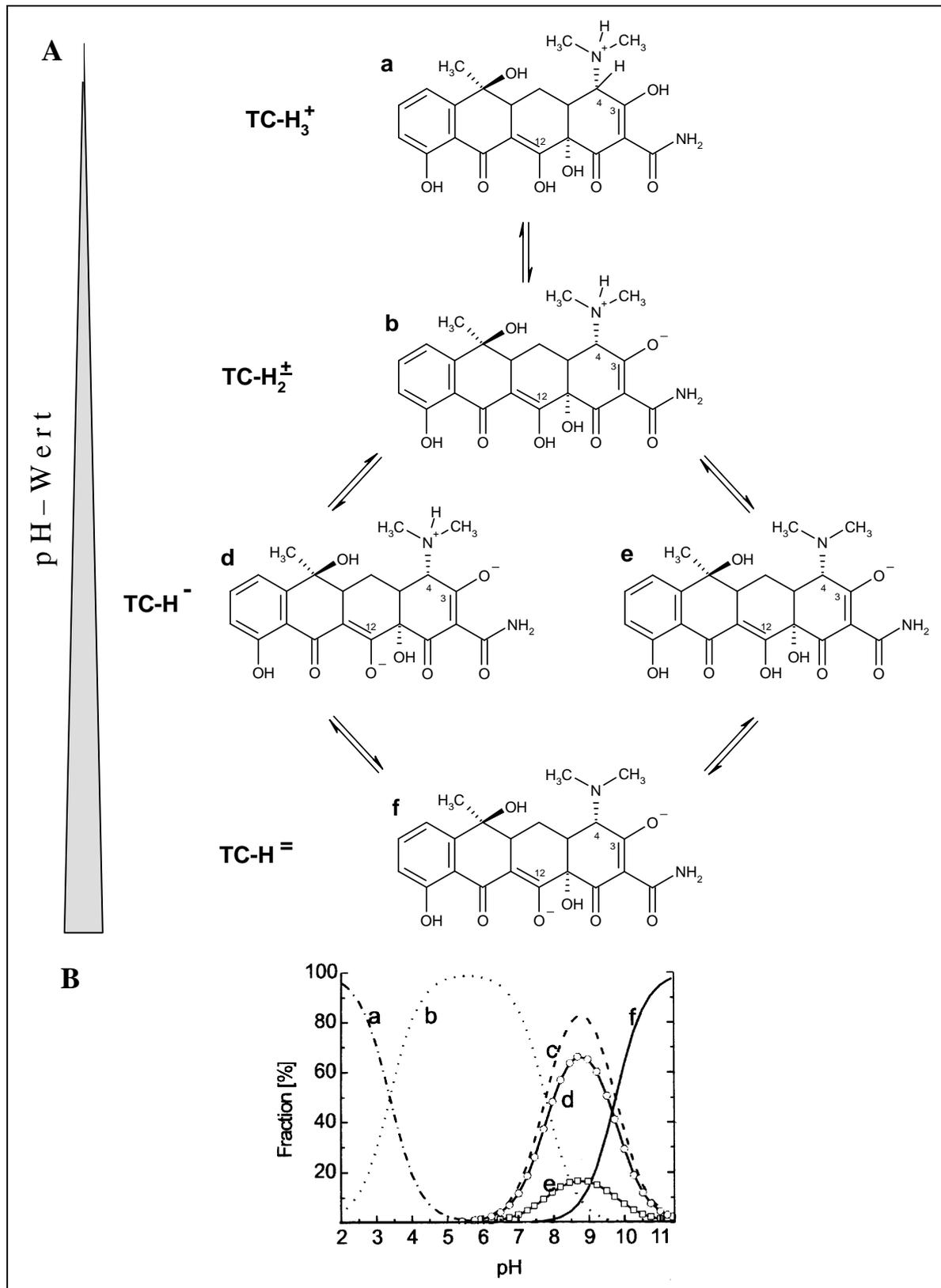


Abbildung 2-4 Schema der Deprotonierung von Tetracyclin bei steigendem pH-Wert [3]. A: Darstellung der möglichen Formen, in denen Tetracyclin bei den unterschiedlichen pH-Werten vorliegen kann. Für das einfach negativ geladene Tetracyclin sind zwei Formen bekannt. B: Verteilung der unterschiedlich protonierten Formen des Tetracyclin im pH-Bereich 2 bis 11 in wässrigen Lösungen. Dabei bezeichnet Form c die Summe aus Form d und e.

Unterhalb von pH 2 liegt ausschließlich die vollständig protonierte Form des Tetracyclins  $\text{TC-H}_3^+$  (a) vor. Steigt der pH-Wert an, so wird zunächst das Wasserstoffion mit dem geringsten  $\text{pK}_a$ -Wert abgespalten ( $\text{pK}_{a1}$  in Tabelle 2-3). Es bildet sich die neutrale Form  $\text{TC-H}_2^\pm$  (b), die mit steigendem pH-Wert einen immer größeren Anteil ausmacht, bis sie bei pH 5-6 fast zu 100 % vorkommt. Erst nach diesem großen pH-Bereich wird das Tetracyclin weiter zur  $\text{TC-H}$ -Form (c) deprotoniert. Die Ladungen dieser Form können im Tetracyclin-Molekül unterschiedlich verteilt sein, so dass von dieser Form die beiden Unterformen d (mit je einer negativen Ladung an den Sauerstoffen an C 3 und C12 und einer positiven Ladung am Stickstoff der Dimethylaminofunktion) und e (mit einer negativen Ladung auf dem Sauerstoff an C3) nebeneinander vorkommen. Dabei liegt die Unterform e in geringerer Menge vor als die Unterform d. Ab einem pH-Wert von ca. 7,5 schließlich wird auch die vollständig deprotonierte Form  $\text{TC-H}^-$  (f) gebildet.

Abbildung 2-4 B macht deutlich, dass vor allem bei pH-Werten zwischen 6 und 11 ein Gemisch aus mehreren Formen des Tetracyclins vorliegt.

### 2.2.2.3 Isomerisierung

Tetracycline mit einer Hydroxygruppe an C6 werden in Gegenwart von Basen leicht umgelagert. Dabei bildet sich in Ring C ein Lacton aus (Abbildung 2-5).

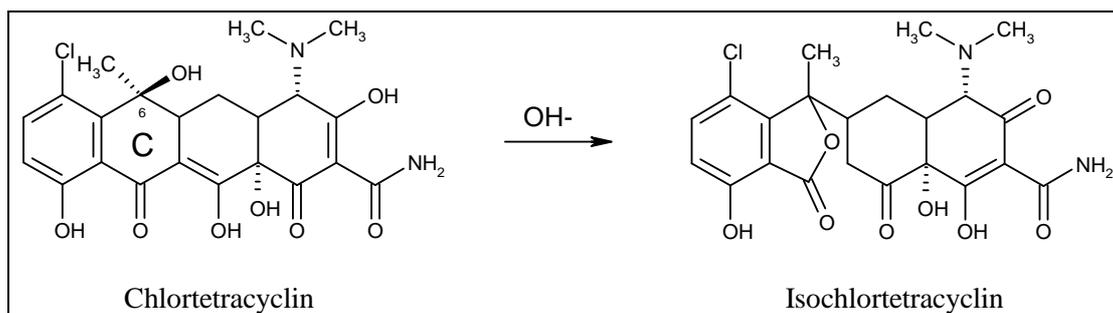


Abbildung 2-5 Bildung des Isochlortetracyclins aus Chlortetracyclin im alkalischen Milieu

Chlortetracyclin beginnt bereits bei einem pH-Wert von 7,5 und bei Temperaturen oberhalb von Raumtemperatur zu isomerisieren [12] und ist damit besonders anfällig für diese Reaktion. Tetracyclin und Oxytetracyclin sind weitaus stabiler. Sie beginnen unter gleichen Bedingungen erst ab pH 9 bis 10 zu isomerisieren. Tetracycline ohne Methylgruppe an C6 zeigen eine erhöhte Stabilität [12].

Die Isomerisierung ist nicht reversibel, allerdings können diese Iso-Formen reversibel epimerisieren. So entsteht z.B. das 4-epi-Isochlortetracyclin.

#### 2.2.2.4 Bildung von Anhydrotetracyclinen

Unter stark sauren Bedingungen ( $\text{pH} \leq 2$ ) bilden Tetracycline mit einer Hydroxygruppe an C6 Anhydrotetracycline. Diese Reaktion verläuft unter Aromatisierung des Ringes C durch Wasserabspaltung. Sie ist in Abbildung 2-6 am Beispiel des Tetracyclins dargestellt.

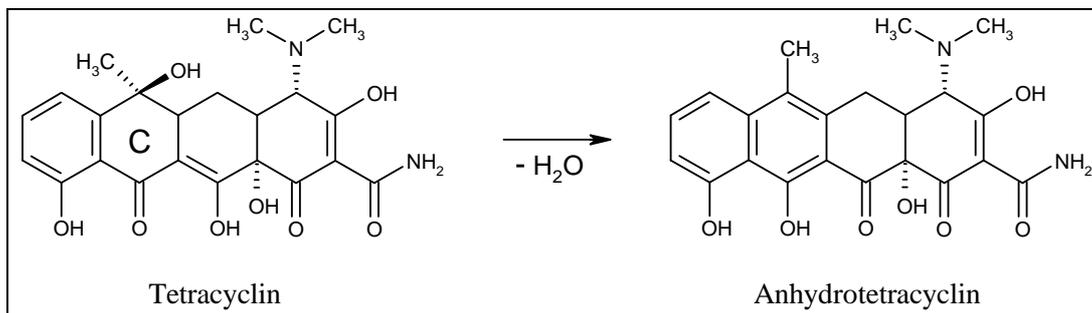


Abbildung 2-6 Bildung von Anhydrotetracyclin aus Tetracyclin bei Anwesenheit starker Säuren

Die Bildung von Anhydrotetracyclinen wird durch Erwärmen gefördert und ist irreversibel [12]. Auch die Anhydrotetracycline können epimerisieren.

Die Anhydro-Form des Oxytetracyclins ist in wässrigen Lösungen nicht stabil. Sie reagiert aufgrund der OH-Gruppe an C5 unter Spaltung des Ringes B in einer raschen Folgereaktion zum apo-Oxytetracyclin (siehe Abbildung 2-7).

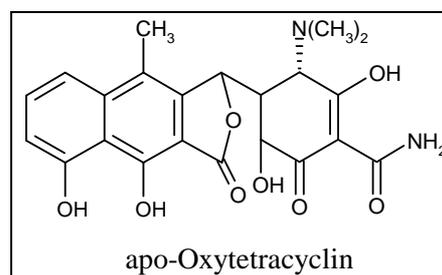


Abbildung 2-7 Struktur von apo-Oxytetracyclin

Die Anhydrotetracycline und die 4-epi-Anhydrotetracycline weisen bakterizide Wirkung auf. Diese ist jedoch nicht auf die Interaktion mit Ribosomen (wie in Abschnitt 2.3.5, Seite 15 dargestellt) zurückzuführen, sondern ergibt sich aus ihrer Fähigkeit, Zellen zu lysieren, was vermutlich auf eine Zerstörung des Membranpotentials zurückzuführen ist [17]. Sie haben

jedoch keine medizinische Bedeutung, da sie sowohl phototoxisch als auch hepatotoxisch sind [3].

### 2.2.3 Komplexbildung

Tetracycline sind starke Komplexbildner. Sie bilden mit Kationen und Anionen, aber auch mit nieder- und hochmolekularen Stoffen reversible Komplexe. Tabelle 2-4 gibt eine Auswahl an Stoffen wieder, die mit Tetracyclinen einen Komplex bilden [12].

Metallkationen	$\text{Fe}^{3+}$ , $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Be}^{2+}$ , $\text{Al}^{3+}$ , $\text{Zr}^{4+}$ , $\text{Tc}^{4+}$
Anionen	Phosphat, Citrat, Salicylat, p-Hydroxybenzoat, Sacharin-Anionen
Neutralstoffe	Coffein, Harnstoff, Thioharnstoff, Polyvinylpyrrolidon
Biopolymere	Serumalbumin, Lipoproteine, Globuline, RNA

**Tabelle 2-4 Auswahl an Stoffen, die mit Tetracyclinen Komplexe bilden**

Die Komplexbildung ist von der Art des Stoffes und dem pH-Wert der Lösung abhängig. Im pH-Bereich zwischen 3 und 7,5 ist die Bindung des Kations an das Phenol-Diketon-System der Ringe BCD thermodynamisch begünstigt [3; 12]. Bei weiter ansteigendem pH-Wert wird die Dimethylaminogruppe deprotoniert, und ein weiteres Kation kann zwischen dieser Gruppe und der dazu cis-ständigen Hydroxygruppe an C12a komplexiert werden. Die 4-Epimere der Tetracycline sind nicht in der Lage, dieses weitere Metallkation zu binden und zeigen deshalb nur ein Bindungsverhältnis von 1:1. Oxytetracyclin kann aufgrund seiner Hydroxygruppe an C5 bei Werten oberhalb von pH 7 zwischen dieser und der Hydroxygruppe an C12a ein zusätzliches Metallkation binden [12].

Die Komplexbildung von Metallkationen verstärkt die Eigenfluoreszenz der Tetracycline um etwa den Faktor 5. Dieser Effekt lässt sich analytisch für den Nachweis von Tetracyclinen ausnutzen [18].

Die reversible Bindung an Plasmaproteine ist abhängig von pH-Wert und Temperatur, ebenso wie von der Lipophilie des Tetracyclins. Sie reicht von 20 % bei z.B. Oxytetracyclin und geht bis zu 90 % bei dem lipophilen Doxycyclin [12; 19].

## 2.3 Biologische Wirkung

Alle Tetracycline weisen den gleichen Wirkmechanismus auf, der primär auf eine reversible Hemmung der Proteinbiosynthese zurückzuführen ist. Sie unterscheiden sich lediglich in ihren pharmakokinetischen Eigenschaften wie Resorption, Gewebediffusion und Elimination [12; 20].

### 2.3.1 Struktur-Wirkungsbeziehung

Im Laufe der Suche nach neuen Tetracycline hat man eine Vielzahl von Derivaten hergestellt. Aus diesen Versuchen sind die Strukturmerkmale bekannt, die für die antibakterielle Aktivität der Tetracycline unerlässlich sind. Das einfachste noch biologisch aktive Tetracyclin ist das Sancyclin (Abbildung 2-8). Es weist quasi nur die Strukturmerkmale auf, die für die antibiotische Wirkung notwendig sind.

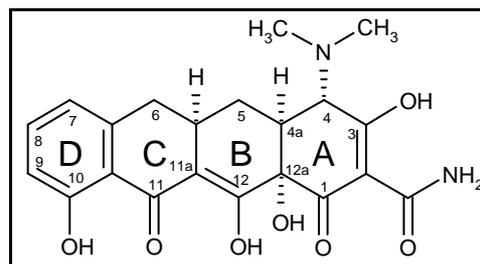


Abbildung 2-8 Struktur von Sancyclin

Eine wesentliche Voraussetzung für die antibiotische Wirkung der Tetracycline ist die lineare Anordnung der 4 sechsgliedrigen Ringe. Alle synthetischen Derivate mit weniger als 4 Ringen sind wirkungslos. Zudem ist es unabdingbar, dass Ring D aromatisch ist. Neben dem Ringsystem ist auch die stereochemische Anordnung bestimmter Gruppen für die antibakterielle Aktivität ausschlaggebend. So weisen alle natürlich vorkommenden Tetracycline eine stereochemische Ausrichtung der Kohlenstoffe 4a und 12a auf, die Ring A aus der planaren Anordnung der Ringe B bis D heraushebt. Wird Ring A z.B. durch eine Aromatisierung – wie es im Anhydrotetracyclin der Fall ist - in die Ebene der anderen Ringe hineingedrückt, so geht die Fähigkeit zur Hemmung der Proteinbiosynthese vollständig verloren [12]. Ebenso ist eine  $\alpha$ -Konfiguration der Dimethylaminofunktion an C4 wichtig. Die 4-Epimere ( $\beta$ -Konfiguration) der Tetracycline weisen eine stark verminderte antibiotische Aktivität auf [12]. Tetracycline, denen die Dimethylaminogruppe an C4 gänzlich fehlten,

weisen keine Aktivität gegenüber Prokaryoten auf. Diese Tetracycline sind jedoch in der Lage, eukaryotische Zellen anzugreifen [3].

Bei Betrachtung der unterschiedlichen Tetracycline fällt auf, dass die Substituenten an den Kohlenstoffatomen C10 – C12a und C1, 3 und 4 stark konserviert sind. In der Tat sind fast alle Gruppen hier für die Erhaltung der antibiotischen Aktivität notwendig. So sind z.B. Tetracyclin-Derivate ohne Keto-Enol-System zwischen den Gruppen an C11, C11a und C12 unwirksam. Eine Verlängerung oder Verkürzung dieses chromophoren Systems – wie z.B. bei 12a-Desoxytetracyclin oder bei den 11a Halogentetracyclinen – vermindert die Wirkung stark. Eine Zerstörung des Systems, wie es bei den Isotetracyclinen der Fall ist, führt zum völligen Aktivitätsverlust [12].

Zusammenfassend sei gesagt, dass neben dem 4-Ringsystem auch die Substituenten der Kohlenstoffatome 1, 3, 4a, 10, 11 und 12 nicht verändert werden dürfen, ohne zumindest erhebliche Einbußen der biologischen Aktivität hinnehmen zu müssen. Die Substituenten an den C-Atomen 5, 6, 7, 8 und 9 können variiert werden, um neue Tetracycline mit veränderten pharmakologischen Eigenschaften zu erhalten (siehe hierzu auch Tabelle 2-1, Seite 3).

### 2.3.2 Pharmakokinetik

Nach der Gabe von Antibiotika an Säugetiere werden diese Stoffe in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren im Organismus resorbiert, verteilt, metabolisiert und wieder ausgeschieden. Dabei hängt die Metabolisierung des als Muttersubstanz bezeichneten Ausgangsstoffes stark von Spezies, Geschlecht, Alter, Ernährung usw. ab [21].

Tetracycline werden bevorzugt oral appliziert. Oxytetracyclin, Lymecyclin, Doxycyclin und Minocyclin stehen auch für die parenterale Verabreichung zur Verfügung und Rolitetracyclin wird ausschließlich parenteral verabreicht [22; 23].

Die Resorption erfolgt aus Magen, Duodenum und Dünndarm. Sie ist stark abhängig vom Füllungszustand des Magens und der Zusammensetzung der Speisen und unterliegt somit erheblichen Schwankungen. Die gleichzeitige Gabe von Citronensäure kann die Serumkonzentration von Chlortetracyclin erhöhen [24], während Milch und Milchprodukte und Eisenpräparate aufgrund der Bildung schwer löslicher Chelate die Resorption verringern [19]. Unter optimalen Bedingungen liegt die Resorption von Tetracyclinen beim Menschen zwischen 30 % (Chlortetracyclin) und 80 % (Tetracyclin bzw. Oxytetracyclin) [25]. Bei Doxycyclin und Minocyclin kann eine Resorptionsrate von mehr als 90 % erreicht werden

[19; 20]. Ihre Resorption ist weitgehend unabhängig von der Zusammensetzung der Mageninhalt. Dies kann zum Teil darauf zurückgeführt werden, dass Komplexe von Doxycyclin mit Metallkationen in der sauren Umgebung des Magens nicht stabil sind [20].

Die Verteilung der Tetracycline im Körper ist von der Gewebeart abhängig. So wird im Sputum eine hohe Tetracyclin-Konzentration festgestellt (bis zu 20 % der Serumkonzentration), was die gute Wirksamkeit von Tetracyclinen bei Atemwegsinfektionen erklärt [11]. Sie erreichen auch intrazelluläre Erreger wie z.B. Chlamydien oder Brucellen. Kelly und Kanegis fanden bei Hunden die höchsten Konzentrationen in Niere, Leber und Gallenblase [26]. Tetracycline sind aufgrund ihrer Fähigkeit, mit zweiwertigen Metallkationen stabile Komplexe zu bilden, in der Lage, sich an Knochen und Zahnschmelz anzulagern. Dabei bilden sie antibakteriell inaktive, gelb gefärbte Tetracyclin-Calcium-Orthophosphat-Chelate und beeinflussen das Knochenwachstum und die Dentinbildung [19; 27; 28].

Während ihrer Passage durch den Organismus unterliegen die Tetracycline unterschiedlich stark der Metabolisierung. Während bei Tetracyclin, Rolitetracyclin und Oxytetracyclin kaum eine Metabolisierung stattfindet [19; 29], wird Chlortetracyclin zu einem erheblichen Teil umgewandelt. Eisner und Wulf fanden im Urin von Ratten zwischen 23-35 % 4-Epi-Chlortetracyclin und bei Hunden sogar 31-60 % [29]. Zurhelle et al. fanden 2000, dass zwischen 12 und 20 % des gesamten Chlortetracyclin-Rückstands im Dotter von Legehennen als 4-Epimer vorlag [30], während Kennedy et al. [31; 32] in zwei Studien nur einen sehr geringen Teil des applizierten Chlortetracyclins in Form der Muttersubstanz oder deren 4-Epimers im Ei wieder finden konnten. Als Hauptmetabolite zeigten sich hier wie auch bei Zurhelle das Isochlortetracyclin und das 4-Epi-Isochlortetracyclin. Die Demethylierung des Chlortetracyclins am Stickstoff des C4-Substituenten konnte ebenfalls in geringem Umfang nachgewiesen werden [33].

Das Minocyclin ist ein weiteres Tetracyclin, das in starkem Umfang metabolisiert wird. Die menschliche Leber ist in der Lage, das Minocyclin unter Bildung von bis zu 6 Metaboliten abzubauen [19]. Dabei wird als Hauptmetabolisierung die Hydroxylierung an C9 und die Demethylierung des Stickstoffs in der 4er-Position beschrieben [20; 34; 35]. Das ähnlich lipophile Doxycyclin hingegen wird nur in sehr geringem Umfang metabolisiert [19]. Böcker konnte 1983 einen Metaboliten in menschlichem Urin nachweisen, der etwa 8 % der verabreichten Menge an Doxycyclin ausmachte [36]. Er vermutete, dass es sich um ein an der Dimethylaminofunktion mono-demethyliertes Derivat handelte.

Die Exkretion von Tetracyclin, Oxytetracyclin und Rolitetracyclin und deren Metabolite findet hauptsächlich renal statt. Nur ein kleiner Teil lässt sich in den Fäzes wieder finden. Einschränkungen der Nierenfunktion kann deshalb bei diesen Tetracyclinen zu einer Verlängerung der Plasmahalbwertszeit und damit auch zu einer unerwünschten Erhöhung der Plasmakonzentration führen [19]. Rückstände von Chlortetracyclin und seiner Metabolite lassen sich zum größeren Teil im Fäzes finden. Aber auch über die Niere wird ein Teil des Chlortetracyclins ausgeschieden [37]. Doxycyclin wird in ungeladener Form hauptsächlich über die Niere ausgeschieden [20].

### **2.3.3 Wirkungsspektrum und Anwendungsgebiete in der Veterinärmedizin**

Tetracycline zeigen Wirkung gegen eine Vielzahl grampositiver und gramnegativer Bakterien sowie Rickettsien, Mykoplasmen und Spirochäten, wohingegen sie in der Wirkung gegen Pseudomonaden, Proteus und Salmonellen Lücken aufweisen. Mycobakterien, Protozoen, Pilze und Hefen sind von Natur aus resistent gegen Tetracycline [1; 12; 38].

Tetracycline werden in der Veterinärmedizin zumeist für die Behandlung von Infektionen des gastrointestinalen und des Atmungstraktes ebenso wie bei Hautinfektionen, aber auch bei systemischen Infektionen und Sepsen eingesetzt [1]. In subtherapeutischen Dosen zeigen Tetracycline einen wachstumsfördernden Effekt, was zusätzlich zu ihrer raschen Verbreitung in der Veterinärmedizin beitrug. Der Einsatz als Wachstumsförderer ist jedoch innerhalb der EU untersagt [39].

### **2.3.4 Aufnahme von Tetracyclin in die Bakterienzelle**

Es ist bereits seit längerem bekannt, dass Tetracyclin von sensitiven Zellen im Cytoplasma angereichert werden [40]. Dabei stellt man ansteigende Konzentrationen vom äußeren Medium über das Periplasma bis zum Cytoplasma des Bakteriums fest. Die Aufnahme von Tetracyclin in die Zelle scheint energieabhängig zu sein, da sie gegen ein Konzentrationsgefälle verläuft. Bei gramnegativen Bakterien gelangt das Antibiotikum zunächst als positiv geladener Komplex mit einem zweiwertigen Metallkation (vermutlich Magnesium) passiv durch in der Zellwand lokalisierte Porin-Kanäle in das Periplasma [1; 40; 41; 42]. Diese Passage wird durch das Donnan-Potential der Zellwand unterstützt, welches dafür sorgt, dass positiv geladene Substanzen ins Zellinnere „gesogen“ werden. Der Weg durch die Cytoplasmamembran geschieht vermutlich ohne die Beteiligung von spezifischen Carrier-

Proteinen. Diese konnten bislang nicht entdeckt werden. Hier schlagen Yamaguchi et al. [40] die pH-Differenz zwischen Cytoplasma und Periplasma als treibende Kraft vor. Sie konnten nachweisen, dass die Aufnahme von Tetracyclin in die Zelle vermindert wird, wenn der pH-Wert des äußeren Mediums ansteigt. Der Grund hierfür liegt in der Natur der Tetracycline. Bei einem pH-Wert von 7,8, wie er im Cytoplasma vorkommt, liegt ein geringerer Teil des Tetracyclins in der neutralen Form vor als bei einem pH-Wert von 6,1, wie er im äußeren Medium häufig anzutreffen ist (siehe hierzu auch Abbildung 2-4 B, Seite 7). In neutraler Form kann das Tetracyclin besser durch die lipophile Membran gelangen, und es diffundiert in höherem Maße in die Zelle. Ebenfalls konnten Yamaguchi et al. [40] zeigen, dass ein Anstieg der Magnesiumionen-Konzentration im äußeren Medium zu einer verminderten Aufnahme führt, was darauf hindeutet, dass das Tetracyclin die Cytoplasmamembran in neutraler Form passiert. Im Cytoplasma ist der pH-Wert höher als im Periplasma, was dazu führt, dass das Tetracyclin wieder vermehrt als negativ geladenes Molekül vorliegt. Daher ist von einer Komplexierung mit Magnesium im Cytoplasma auszugehen [41]. Dieser Vorgang unterstützt die Anreicherung von Tetracyclin in der Bakterienzelle, da die Komplexierung von Tetracyclin die negativ geladene Form aus dem Gleichgewicht  $TC^0 \leftrightarrow TC^-$  herauszieht und damit auch die Konzentration der ungeladenen Form in der Zelle verringert. Bei Erreichen eines Gleichgewichtes aller Formen ist die Konzentration von Tetracyclin rechnerisch innerhalb der Zelle etwa doppelt so hoch wie im äußeren Medium [43]. Tatsächlich wurde von Anreicherungen um den Faktor 20 – 30 bei *Staphylococcus aureus* und sogar um den Faktor 100 bei *Escherichia coli* berichtet [38].

### 2.3.5 Wirkmechanismus

Befindet sich Tetracyclin in einer Bakterienzelle, ist es in der Lage, als Magnesiumkomplex an das bakterielle Ribosom zu binden und so die Proteinbiosynthese zu hemmen. Diese Hemmung ist reversibel [1; 41], daher führen nur hohe Antibiotikum-Konzentrationen zum Absterben des Bakteriums. Pioletti et al. [44] konnten 6 Bindungsstellen für Tetracyclin auf der kleinen ribosomalen Untereinheit identifizieren. Kolesnikov et al. [45] konnten noch weitere auf der großen Untereinheit nachweisen. Dabei zeigte sich eine Bindungsstelle an der Bindungsstelle für die Aminoacetyl-t-RNA-Moleküle<sup>1</sup> (a-site) auf der kleinen Untereinheit des Ribosoms als diejenige mit der höchsten Affinität. Für sie bestimmten Strel'tsov et al.

---

<sup>1</sup> Aminoacetyl-t-RNA-Moleküle transportieren die Aminosäuren in aktivierter Form zum Ribosom, wo diese miteinander zu einem Protein verknüpft werden.

[46] eine Bindungskonstante von  $1,3 \cdot 10^6$  L/mol. In der  $2 \times 0,7$  nm großen Bindetasche ist das Tetracyclin über ein Magnesiumion mit dem Zucker-Phosphatrückgrat der 16S RNA verbunden. Dabei bilden sich sowohl Salzbrücken zwischen dem Magnesium und den Phosphatgruppen der ribosomalen RNA als auch Wasserstoffbrücken zwischen den Sauerstoffatomen der polaren Unterseite des Tetracyclins und den Phosphatgruppen der r-RNA aus [47]. Die Bindung an der a-site des Ribosoms ist für die Hemmung der Proteinbiosynthese verantwortlich. Gebundenes Tetracyclin blockiert das Anbinden weiterer Aminoacyl-t-RNA-Moleküle [48], was zum Abbruch der naszierenden Peptidkette führt. Das Unvermögen, Proteine zu bilden, führt letztlich zum Absterben der Zelle.

Tetracycline haben neben dieser Hauptwirkung noch einige andere Wirkungsweisen. So sind sie auch in der Lage, mit Enzymen des Elektronentransports zu interagieren und die Synthese von Nukleinsäuren sowie der Zellwand zu hemmen [3]. Zudem wird eine Hemmung der oxidativen Phosphorylierung [12] sowie der Cytochrom-Oxidoreduktase beschrieben [3].

Trotz des unterschiedlichen Aufbaus von pro- und eukaryotischen Ribosomen konnte eine Beeinflussung durch Tetracycline auch bei Ribosomen in Säugetierzellen nachgewiesen werden [3]. Die Tatsache, dass Tetracycline dennoch eine hohe Selektivität für prokaryotische Zellen aufweisen, kann mit einer verminderten Sensibilität der Ribosome und einer geringeren Anreicherung des Antibiotikums in eukaryotischen Zellen begründet werden [11; 38].

### 2.3.6 Toxikologie

Die Tetracycline zeigen gegenüber Säugern eine geringe Toxizität. Das Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) von WHO und FAO hat einen ADI-Wert von  $0-3 \mu\text{g}/\text{kg}$  Körpergewicht für Oxytetracyclin, Chlortetracyclin und Tetracyclin einzeln oder in Kombination festgelegt. Er wurde auch für Doxycyclin übernommen [49]. Bisher konnte kein Hinweis auf eine Reproduktions- oder Genotoxizität der Tetracycline gefunden werden. Ebenso wurde keine cancerogene Wirkung nachgewiesen [50; 51].

## 2.4 Tetracyclin-Resistenz

Bereits kurz nach dem ersten Einsatz von Tetracyclinen zur Therapie traten die ersten Resistenzen auf. 1953 wurde *Shigella dysenteriae* mit einer Tetracyclin-Resistenz isoliert und schon 2 Jahre später trat ebenfalls in einem *Shigella*-Bakterium die erste Multidrugresistenz gegen Tetracyclin, Streptomycin und Chloramphenicol auf [52]. Lima et al. [53] stellte 1995 eine Studie vor, in der bereits über 64 % der isolierten *Shigella flexneri*-Bakterien die gleiche Multidrugresistenz trugen. Hauptgrund für die rasche Verbreitung – auch zwischen unterschiedlichen Bakteriangattungen – ist die Tatsache, dass sich Tetracyclin-Resistenzen meist auf so genannten mobilen Elementen wie Transposone oder Plasmide befinden. Diese können über den horizontalen Gentransfer von einem Bakterium zum anderen weitergegeben werden. Oft befinden sich auf diesen mobilen Elementen mehrere Resistenzgene gleichzeitig [11; 52].

Bakterien können auf unterschiedlichem Wege gegen Tetracycline Resistenzen entwickeln. Die 3 häufigsten Mechanismen sind

- 1) Reduktion der Antibiotika-Konzentration im Cytoplasma
  - a) durch geringe Permeabilität der Zellwand
  - b) durch aktives Ausschleusen des Antibiotikums (Efflux)
- 2) Schutz des Ribosoms durch spezielle Proteine und
- 3) enzymatische Inaktivierung des Tetracyclins.

Bis heute sind 38 unterschiedliche Gene für eine Tetracyclin- oder Oxytetracyclin-Resistenz bekannt. Dabei stellen die Gene, die für Effluxproteine codieren, mit 60 % den größten Anteil. 11 Gene codieren für Proteine, die das Ribosom schützen, und nur 3 Gene codieren für Inaktivierungs-Enzyme. Ein Gen konnte bisher noch keiner dieser Gruppen zugeordnet werden. Der durch dieses Gen bewirkte Resistenzmechanismus ist bisher noch ungeklärt [54].

### 2.4.1 Reduktion der Antibiotika-Konzentration im Cytoplasma

#### 2.4.1.1 Geringe Permeabilität der Zellwand

Grampositive und gramnegative Bakterien unterscheiden sich sehr stark im Aufbau ihrer Zellwand. Grampositive Bakterien besitzen mit ihrer stark ausgeprägten Peptidoglycanschicht einen Schutz vor dem Eindringen von Molekülen mit Massen von mehr als 100 kDa. Kleine

Moleküle wie z.B. Tetracyclin gelangen hingegen ungehindert hindurch [41]. Gramnegative Bakterien haben mit ihrer Zellwand hingegen eine wirksame Barriere für hydrophobe Substanzen. Um trotzdem für die Zelle lebensnotwendige Stoffe aufzunehmen, weisen diese Bakterien Porin-Kanäle auf. Durch diese gelangt auch das Tetracyclin in die Zelle. In der Zellwand von *Pseudomonas aeruginosa* fehlen die Porin-Kanäle. In Folge dessen zeigen diese Bakterien eine erhöhte Resistenz gegen viele antibiotische Substanzen. Mycobakterien besitzen von Natur aus eine Zellwand, die nur eine sehr geringe Permeabilität aufweist. Auch hier ist die Resistenz gegen viele Antibiotika gesteigert [43].

Bei den meisten resistenten Bakterien mit verminderter Permeabilität der Zellwand treten zusätzlich noch weitere Resistenzmechanismen auf.

#### **2.4.1.2 Ausschleusen des Antibiotikums (Efflux)**

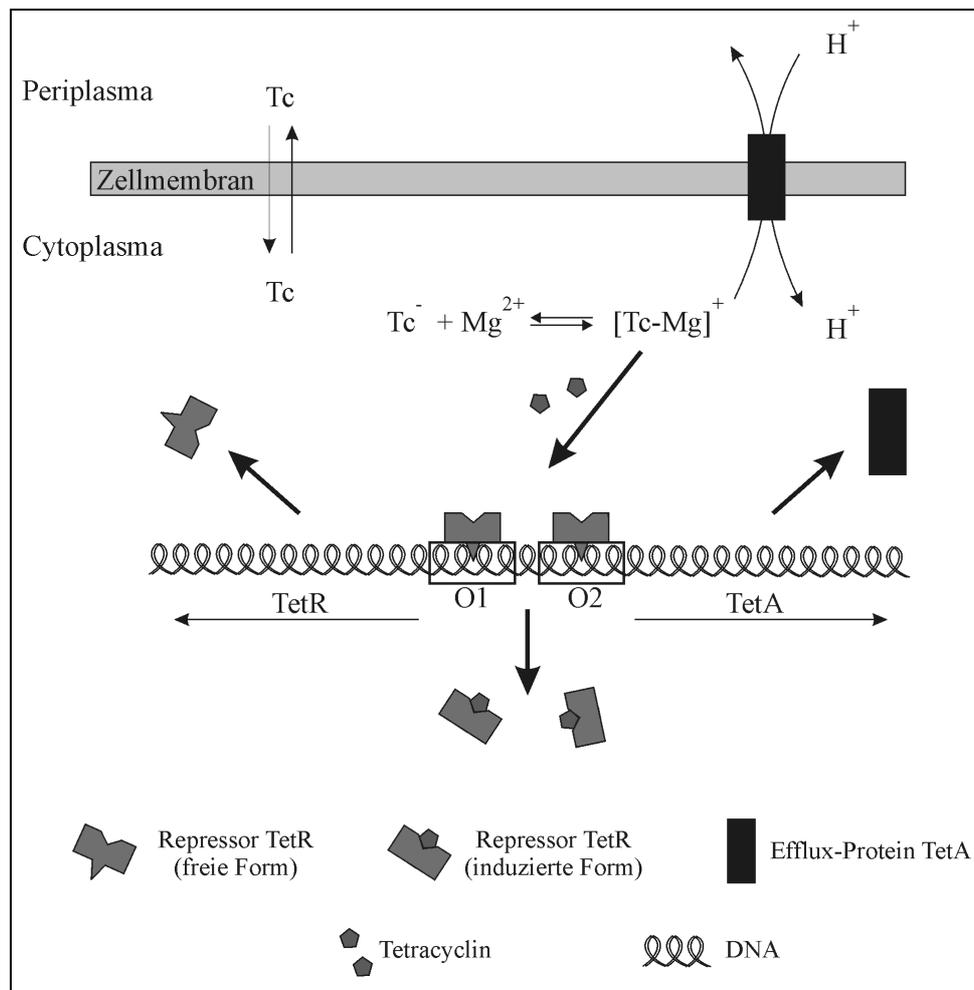
Das Ausschleusen des Antibiotikums ist der häufigste Resistenzmechanismus bei gramnegativen Bakterien. Aber auch bei grampositiven Bakterien wurden bereits Effluxpumpen identifiziert.

Bei den Effluxpumpen handelt es sich um membrandurchspannende Proteine, die Tetracyclin energieabhängig gegen Protonen austauschen. Dabei wurde am Beispiel des Effluxproteins TetA nachgewiesen, dass der Austausch des Protons elektrochemisch neutral gegen den positiv geladenen  $[\text{TC-Mg}]^+$ -Komplex im Verhältnis 1:1 geschieht [55]. Würden sich diese Protonenpumpen ständig in der Zellmembran befinden, könnten auch bei Abwesenheit von Tetracyclin  $\text{H}^+$ -Ionen in die Zelle gelangen, was zu einer Beeinträchtigung des Membranpotentials führen würde [56]. Aus diesem Grund unterliegt die Expression der Effluxproteine einer strengen Kontrolle. Die Bakterienzelle bildet das Effluxprotein nur dann, wenn Tetracyclin eindringt. Um einen wirksamen Schutz gegen Tetracyclin zu gewährleisten, muss die Bildung des Effluxproteins bereits bei einer Konzentration beginnen, bei der noch keine Hemmung der Proteinbiosynthese erfolgt. Die Expressionskontrolle der Effluxproteine sei im Folgenden am Beispiel des TetA ausführlich beschrieben.

Zum besseren Verständnis wird hier in Übereinstimmung mit der Literatur das Gen einer Resistenzdeterminante klein geschrieben und mit kursiven Lettern dargestellt, während das entsprechende Protein groß geschrieben wird.

Das Gen, welches für das Effluxprotein TetA codiert, befindet sich hinter einer kurzen Operator-Sequenz O2 (siehe Abbildung 2-9), auch *tetO2* genannt. Diese Sequenz ist bei

abgeschaltetem Gen mit einem Protein besetzt, welches ein Ablesen des Gens verhindert. Das an die DNA gebundene Protein bezeichnet man als Tetracyclin-Repressor TetR. Das Gen für dieses Protein wiederum befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft aber in entgegengesetzter Ableserichtung zum *tetA*-Gen und wird über eine Operatorsequenz O1 gesteuert. An *tetO1* kann das gleiche Repressor-Protein TetR binden wie an *tetO2*.



**Abbildung 2-9 Schematische Darstellung des Tetracyclin-Resistenzmechanismus in gramnegativen Bakterien [57]. Beschreibung siehe Text.**

Gelangt Tetracyclin in die Bakterienzelle, so bildet sich im Cytoplasma ein Magnesium-Komplex  $[TC-Mg]^+$ . Dieser Komplex kann an TetR binden, was zu einer Konformationsänderung des Proteins führt. Dadurch löst sich TetR von der DNA. Nun sind die *tetO*-Sequenzen O1 und O2 unbelegt und die Gene für TetA und TetR können abgelesen werden. Das nun gebildete Effluxprotein wandert zur Zellmembran, wird dort eingebaut und beginnt, Tetracyclin im Austausch von Protonen aus der Zelle auszuschleusen. Der neu gebildete Repressor TetR hat zum einen die Aufgabe, zusätzlich zu TetA das Antibiotikum abzufangen und damit für die Zelle unschädlich zu machen. Dies ist möglich, da TetR eine ca. 1000-fach

höhere Affinität zum Tetracyclin aufweist als das Ribosom [57]. Zum anderen gewährleistet zusätzlich gebildetes TetR durch Bindung an den Operator O<sub>2</sub> eine sofortige Abschaltung der Expression des *tetA*-Gens, wenn die Tetracyclin-Konzentration in der Zelle wieder unter ein kritisches Niveau gesunken ist.

Die Steuerung der Expression von Effluxproteinen kann jedoch auch auf anderem Wege geschehen. Im Falle des *tet(35)*, ein Gen für eine Effluxpumpe, die ebenfalls in gramnegativen Bakterien gefunden wurde, wird anstelle eines Repressors ein Protein exprimiert, welches die Aufgabe zu haben scheint, die Effluxpumpe nach der Expression zu aktivieren [58]. Manche grampositiven Bakterien kontrollieren die Expression der Effluxproteine über einen attenuativen Mechanismus. Bei diesem Prozess geschieht die Steuerung auf der Ebene der m-RNA. Für nähere Informationen zu diesem Mechanismus sei auf die zitierte Literatur verwiesen [59; 60; 61].

#### **2.4.2 Ribosomale Schutzproteine**

Eine Gruppe von Resistenzgenen, die sowohl bei gramnegativen als auch bei grampositiven Bakterien gefunden wurde, codiert für ribosomale Schutzproteine [1; 41]. Die genaue Wirkung dieser Proteine ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Man geht jedoch davon aus, dass Tetracyclin bei seiner Bindung an das Ribosom dieses in seiner Konformation so verändert, dass kein Anbinden von Aminoacetyl-t-RNA mehr möglich ist. Dies führt zum Abbruch der Elongation und damit zum Erliegen der Proteinbiosynthese. Die Schutzproteine ihrerseits sind in der Lage, die Konformation des Ribosoms an der Tetracyclin-Bindestelle so zu verändern, dass sich dieses vom Ribosom ablöst. Damit ist wieder eine ungehinderte Proteinbiosynthese möglich [54].

Es ist bis heute weder geklärt, ob die Schutz-Proteine aktiv ein erneutes Binden von Tetracyclin an das Ribosom verhindern können, noch ob ein einmal abgelöstes Tetracyclin überhaupt dazu in der Lage wäre [54].

#### **2.4.3 Enzymatische Inaktivierung**

Die enzymatische Inaktivierung von Tetracyclin verursacht die am seltensten vorkommende Resistenz. Es sind bisher nur 3 Gene entdeckt worden, die zu diesem Typ gehören. Dabei handelt es sich in zwei Fällen um eine Oxidoreduktase, die in Gegenwart von Sauerstoff und

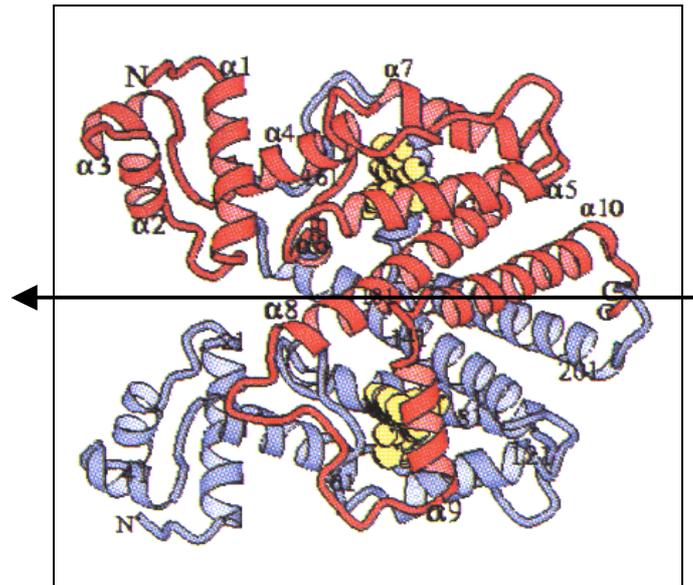
NADPH Tetracyclin inaktiviert [62; 63]. Durch welche chemische Umwandlung von Tetracyclin das dritte Gen eine Resistenz ausbildet, ist bisher noch nicht geklärt [64].

## 2.5 Das Operator-Repressor-System

### 2.5.1 Tetracyclin-Repressoren

Von den Tetracyclin-Repressor-Proteinen konnten bis heute 7 verschiedene Varianten identifiziert werden, die man in die Klassen A bis E sowie G und H einteilt. Unter diesen Varianten besteht zum Teil eine sehr hohe Homologie in ihrer Aminosäuresequenz. Diese reicht von 45 % bis hin zu 75 % und zeigt die größte Sequenzidentität in den Bereichen, die entweder an der Bindung zum Operator oder an der Bindung des Tetracyclins beteiligt sind. Die Gesamtlänge der Peptidketten aller TetR-Varianten liegt im Bereich von 207 bis 218 Aminosäuren. Die hohe Homologie innerhalb der Tet-Repressoren lässt darauf schließen, dass alle Varianten eine sehr ähnliche globuläre Struktur aufweisen. Wie durch Röntgenstrukturanalysen an den Klassen B und D [65; 66; 67] gezeigt wurde, bestehen die Repressoren aus zwei identischen Untereinheiten, wodurch sich eine Rotationssymmetrie ergibt, wie in Abbildung 2-10 zu erkennen ist. Jede dieser Untereinheiten weist 10  $\alpha$ -Helices auf, die durch ungeordnete Bereiche voneinander getrennt sind. Weitere Sekundärstrukturen konnten nicht gefunden werden. Zur Aminosäuresequenz und deren Beteiligung an den  $\alpha$ -Helices der beiden Repressor-Varianten TetR(B) und TetR(D) siehe auch Abbildung 6-5 in Abschnitt 6.2 (Seite 65).

Der Tet-Repressor ist in zwei Bereiche aufgeteilt. Die bei beiden Untereinheiten aus dem globulären Molekül herausragenden  $\alpha$ -Helices 1, 2 und 3 sind für die Bindung an den *tet*-Operator verantwortlich. Dabei übernehmen die beiden Helices  $\alpha_3$  und  $\alpha_3'$  die eigentliche Erkennung der DNA. Der durch die restlichen Helices gebildete Bereich weist die Bindestelle für das Tetracyclin auf und leitet das Induktionssignal infolge der Bindung des  $[\text{TC-Mg}]^+$ -Komplexes zu den Helices 1 bis 3 weiter.



**Abbildung 2-10** Struktur des Repressors TetR(D) im Komplex mit zwei Tetracyclin-Molekülen (gelb). In rot und blau dargestellt sind jeweils die beiden Untereinheiten des Proteins. Die Lage der  $\alpha$ -Helices der roten Untereinheit ist mit  $\alpha 1$  bis  $\alpha 10$  gekennzeichnet. Ebenfalls sind Beginn und Ende der Aminosäurekette mit N für den N-Terminus und C für den C-Terminus eingezeichnet. Der Pfeil deutet die Rotationsachse des Komplexes an. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. W. Saenger, Freie Universität Berlin)

Jede Untereinheit weist eine Bindetasche für Tetracyclin auf. Diese wird von den Helices  $\alpha 5$  bis  $\alpha 8$  und den Helices  $\alpha 8$  und  $\alpha 9$  der jeweils anderen Untereinheit gebildet. Bei der Bindung des Induktors  $[\text{TC-Mg}]^+$  verschiebt sich Helix  $\alpha 9$  so, dass der Eingang zur Bindetasche verschlossen wird. Das Tetracyclin wird so völlig von TetR umschlossen [65].

Für die Bindung des  $[\text{Mg-TC}]^+$ -Komplex an den Repressor TetR(BD) (einer synthetischen Chimäre der beiden natürlichen Repressoren TetR(B) und (D), siehe Abschnitt 6.3, Seite 64) wurde von Scholz et al. [68] eine Affinitätskonstante von  $5,3 \cdot 10^9$  L/mol bestimmt.

Für die Induktion ist je Tetracyclin-Molekül ein zweiwertiges Metallkation unabdingbar [69]. Die Bindungsaffinität von Tetracyclin zum Repressor fällt bei Abwesenheit von  $\text{Mg}^{2+}$  unter  $10^5$  L/mol [70]. Allerdings ist das Magnesium durch andere zweiwertige Metallkationen ersetzbar [70]. So konnten Ettner et al. [71] zeigen, dass die Bindung von Tetracyclin zu  $\text{Fe}^{2+}$  rund 100-fach stärker als zu  $\text{Mg}^{2+}$  ist und sogar zu einer mindestens 1000-fach erhöhten Induktion führt.



in die Bindetasche des Repressors ein. Das an das Phenol-Diketon-System der Ringe BCD des Tetracyclins gebundene Magnesium bindet an die  $\alpha$ -Helix 6 des Repressors. Diese Helix wird dadurch verschoben. Es verformt sich das gesamte Molekül und der Abstand zwischen den beiden  $\alpha$ -Helices 3 beider Repressor-Untereinheiten vergrößert sich um ca. 3 Å. Dadurch wird die Bindungsaffinität zwischen TetR und *tetO* um 6 bis 10 Größenordnungen herabgesetzt [57], was zur Ablösung des Repressors von der DNA führt. Daraufhin kann die Genexpression des Effluxproteins beginnen.

Dieser Vorgang – und damit das „Einschalten“ des Resistenzmechanismus – beginnt bereits ab einer Tetracyclin-Konzentration in der Bakterienzelle von ca. 1  $\mu\text{mol/L}$  [65].

## **2.6 Rechtliche Regelungen zum Einsatz von Tetracyclinen bei lebensmittelliefernden Tieren**

Die zu den Breitbandantibiotika gehörenden Tetracycline werden in der Veterinärmedizin mengenmäßig am meisten eingesetzt [2]. Sie sind kostengünstig herzustellen und weisen nur eine geringe Toxizität und wenige Nebenwirkungen auf. Tetracycline werden sowohl zur Behandlung als auch zur Prophylaxe von Infektionskrankheiten vor allem des Magen-Darm-Traktes und der respiratorischen Organe eingesetzt [1]. Für die Behandlung von lebensmittelliefernden Tieren mit pharmakologisch wirksamen Substanzen bestehen besondere rechtliche Regelungen, die dafür sorgen, dass der Konsument vor zu hoher Belastung mit Rückständen in tierischen Lebensmitteln geschützt ist. Dazu wurden auf der Basis der toxikologischen Bewertung des jeweiligen Arzneimittelwirkstoffes Höchstmengen (MRL-Werte = maximum residue limit) eingeführt, bei deren Einhaltung keine Gefahr für den Verbraucher besteht. In den Anhängen I und II der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates „Zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs“ [74] sind die MRL-Werte aufgelistet.

Tabelle 2-5 gibt einen Überblick zu den MRL-Werten der in der EU zugelassenen Tetracycline für die verschiedenen Lebensmittel. Da die mikrobiologische Aktivität und die toxikologischen Eigenschaften der Tetracycline Oxytetracyclin, Tetracyclin und Chlor-tetracyclin untereinander eng korrelieren, wurden hier die selben MRL-Werte festgelegt. Diese gelten für die Summe aus Muttersubstanz und 4-Epimer, da sich dieses sowohl bei der Passage durch den tierischen Organismus als auch bei der Probenaufarbeitung bilden kann und mit der Muttersubstanz im Gleichgewicht steht. Die MRL-Werte für Doxycyclin sind

genauso hoch wie für die anderen Tetracycline. Jedoch ist seine Anwendung stärker eingeschränkt. Es ist nur für die Behandlung von Rind, Schwein und Geflügel zugelassen. Für die Behandlung von Milchvieh und Legehennen darf es nicht eingesetzt werden. Da das Doxycyclin bei der Probenaufarbeitung keine Epimerisierung zeigt, gelten die aufgelisteten MRL-Werte alleine für die Muttersubstanz [49].

Antibiotikum	Markersubstanz	Tierart	Lebensmittel	MRL-Werte [µg/kg]
Tetracyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin	Summe aus Muttersubstanz und 4-Epimer	Alle zur Lebensmittelerzeugung genutzten Arten	Niere	600
			Leber	300
			Muskel	100
			Milch	100
			Eier	200
Doxycyclin	Doxycyclin	Rind	Niere	600
			Leber	300
			Muskel	100
		Schwein / Geflügel	Niere	600
			Leber	300
			Fett und Haut	300
			Muskel	100

**Tabelle 2-5 MRL-Werte der Tetracycline in der EU**

Lebensmittel mit einem Rückstandsgehalt über dem MRL-Wert oder Lebensmittel, die ein nicht zugelassenes Antibiotikum enthalten, dürfen gemäß § 10 Abs. 1, Nr. 2 des Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuches (LFBG) [75] nicht in den Handel gelangen.

### 3 Rückstandsanalytik von Tetracyclinen

Die Rückstandsanalytik in tierischen Matrices umfasst eine Vielzahl von unterschiedlichen Verfahren. Diese lassen sich in zwei Bereiche unterteilen. Zunächst sind da die mikrobiologischen und immunchemischen Verfahren zu nennen. Diese beruhen meist auf Wechselwirkungen der Antibiotika mit Bakterienzellen (Hemmstofftests) oder mit

spezifischen Bindekomponenten wie z.B. Antikörpern oder Repressor-Proteinen. Sie lassen nur gruppenspezifische Nachweise zu und können nicht zwischen einzelnen Tetracyclinen unterscheiden. Daher werden sie meist zum Screening eingesetzt.

Für die rechtliche Beurteilung von positiven Rückstandsbefunden in der amtlichen Überwachung werden Verfahren verlangt, die Aufschluss über die chemische Struktur der Rückstände geben [76]. Hierzu sind mikrobiologische und immunchemische Verfahren nicht in der Lage. Diese Unterscheidungen können chemisch-physikalische Verfahren treffen, weshalb sie als Bestätigungsanalysen für positive Befunde aus zuvor durchgeführten Screening-Verfahren angewendet werden.

In der Literatur werden viele verschiedene Nachweisverfahren für Tetracycline in unterschiedlichen Lebensmitteln beschrieben. Für die Testentwicklung in dieser Arbeit wurden Honig und Rohmilch verwendet. Deshalb soll im Folgenden ein Überblick über die Nachweismöglichkeiten von Tetracyclinen in Lebensmitteln anhand dieser beiden Matrices gegeben werden. Für weitere Informationen sei auf Übersichtsartikel verwiesen [77; 78; 79]. Da in diesen Artikeln gerade die chromatographischen Methoden sehr ausführlich behandelt werden, soll hier nur ein kurzer Einblick der chromatographischen Verfahren gegeben werden.

### **3.1 Mikrobiologische und immunchemische Verfahren**

Mikrobiologische und immunchemische Testverfahren können Tetracycline nur in ihrer biologisch aktiven Form nachweisen. Viele dieser Verfahren lassen nur eine Ja/Nein-Entscheidung zu, ob sich in der Probe Tetracyclin oberhalb einer bestimmten Konzentration befindet.

Der Vorteil von mikrobiologischen und immunchemischen Verfahren ist, dass sie ohne aufwändiges Clean-up der Proben auskommen und somit für ein schnelles Screening besser geeignet sind als chromatographische Methoden.

#### **3.1.1 Hemmstofftests**

Mikrobiologische Hemmstofftests sind auch heute noch die am häufigsten angewandten Screening-Verfahren, da sie Informationen über das generelle Vorhandensein von unterschiedlichsten Antibiotika-Klassen bieten können. Es ist eine Vielzahl von kommerziell erhältlichen Hemmstofftests auf dem Markt, die zumeist für die Matrices Milch und Fleisch

optimiert sind. Zu nennen sind hier der BRT-Hemmstofftest [80], der Delvotest [81], der Copan Milk Test [82], der Eclipse 100-Test [83], der BR-Test [84] und der Cowside Test [85] für Milch und der Premitest [86] für Fleisch.

Bei Hemmstofftests wird das Wirkprinzip der Antibiotika, Bakterien in ihrem Wachstum zu hemmen, ausgenutzt. Die Proben werden auf einen mit Bakteriosporen beimpften Nährboden aufgebracht und anschließend für eine vorgegebene Zeitspanne bebrütet. Das Wachstum der Bakterien wird bei den oben genannten Tests indirekt durch den Farbumschlag eines dem Medium zugegebenen pH- oder Redox-Indikators sichtbar gemacht. Enthält eine Probe Antibiotika, so wird das Wachstum der Bakterien verhindert, und es zeigt sich kein Farbumschlag.

Bei dem in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB vorgeschlagenen Plättchentest [87] wird die Probe in der Mitte einer mit Sporen beimpften Agar-Platte aufgebracht und das Bakterienwachstum nach Inkubation über Nacht visuell beurteilt. Bei Anwesenheit eines Antibiotikums diffundiert dieses in dem Bereich um die aufgebrachte Probe in den Nährboden. An dieser Stelle wird das Bakterienwachstum gehemmt und es bildet sich der sog. Hemmhof.

Hemmstofftests detektieren generell Stoffe, die das Wachstum der Testkeime unter den Versuchsbedingungen verhindern oder hemmen. Dabei kann aufgrund der Testresultate keine Unterscheidung getroffen werden, ob die Hemmung aufgrund eines Antibiotikums zustande kommt oder auf andere Hemmstoffe wie z.B. Lysozym zurückzuführen ist. Eine höhere Nachweisempfindlichkeit für bestimmte Antibiotika-Gruppen ist über die Wahl des Testkeimes, des Mediums oder dessen pH-Wertes möglich [88; 89; 90]. Aber auch unter optimalen Bedingungen kann die Antibiotika-Klasse aufgrund von Hemmstofftests alleine nicht identifiziert werden. Es müssen weitere Analysen folgen.

Da Hemmstofftests auf der Hemmwirkung von Antibiotika beruhen, können nur biologisch aktive Formen der Antibiotika nachgewiesen werden. Inaktive Metabolite werden nicht detektiert.

### **3.1.2 Immunchemische Verfahren**

Immunchemische Verfahren verwenden gegen Tetracyclin gerichtete Antikörper zum Nachweis. Diese bilden klassenspezifisch mit Tetracyclinen einen Antigen/Antikörper-

Komplex, der auf verschiedene Weisen sichtbar gemacht werden kann. So wird beim Radioimmunoassay (RIA) beispielsweise ein radioaktiv markiertes Tetracyclin eingesetzt, welches mit Hilfe einer Szintillationsflüssigkeit detektiert wird [91]. Anstelle des Antigens Tetracyclin kann aber auch der Antikörper markiert werden. Dies geschieht zumeist durch Anbindung eines Enzyms, welches in einer folgenden Reaktion ein Substrat in ein farbiges oder fluoreszierendes Produkt umsetzt. So gelingt mittels des ELISA (= enzyme linked immunosorbent assay) der Nachweis von Tetracyclinen in Lebensmitteln [92; 93].

Die immunchemischen Verfahren bieten die Möglichkeit der Quantifizierung der Tetracycline. Da der verwendete Antikörper jedoch in unterschiedlichem Maße mit den einzelnen Tetracyclinen interagiert [94], ist eine Quantifizierung nur möglich, wenn bekannt ist, welches Tetracyclin sich in der Probe befindet.

### 3.1.3 Rezeptor-Tests

Eine weitere Möglichkeit, Tetracycline klassenspezifisch nachzuweisen, bieten Rezeptor-Tests. Diese nutzen Rezeptoren anstelle von Antikörpern, um Tetracycline zu binden. Der Charm-Test nutzt den natürlichen Bindungspartner – das Ribosom – als Rezeptor [95; 96]. Durch Konkurrenz mit zugesetztem radioaktiv markiertem Tetracyclin lässt sich die Konzentration des in der Probe enthaltenen Tetracyclins bestimmen.

Bei dem Tetrasensor handelt es sich um einen Schnelltest für Tetracycline im Format eines Teststäbchens. Dieser bietet die Möglichkeit, in flüssigen Proben ohne vorherige Probenaufarbeitung eine schnelle Ja/Nein-Entscheidung zu erhalten. Hierbei wird der Tetracyclin-Repressor als Bindungspartner für das Tetracyclin eingesetzt [97; 98; 99; 100]. Dieser wird mit kolloidalem Gold markiert und befindet sich mit der Probe in einer Lösung, in die das Teststäbchen gestellt wird. Auf dem Teststäbchen findet eine chromatographische Abtrennung von Matrixkomponenten statt, und TetR wandert auf dem Teststäbchen nach oben. Dort ist der Tetracyclin-Operator immobilisiert, an den der Repressor nur binden kann, wenn er in der Probenlösung kein Tetracyclin gebunden hat (siehe auch Kapitel 2.5.3, Seite 23).

## 3.2 Chemisch-physikalische Verfahren

Wie bereits erwähnt, sind die mikrobiologischen Verfahren nicht in der Lage, zwischen den einzelnen Tetracyclinen zu unterscheiden und können auch nur biologisch aktive Formen der

Tetracycline nachweisen. Für die eindeutige Identifizierung und zuverlässige Bestimmung des jeweiligen Wirkstoffes sind chemisch-physikalische Methoden nötig.

Tetracycline lassen sich sowohl dünn-schichtchromatographisch (TLC) [101], gaschromatographisch (GC) [102], über Kapillarelektrophorese [103] und flüssigchromatographisch (HPLC) trennen. Von all diesen Methoden hat die HPLC in Kombination mit einer massenspektrometrischen Detektion (HPLC-MS/MS) durchgesetzt. Anhand dieser Methode soll im Folgenden auf den Tetracyclin-Nachweis mittels chemisch-physikalischen Methoden näher eingegangen werden.

### 3.2.1 Extraktion und Clean-up

Die Isolierung von Tetracyclinen aus Lebensmittelmatrizes gestaltet sich aufgrund der starken komplexbildenden Eigenschaften der Tetracycline schwierig. Sie können mit Metallkationen Komplexe bilden oder sich an Proteine heften. Zudem sind Tetracycline unter stark sauren oder basischen Bedingungen und bei UV-Bestrahlung nicht stabil. Dies muss bei der Extraktion beachtet werden. Als gut geeigneter Extraktionspuffer hat sich der EDTA-McIlvaine-Puffer durchgesetzt. Dabei handelt es sich um einen Citratpuffer mit dem Zusatz des Komplexbildners Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), der auf einen pH-Wert von 4 eingestellt wird. Unter diesen Extraktionsbedingungen lassen sich die Tetracycline zu 68 % und höher aus tierischen Matrizes herauslösen [79].

Das gängigste in der Literatur beschriebene Clean-up-Verfahren ist die Festphasenextraktion (SPE). Dabei werden vor allem C<sub>18</sub>-Phasen verwendet, aber auch die Aufreinigung an Polymer-, Phenyl- oder Aminophasen wird beschrieben [79]. Die Festphasenextraktion bietet den Vorteil, dass sie die Aufreinigung mit einer Anreicherung kombiniert. Es werden aber auch andere Verfahren der Probenaufreinigung beschrieben. So haben z.B. Stubbings et al. [104] die komplexierenden Eigenschaft der Tetracycline ausgenutzt, um diese über eine mit Iminodiessigsäure immobilisierte und mit Kupfer(II)ionen beladene Agarose-Säule aufzureinigen. Auch in der Methode nach § 64 LFBG [105] wird die Komplexierung der Tetracycline an Kupferionen vorgeschlagen. Die Elution der komplexierten Tetracycline erfolgt in beiden Fällen mit dem starken Chelatbildner EDTA.

Croubels et al. [106] nutzten den amphoteren Charakter der Tetracycline für eine Anreicherung über eine Kationenaustauscher-Säule auf Polymerbasis (Empore-Säule). Dieses Material bietet den Vorteil, dass keine Silanolgruppen vorhanden sind. Diese mit Tetracyclinen wechselwirken und sie zurückhalten, was zu Verlusten bei der Aufreinigung führen kann.

### 3.2.2 Chromatographische Trennung

Zur Trennung der Tetracycline wird fast ausschließlich die HPLC verwendet. Die Trennung erfolgt zumeist an RP-Phasen (reversed phase). Dabei können Wechselwirkungen der Tetracycline mit freien Silanol-Gruppen oder Spuren von Metallionen in der stationären Phase zu Peak tailing führen. Um dies zu verhindern, werden meist Säulen mit Endcapping und Zusätze von komplexierenden Substanzen wie Oxalsäure zur mobilen Phase verwendet. Die besten Trennungen wurden mit Fließmitteln mit einem Anteil an Oxalsäure erhalten [79]. Für den Einsatz einer massenspektrometrischen Detektion ist dieses Fließmittel jedoch nicht geeignet, da es nicht vollständig verdampft werden kann. Deshalb muss bei einer Kombination aus HPLC und MS sehr sorgfältig auf die Qualität der Trennsäule geachtet werden. Als Fließmittel hat sich hier die Verwendung eines Gemisches aus Acetonitril und wässriger Trifluoressigsäure bewährt.

Einen ausführlichen Überblick über die verschiedenen chromatographischen Systeme, die zur Trennung von Tetracyclinen verwendet werden können, geben Oka et al. [79].

### 3.2.3 Detektion

In der Literatur wird eine Vielzahl von unterschiedlichen Detektionen beschrieben. Dabei werden sowohl die UV-Detektion [107; 108; 109; 110], ein Diodenarray Detektor (DAD) [105; 111] oder Fluoreszenzdetektion mit Nachsäulenderivatisierung [33; 106; 112; 113] angewandt.

In jüngerer Vergangenheit hat sich vor allem die massenspektrometrische Detektion für die Tetracyclin-Analytik durchgesetzt. Dabei wurden unterschiedliche Ionisierungsverfahren angewendet, wie z.B. FAB (fast atom bombardment) [114], APCI (atmospheric pressure chemical ionisation) [115], ESI (electrospray ionisation) [116] sowie das particle beam-Verfahren (PB) [117]. Carson et al. [117] verwenden ebenso wie Nakazava et al. [115] die nichtflüchtige Oxalsäure in der mobilen Phase für die chromatographische Trennung der Tetracycline. Um eine Kontamination der Ionenquelle zu verhindern, schalten Carson et al. ein Splitt-Ventil zwischen Trennsäule und das Particle-beam-Interface, um die mobile Phase während der Säulenäquibrierung und längerer Phasen zwischen den Proben-Injektionen auszublenden. Nakazava et al. hingegen erhitzen den Nebulizer auf 475 °C. Bei dieser Temperatur zersetzt sich die Oxalsäure zu CO<sub>2</sub> und Wasser.

Von den beschriebenen Ionisierungsmethoden haben sich ESI und APCI in der Tetracyclin-Analystik durchgesetzt.

### 3.3 Biosensor-Verfahren

Ein Biosensor besteht aus einem für den Analyten spezifischen Bindungspartner und einem Messwandler (Transducer). Typische Bindungspartner für Biosensor-Analysen sind Antikörper, Enzyme, Nukleinsäuren, vollständige Bakterienzellen, aber auch höhere Organismen wie Algen oder Nematoden [118; 119]. Der an dem Transducer immobilisierte Bindungspartner erkennt und bindet den Analyten. Der Transducer wandelt das „biologische Signal“ in ein messbares elektrisches Signal um. Dabei werden für bioanalytische Fragestellungen Transducer eingesetzt, die elektrochemische, thermische, optische oder akustische Signale verarbeiten [119]. Der Vorteil bei der Verwendung eines Biosensors ist, dass Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Ligand ohne die Notwendigkeit der Markierung einer der beiden Bindungspartner beobachtet werden können [118; 120].

In der Analytik von Lebensmitteln werden Biosensoren seit einigen Jahren vermehrt eingesetzt [121]. Diese eignen sich zur Bewältigung von großen Probenzahlen, wie sie in der Lebensmittelkontrolle anfallen, da ein Ergebnis in kurzer Zeit erhalten werden kann. Ebenso lässt sich diese Technologie in der Prozesskontrolle bei der Herstellung von Lebensmitteln gut einsetzen, da sie ohne aufwändige Probenvorbereitung auskommt [122].

#### 3.3.1 Grundlagen der Oberflächen-Plasmon-Resonanz

Bei der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (surface plasmon resonance, SPR) handelt es sich um eine Technologie, die auf optischen Biosensoren beruht. Das SPR-Signal ändert sich in Abhängigkeit des Brechungsindexes oberhalb eines Sensorchips. Da der Brechungsindex durch die Oberflächendichte am Sensorchip beeinflusst wird, kann die Anbindung eines Analyten an einen an der Chipoberfläche immobilisierten Bindungspartner detektiert werden, ohne dass einer der beiden Bindungspartner markiert werden muss. Die SPR-Spektroskopie wird seit einigen Jahren in der Rückstandsanalytik von Tierarzneimitteln vermehrt eingesetzt [123].

Als Plasmon wird der Quant von elektromagnetischen Wellen des Elektronengases in einer Metallschicht bezeichnet. Breiten sich diese Wellen parallel zu einer Oberfläche aus, spricht man von Oberflächen-Plasmon-Wellen (SP-Wellen). SP-Wellen können z.B. dadurch angeregt werden, dass man eine Metallschicht, die mit einem Dielektrikum verbunden ist, mit Licht bestrahlt. Dadurch werden an der Grenzschicht die Elektronen des Elektronengases in

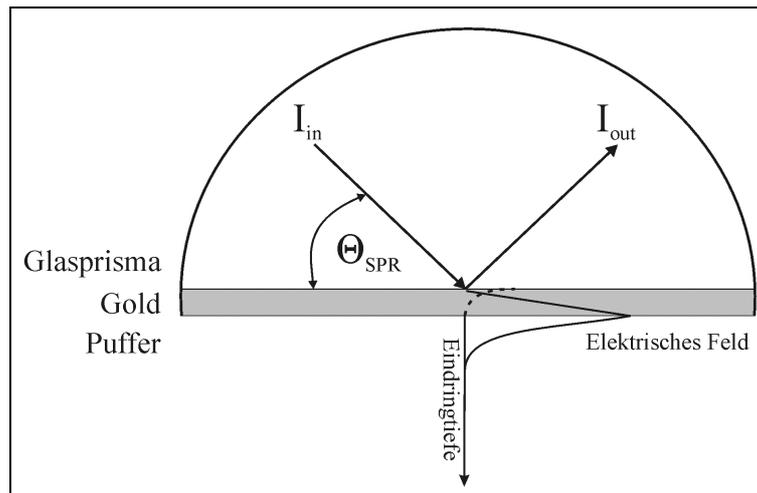
der Metallschicht zum Schwingen angeregt. Das entstehende elektromagnetische Feld wird durch die Bestrahlung mit Licht verstärkt (Resonanz-Verstärkung).

Im Folgenden wird auf die experimentelle Anordnung nach Kretschmann und Raether [124] zur Anregung von SP-Wellen genauer eingegangen, da diese Anordnung den verwendeten SPR-Spektrometern Biacore 3000 und Biacore Q der Firma Biacore (Uppsala, Schweden) zugrunde liegt. Für nähere Informationen hinsichtlich anderer Möglichkeiten der Anregung von SP-Wellen [125; 126; 127] und einer Übersicht kommerziell erhältlicher Biosensoren [128] sei auf die zitierte Literatur verwiesen.

Kretschmann und Raether verwenden für ihre Versuchsanordnung ein Glasprisma, welches mit einer dünnen Metallschicht (Gold oder Silber) bedampft ist. Die Metallschicht steht in Kontakt mit einem Dielektrikum mit geringer optischer Dichte, wie z.B. Puffer oder Luft (siehe Abbildung 3-1) [126; 129]. Für die Metallschicht wird zumeist Gold verwendet, da dies weniger anfällig gegen Oxidation ist als Silber. Wird Licht auf die Grenzfläche Metall-Flüssigkeit eingestrahlt, so wird dieses durch das Prisma zurück total reflektiert, wenn der Einfallswinkel größer ist als der Winkel der Totalreflektion. Ein Teil des Lichtes dringt dabei jedoch als abklingende Welle (evaneszente Welle) in die Metallschicht ein (gepunktete Linie in Abbildung 3-1). Evaneszente Wellen entstehen durch Bestrahlung einer Grenzschicht zwischen zwei optisch unterschiedlich dichten Medien. Sie haben maximale Feldstärke an der Grenzfläche zwischen beiden Medien. Ihre Feldstärke nimmt exponentiell mit der Entfernung von der Grenzfläche ab [129]. Bei der Verwendung von monochromatischem und p-polarisiertem<sup>2</sup> Licht, welches in einem bestimmten Winkel (SPR-Winkel  $\Theta_{\text{SPR}}$ ) auf die Grenzschicht zwischen Gold und Dielektrikum trifft, kann die evaneszente Welle mit den Elektronen in der Metallschicht in Wechselwirkung treten. Durch diese Resonanz wird die SP-Welle in der Goldschicht angeregt [126]. Auch bei der SP-Welle handelt es sich um eine evaneszente Welle. Da SP-Wellen durch Resonanz angeregt werden, ist ihr entsprechendes elektrisches Feld (evaneszentes Feld) verstärkt. Dieses ragt in Abhängigkeit der Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes in das optisch weniger dichte Medium (Puffer).

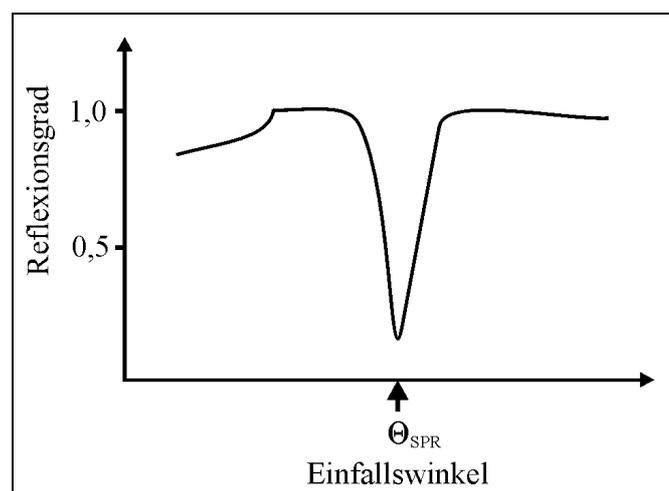
---

<sup>2</sup> p-polarisiertes Licht ist linear polarisiertes Licht, dessen Einfallsebene parallel zur Oberfläche ausgerichtet ist.



**Abbildung 3-1** Schematische Darstellung der Kretschmann-Raether-Anordnung zur Anregung von SP-Wellen [126]. Trifft monochromatisches, p-polarisiertes Licht in einem bestimmten Winkel ( $\Theta_{\text{SPR}}$ ) auf die Grenzschicht zwischen Gold und Dielektrikum, so wird eine evaneszente Welle angeregt (gepunktete Linie). Diese wiederum regt durch Resonanz eine SP-Welle an, deren elektrisches Feld in die Lösung über der Goldschicht ragt. Da die SP-Welle durch Resonanz erzeugt wurde, ist das zugehörige elektrische Feld verstärkt.

Der Anteil einfallenden Lichtes, der die Plasmonen in der Goldschicht anregt, wobei die Energie der Photonen auf die Plasmonen übertragen wird, kann im reflektierten Licht als Intensitätsverlust detektiert werden. Bestimmt man den Reflexionsgrad (Intensität des reflektierten Lichtes / Intensität des eingestrahnten Lichtes) in Abhängigkeit vom Einfallswinkel, so wird das in Abbildung 3-2 gezeigte Bild erhalten.



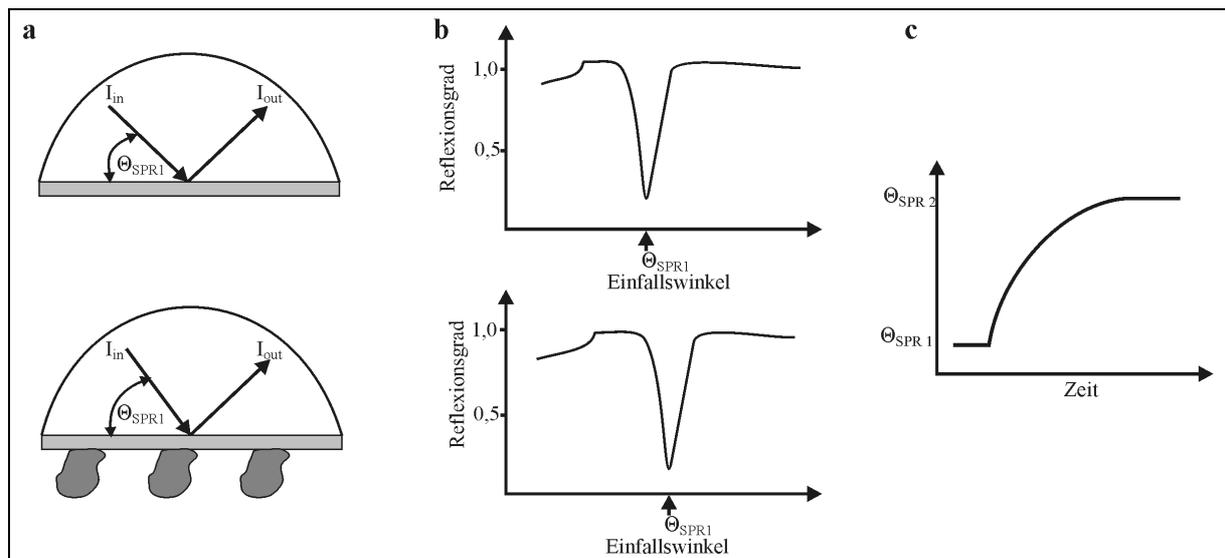
**Abbildung 3-2** SPR-Kurve [126]

Entspricht der Einfallswinkel des Lichtes dem Winkel der Totalreflexion ( $\Theta_{\text{T}}$ ), so wird das gesamte Licht an der Goldoberfläche reflektiert. Unterhalb dieses Winkels wird das Licht teilweise reflektiert und teilweise transmittiert. Vergrößert sich der Einfallswinkel auf einen Wert oberhalb von  $\Theta_{\text{T}}$ , so wird das Licht durch Anregung einer SP-Welle absorbiert. Dabei

sinkt der Reflexionsgrad auf ein Minimum ab, bevor er wieder ansteigt. Dieses Minimum entspricht dem SPR-Winkel  $\Theta_{\text{SPR}}$ . An diesem Winkel, und nur an diesem Winkel, kann eine SP-Welle angeregt werden, was zum Intensitätsverlust des reflektierten Lichtes führt.

### 3.3.2 Detektionsprinzip

Der Winkel des Intensitäts-Minimums ( $\Theta_{\text{SPR}}$ ) ist abhängig von den optische Eigenschaften des Glasprismas, der Art und der Dicke der Metallschicht, sowie von der Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes und dem Brechungsindex des Mediums über der Goldschicht des Glasprismas innerhalb des evaneszenten Feldes [126; 130]. Hält man alle anderen Parameter konstant, so lassen sich die Änderungen dieses Brechungsindex anhand des Winkels von  $\Theta_{\text{SPR}}$  detektieren. Durch Adsorption z.B. eines Proteins an der Goldschicht, vergrößert sich der Brechungsindex und führt zu einer Verschiebung des SPR-Winkels hin zu größeren Werten (siehe Abbildung 3-3).



**Abbildung 3-3 Einfluss des Brechungsindex über dem Glasprisma auf die Lage des SPR-Winkels. Durch die Erhöhung der Masse auf der Oberfläche, z.B. durch Anbindung eines Proteins (a), kommt es zur Änderung des Brechungsindex. Damit verschiebt sich der Winkel des SPR-Minimums hin zu größeren Werten (b). Diese Anbindung kann im Sensorgramm (Änderung des Signals über die Zeit betrachtet) als Signalerhöhung erkannt werden (c).**

Während einer SPR-Analyse lässt sich die Änderung des Brechungsindex kontinuierlich beobachten, was Analysen in Echtzeit ermöglicht. Der SPR-Winkel wird gegen die Zeit aufgetragen und als sog. Sensorgramm von der Software des Gerätes ausgegeben (siehe Abbildung 3-3 c). Hierbei wird der Winkel nicht in Grad, sondern umgerechnet in sog.

Resonance Units (RU) angegeben. Dabei entspricht 1 RU einer Winkeländerung von  $0,00001^\circ$ , was einer Massenänderung auf der Chipoberfläche von  $1 \text{ ng/mm}^2$  entspricht [130].

Die Änderung des Brechungsindex kann nur innerhalb des evaneszenten Feldes detektiert werden, das bis zu 400 nm über die Goldschicht des Glasprismas herausragt [127]. Außerhalb des evaneszenten Feldes haben Änderungen des Brechungsindex keinen Einfluss auf die Lage des SPR-Winkels. Als Konsequenz daraus können Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Ligand nur innerhalb des Feldes beobachtet werden.

### 3.3.3 Aufbau eines SPR-Spektrometers

Das Phänomen der Oberflächen-Plasmon-Resonanz lässt sich zur biomolekularen Interaktionsanalyse verwenden. Zur Durchführung der Analysen in dieser Arbeit wurden zwei Geräte mit einem sog. Durchflusssystem verwendet. Dieses System soll im Folgenden näher beschrieben werden. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 3-4 dargestellt.

Herzstück des Biosensors ist die Detektionseinheit mit dem mikrofluiden System. Der Sensorchip (siehe hierzu Abschnitt 3.3.4), auf dem die eigentliche Interaktionsanalyse stattfindet, ist über eine dünne Siliconfolie (opto interface) mit dem Glasprisma verbunden. Die Folie weist einen dem Glasprisma ähnlichen Brechungsindex auf, so dass das eingestrahlte Licht erst an der Grenzschicht zwischen Glas und Goldschicht reflektiert wird [130]. Eine lichtstarke Diode stellt das monochromatische Licht mit einer Wellenlänge von rund 800 nm zur Verfügung [131]. Es wird polarisiert und durch ein Linsensystem auf die Glasseite des Sensorchips fokussiert. Das reflektierte Licht wird durch einen fest angebrachten Diodenarray-Detektor (DAD) registriert. Dieser ist in der Lage, eine Änderung des SPR-Winkels von  $0,1^\circ$  zu detektieren. Das angeschlossene computergestützte Auswertesystem verbessert die Detektionsgenauigkeit durch Interpolation des DAD-Signals auf  $0,00001^\circ$  [130].

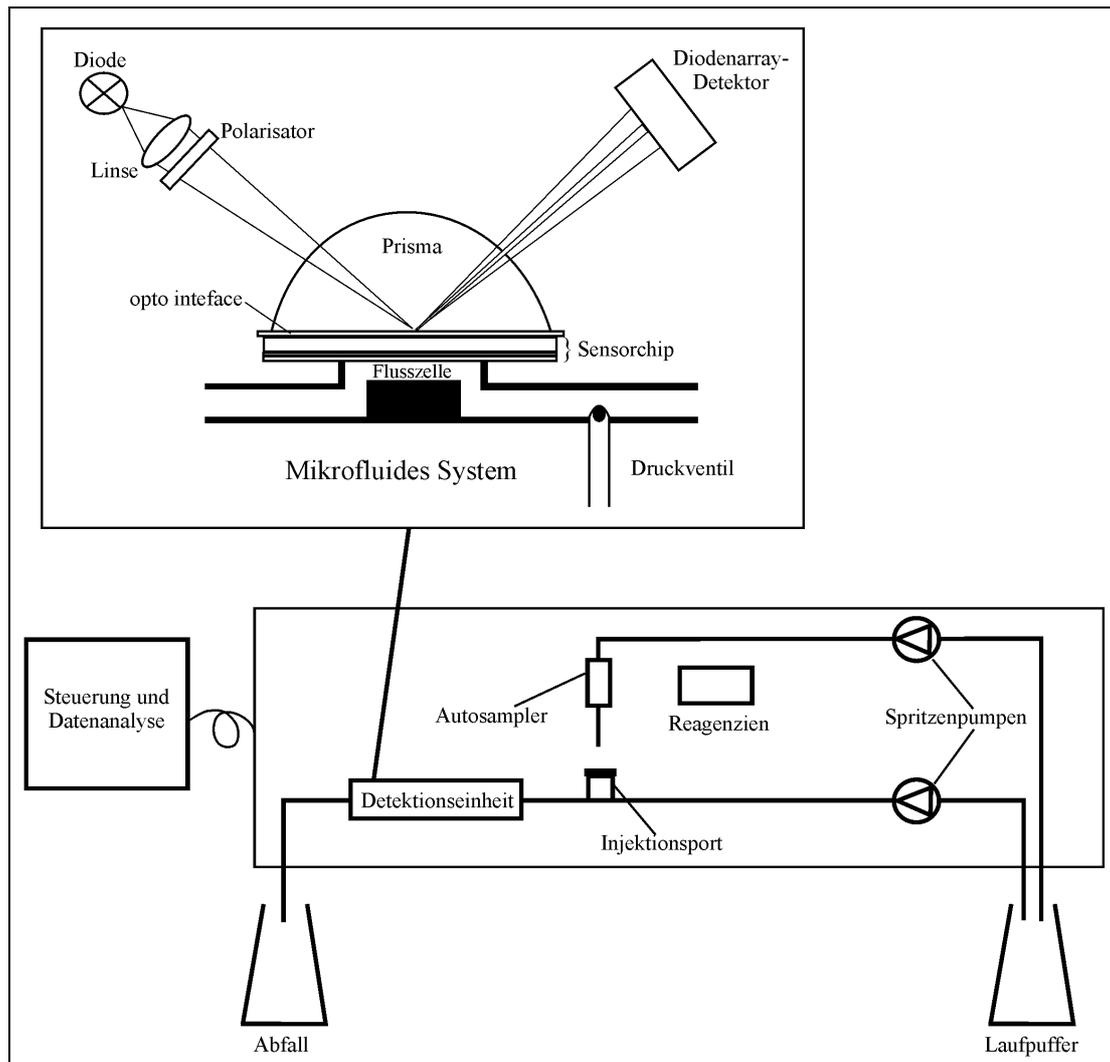


Abbildung 3-4 Schematischer Aufbau eines SPR-Biosensor (modifiziert nach [130] und [132]).

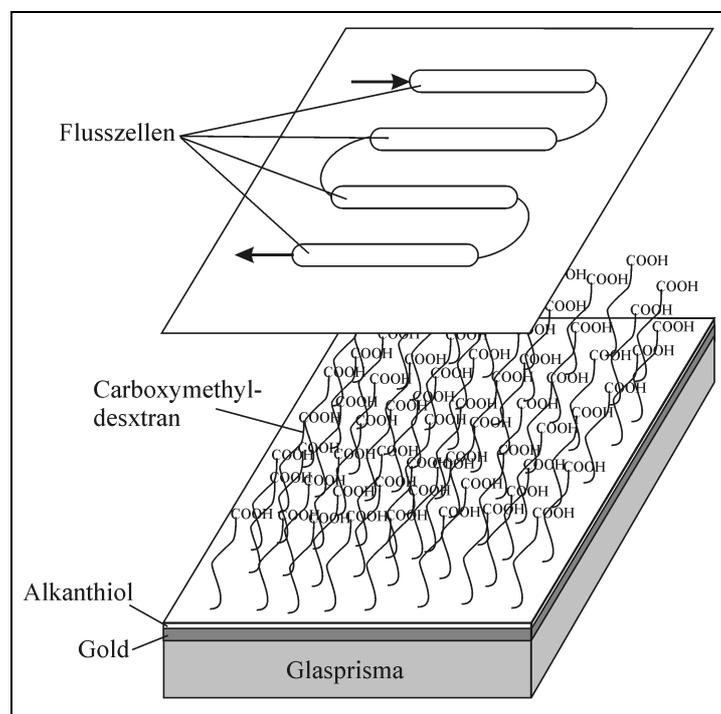
Der Sensorchip steht in Kontakt mit dem mikrofluiden System. Durch das geringe Volumen der Flusszellen werden kurze Diffusionswege des Analyten zum auf der Chipoberfläche immobilisierten Bindungspartner erreicht. Der Fluss von Laufpuffer oder Reagenzien durch die Flusszellen wird pneumatisch über mehrere Druckventile gesteuert [132].

Der Laufpuffer und die Reagenzien werden über zwei Spritzenpumpen, die absolut pulsationsfrei arbeiten, zur SPR-Detektionseinheit transportiert. Ein Probengeber sorgt für die gute Automatisierbarkeit der Analysen.

### 3.3.4 Sensorchips

Ein Sensorchip besteht aus einem Glaträger, auf dem eine dünne Goldschicht (ca. 50 nm) aufgebracht ist (siehe Abbildung 3-5). An das Gold ist eine Schicht z.B. aus Hydroxyalkanthiol gebunden, die zum einen dafür sorgt, dass keine Wechselwirkungen von

Matrixkomponenten wie Proteine mit der Goldoberfläche stattfinden, zum anderen bietet sie die Möglichkeit, eine Schicht Carboxymethyldextran chemisch zu binden. Über die Carbonsäure-Gruppen der Dextranschicht können die Analytmoleküle oder Rezeptormoleküle z.B. über Amid-Bindungen chemisch auf dem Chip immobilisiert werden. Die Dextranschicht weist eine Dicke von ca. 100 nm auf. Damit bietet sie die Möglichkeit, dass biomolekulare Wechselwirkungen innerhalb des evaneszenten Feldes beobachtet werden können [130]. Aufgrund der chemischen Stabilität kovalenter Bindungen ist es möglich, mit geeigneten Regenerationslösungen eine Dissoziation der Rezeptor/Ligand-Komplexe zu erreichen, ohne dabei die Bindung des Analyten bzw. Rezeptors an den Chip zu zerstören.



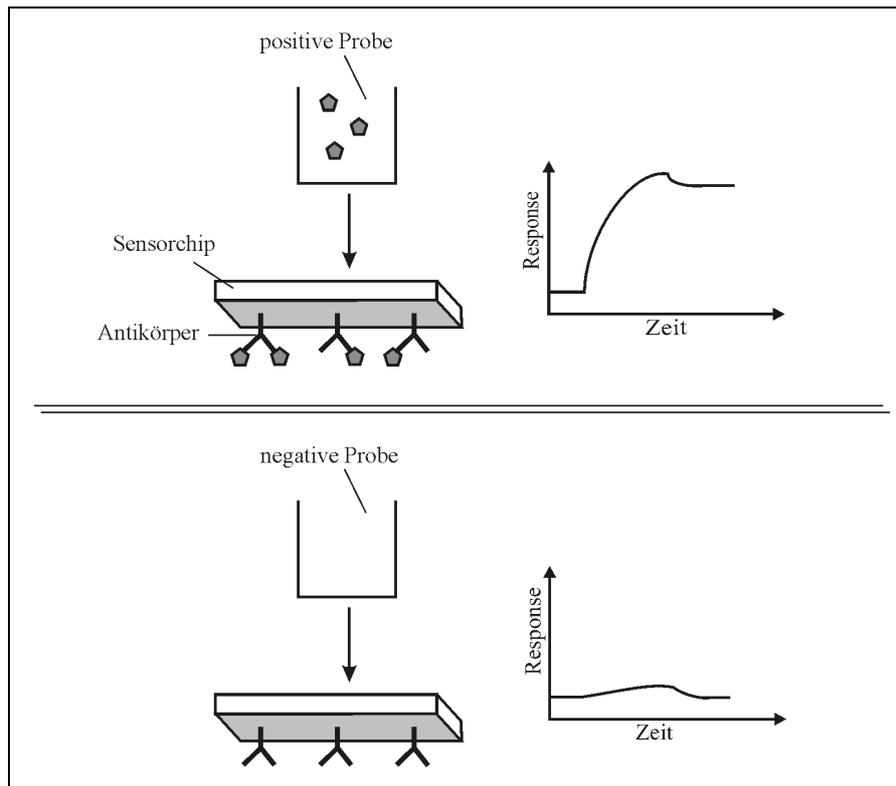
**Abbildung 3-5** Schematische Darstellung eines Sensorchips, auf dem Carboxymethyldextran immobilisiert wurde. Darüber sind die 4 Flusszellen des mikrofluiden Systems dargestellt. Im Biacore 3000<sup>®</sup> können diese einzeln, in Reihe oder paarweise angesteuert werden, das Biacore Q<sup>®</sup> erlaubt nur eine Ansteuerung in Reihe. Zeichnung in Anlehnung an [130] und [133].

Beim Einbau des Sensorchips in ein Biosensor-Gerät wird das mikrofluide System auf die Oberfläche des Sensorchips gedrückt, so dass 4 miteinander verbundene Flusszellen entstehen. Diese haben je nach Gerätetyp unterschiedliche Volumina (Biacore Q<sup>®</sup> = 60 nl, Biacore 3000<sup>®</sup> = 20 nl). Der Zu- bzw. Ablauf der Flusszellen wird durch Druckluftventile geregelt. Das Biacore 3000<sup>®</sup> erlaubt die Ansteuerung der Flusszellen einzeln, in Reihe oder paarweise, wohingegen die Flusszellen im Biacore Q<sup>®</sup> nur in Reihe angesteuert werden können [131; 133].

### 3.3.5 Anwendung der SPR in der Rückstandsanalytik von Antibiotika

Die Technik der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie hat in den letzten Jahren zunehmend Einzug in die Lebensmittel-Analytik gehalten. Dabei lässt sich in der Literatur ein sehr weit gefasstes Spektrum an Verbindungen finden, die mittels SPR nachgewiesen wurden. Es umfasst kleinere Moleküle wie Vitamine [134; 135; 136], Hormone [137], Aflatoxin [138] und Tierarzneimittelrückstände wie Tylosin [139], Sulfonamide [140],  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, [141; 142], Aminoglycoside [143], Chloramphenicol [144], Nicarbazin [145] und Ivermectin [146]. Aber auch größere Proteine [147] und sogar vollständige Zellen [148] wurden untersucht. Haughey und Baxter [149] geben einen Überblick über Testverfahren, die als kommerzielle Kit-Assays entwickelt wurden. Für die Analytik von Tetracyclinen wurde in der Literatur bisher noch kein Assay beschrieben, welcher die SPR als Nachweisverfahren nutzt. Einzig in einem Patent von Granier [100] findet sich ein Vorschlag für ein Verfahren, das bisher jedoch noch keine Anwendung in einem Tetracyclin-Assay gefunden hat (siehe auch Abschnitt 3.3.6, Seite 41).

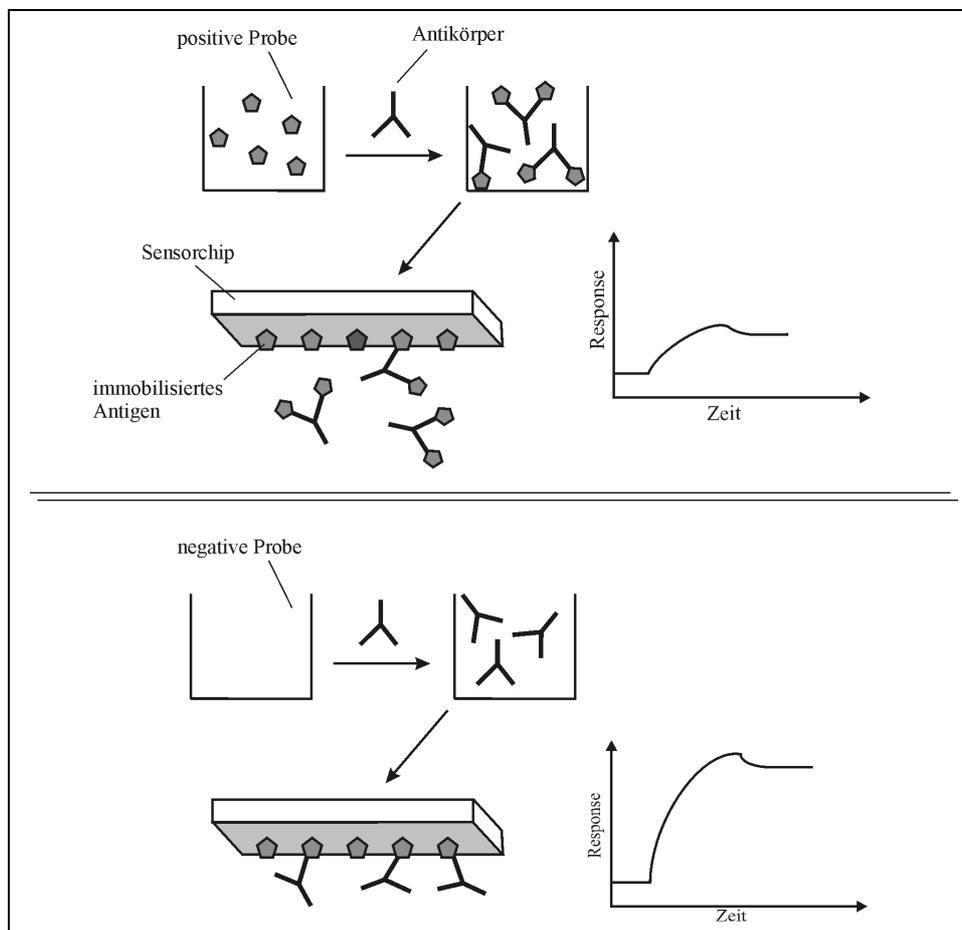
Prinzipiell bestehen zwei Möglichkeiten, einen SPR-Assay aufzubauen. Die einfachste Variante ist der direkte Nachweis des Analyten (siehe Abbildung 3-6). Dabei wird auf der Chipoberfläche ein Bindungspartner mit hoher Affinität zum Analyten (z.B. ein Antikörper) immobilisiert. Die Probe wird über den Chip gegeben, wobei sich ein Komplex aus Analyt und Bindungspartner bildet. Die durch die Anbindung des Analyten an der Chipoberfläche verursachte Brechungsindexänderung wird im Sensorgramm als Signalerhöhung detektiert. Bei negativen Proben erhöht sich die Masse auf dem Chip nicht, und das Signal bleibt auf gleichem Niveau.



**Abbildung 3-6 Direktes Assay-Format. Auf der Chipoberfläche wird ein spezifischer Bindungspartner des Analyten immobilisiert (z.B. ein Antikörper). Dieser bindet die Analytmoleküle aus rückstandspositiven Proben, was zu einer Massenerhöhung auf der Chipoberfläche und damit zu einem Anstieg des SPR-Signals führt. Negative Proben zeigen keine Signalerhöhung.**

Die direkte Variante ist jedoch nur bei Molekülen mit hinreichend großem Molekulargewicht möglich. Sind die Analyten zu klein, reicht die Nachweisempfindlichkeit für viele Anwendungen nicht aus. Aus diesem Grund werden die meisten Tierarzneimittel indirekt nachgewiesen. Dabei wird der Analyt oder ein Derivat des Analyten an die Chipoberfläche gekoppelt (siehe Abbildung 3-7). Die Probe wird vor der SPR-Analyse mit einem spezifischen Bindungspartner (meist ein Antikörper) gemischt und inkubiert. Dabei findet bei positiven Proben eine Bindung des Analyten an den Antikörper statt. Dessen Bindungsstellen werden je nach Konzentration des Analyten in der Probe abgesättigt. Nun erfolgt die Injektion auf den SPR-Chip. Die bereits abgesättigten Bindungsstellen des Antikörpers stehen für eine Bindung mit dem chipgebundenen Analyten nicht mehr zur Verfügung. Es kommt nur zu einer geringen Anbindung von Antikörper an die Chipoberfläche. Bei rückstandsnegativen Proben sind alle Bindungsstellen des Antikörpers frei für die Reaktion mit dem immobilisierten Analyten und das SPR-Signal ist maximal. Je mehr Bindungsstellen durch den Analyten in der Probe abgesättigt wurden, desto weniger Moleküle des Bindungspartners können auf der Chipoberfläche binden. Die Massenerhöhung auf dem Chip erfolgt also

umgekehrt proportional zur Analytkonzentration in der Probe. Im Gegensatz dazu steigt das Signal bei rückstandspositiven Proben im direkten Assay proportional mit dem Gehalt.



**Abbildung 3-7 Indirektes Assay-Format.** Die Probe wird mit einem spezifischen Bindungspartner des Analyten (z.B. ein Antikörper) inkubiert. Bei rückstandspositiven Proben werden die Bindungsstellen des Bindungspartners teilweise abgesättigt. Anschließend erfolgt die Injektion auf den Sensorchip, der mit Analytmolekülen beladen ist. Die Bindungsstellen des Antikörpers sind bereits zum Großteil besetzt, so dass dieser nicht bzw. nur wenig an den Chip binden kann. Es kommt zu einer geringen Signalerhöhung im Sensorgramm. Bei negativen Proben sind alle Bindungsstellen am Bindungspartner unbesetzt und er kann vollständig an den Sensorchip binden, was zu einer starken Signalerhöhung führt.

Von den oben zitierten SPR-Assays für Tierarzneimittel, Vitamine, Hormone und Aflatoxin wurden nur die Aminoglycoside Streptomycin und Dihydrostreptomycin auf direktem Wege nachgewiesen. Für alle anderen Analyten wurde ein indirektes Assay-Format gewählt, wobei mit Ausnahme des Vitamin B<sub>12</sub> und der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika für alle Stoffe Antikörper als Bindungspartner dienten.

Die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika wurden mit komplexeren Assay-Formaten analysiert. Für eine genauere Betrachtung unterschiedlicher  $\beta$ -Lactam-Assays sei auf die zitierte Literatur verwiesen [142; 150].

### 3.3.6 Einsatz von Biosensoren zum Nachweis von Tetracyclinen

Ausschließlich in der Patentschrift von Granier [100], über die den Tetrasensor-Schnelltest patentiert wird, wird ein SPR-Biosensor zum Nachweis von Tetracyclinen beschrieben. Dieses Verfahren nutzt ebenso wie der Tetrasensor das Tetracyclin-Repressor-Operator-System zum Nachweis. Als Operator dient ein doppelsträngiges DNA-Fragment, welches an einem Ende mit Biotin derivatisiert wurde. Der Ablauf des Assays ist in Abbildung 3-8 schematisch dargestellt.

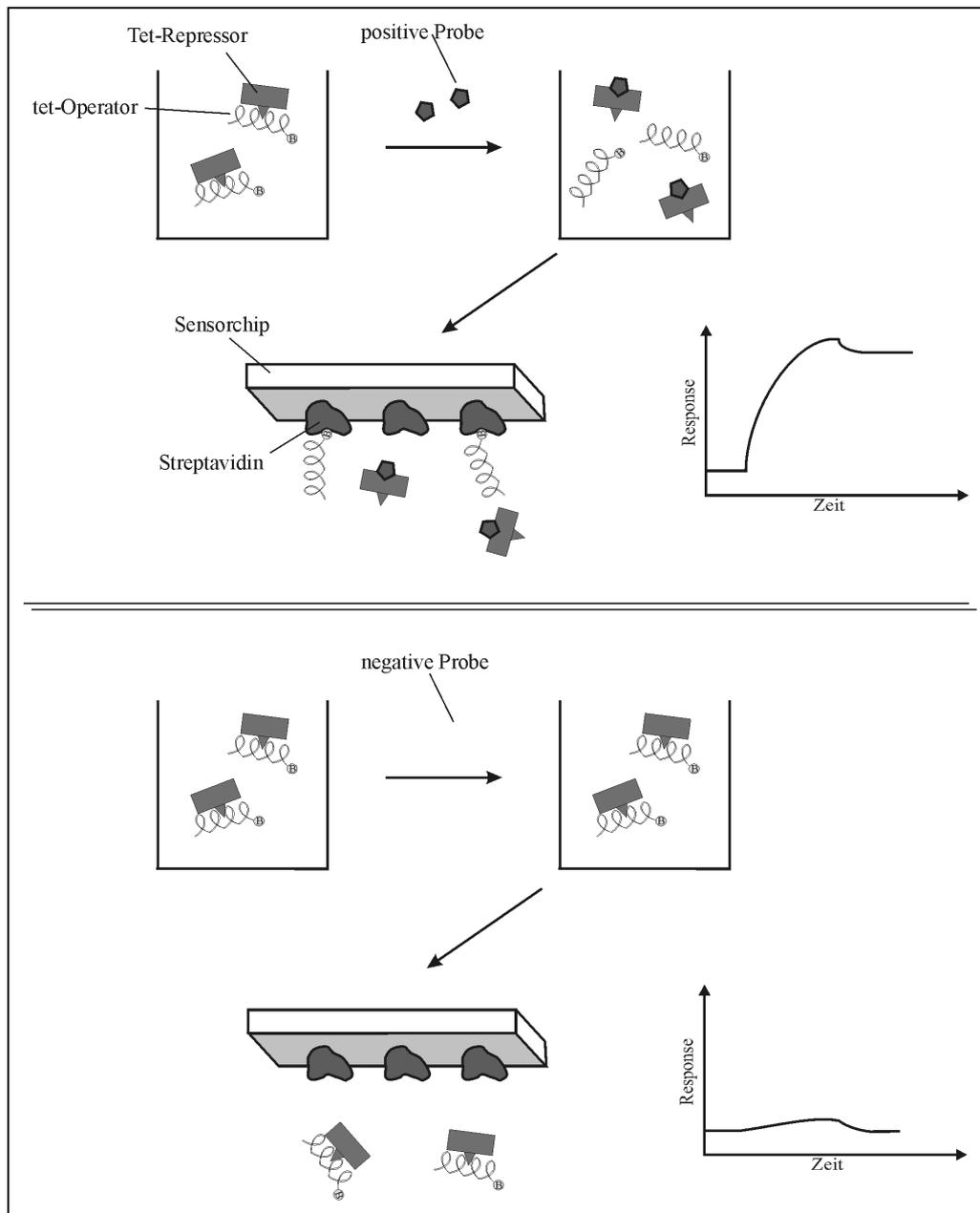


Abbildung 3-8 Postulierter Ablauf eines SPR-Assays für Tetracyclin nach der Patentschrift von Granier [100]. Ablauf siehe Text.

Die Probe wird zunächst mit einer Mischung aus Repressor (TetR) und Operator (*tetO*) inkubiert. Bei positiven Proben bindet Tetracyclin an TetR und löst dieses vom Operator ab. Nach der Inkubation erfolgt die Injektion auf einen mit Streptavidin belegten Sensorchip. Die freigewordene, biotinylierte DNA kann an das Streptavidin binden, was zu einer Signalerhöhung im Sensorgramm führt. Bei rückstandsnegativen Proben bleibt der Repressor an den Operator gebunden. Nach den im Patent formulierten Erwartungen ist dieser Komplex nicht in der Lage, an die Chipoberfläche zu binden. Als Folge sollte sich im Sensorgramm keine Signalerhöhung zeigen. Granier beschreibt in seinem Patent nicht, warum er davon ausgeht, dass eine mit TetR beladene DNA nicht mehr in der Lage sein soll, an der Chipoberfläche zu binden.

Das Patent lässt noch weitere Fragen offen. So wird nicht beschrieben, wie eine Regeneration der Chipoberfläche erreicht werden soll. Für den Einsatz eines Testverfahrens zur SPR-Analytik muss der Sensorchip nach der Analyse einer Probe wieder in den Ausgangszustand zurückversetzt werden, um das erneute Binden von Komponenten in einer zweiten Analyse zu gewährleisten. Hier müsste eine Trennung des Streptavidin-Biotin-Komplexes stattfinden. Dieser Komplex ist jedoch äußerst stabil (Affinitätskonstante  $K_A = 10^{15}$  L/mol [151]) und zeigt Eigenschaften, die einer kovalenten Bindung ähnlich sind.

In der Literatur werden andere, nicht auf SPR basierende Biosensor-Verfahren zum Nachweis von Tetracyclinen beschrieben. So haben D'Haese et al. [152] 1997 ein Verfahren für den Nachweis von Tetracyclinen in Rohmilch vorgestellt, welches auf Hemmung der de novo-Synthese von  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli* durch Tetracyclin beruht. Die Milchproben werden mit dem Bakterium versetzt und für einen bestimmten Zeitraum bebrütet. Das Tetracyclin aus der Probe hemmt die Proteinbiosynthese des Bakteriums und damit die Produktion der  $\beta$ -Galactosidase. Anschließend führen D'Haese et al. eine Chemolumineszenzmessung zur Bestimmung der gebildeten  $\beta$ -Galactosidase durch. Dabei ist letztlich die gemessene Chemolumineszenz der in der Probe enthaltenen Tetracyclin-Menge umgekehrt proportional. Je höher der Tetracyclin-Gehalt in der Rohmilch ist, desto geringer ist die Chemolumineszenz, die gemessen werden kann.

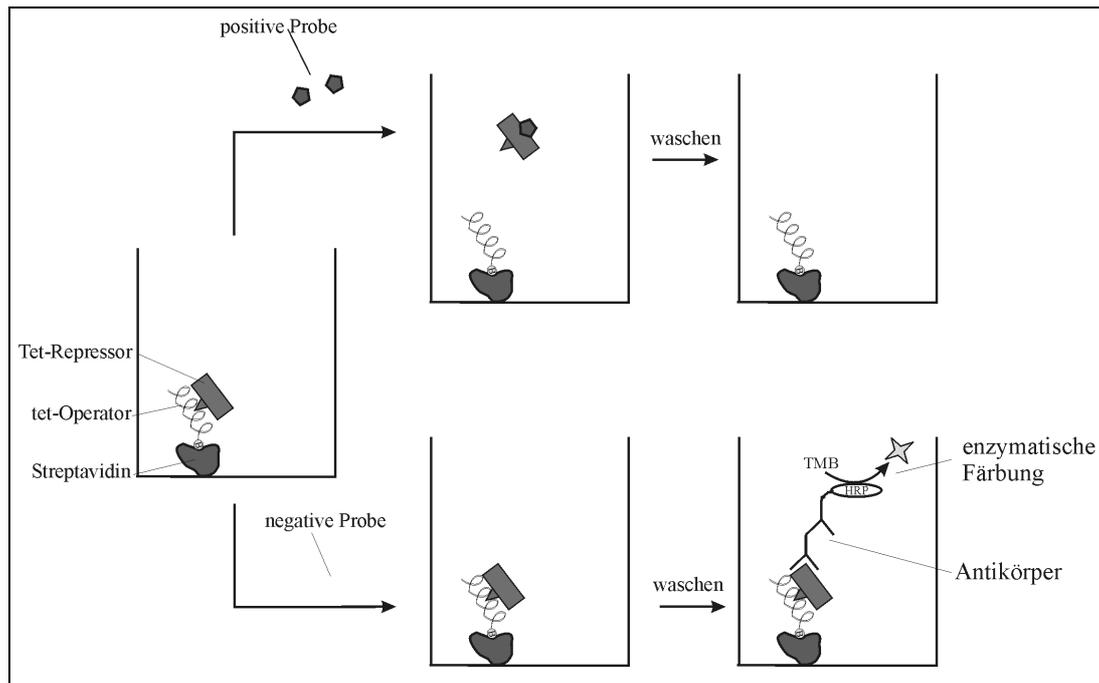
Kurittu et al. [153] nutzten für ihr Testsystem den Regulationsmechanismus für die Expression von Effluxproteinen bei Tetracyclin-Resistenz. Auf einem synthetischen Plasmid stellten sie die 5 Luciferase-Gene, die für die Ausbildung einer in vivo Biolumineszenz nötig sind, unter der Kontrolle des Tetracyclin-Repressor-Operator-Systems stehen. Dieses Plasmid

in *E. coli* transformiert, welcher als Detektionskeim einer Rohmilchprobe zugegeben wurde. Bei Abwesenheit von Tetracyclin befindet sich der Tet-Repressor auf dem *tet*-Operator, so dass die Luciferase-Gene nicht abgelesen werden können. In Gegenwart von Tetracyclin löst sich der Repressor vom Operator, was zur Expression der Luciferase-Gene und damit letztlich zur Biolumineszenz der Probe führt. Dabei ist die gemessene Biolumineszenz der sich in der Probe befindlichen Tetracyclin-Menge proportional. In gleicher Weise wurde von Hansen und Sørensen ein Biosensor mit dem  $\beta$ -Galactosidase-Gen als Reporter für den Nachweis von Tetracyclin in Milch entwickelt [154].

Ein Problem dieser Art des Tetracyclin-Nachweises stellt die Hemmung der Proteinbiosynthese des Bakteriums bei hohen Tetracyclin-Konzentrationen dar, wodurch damit auch die Expression des Reportergens blockiert wird (siehe auch Abschnitt 2.3.5, Seite 15). Dadurch täuschen Proben mit hohem Tetracyclin-Gehalt ein negatives Ergebnis vor. Um dies zu verhindern, haben Bahl et al. [155] ein Plasmid in das Bakterium kloniert, das zusätzlich zum Reportergen auch die DNA-Sequenz für ein ribosomales Schutzprotein enthält. Bei Anwesenheit von Tetracyclin wird auch dieses Gen exprimiert und das Ribosom vor einer Hemmung durch Tetracyclin geschützt, so dass das Reportergen weiterhin gebildet werden kann.

Pellinen et al. [156] stellten 2004 einen zellfreien Biosensor vor, der auf dem gleichen Prinzip beruht. Sie nutzten ebenfalls ein Plasmid, welches die Luciferase-Gene unter die Kontrolle des Tetracyclin-Operator-Repressor-Systems stellt. Allerdings wird hier die Transkription/Translation in einem zellfreien Extrakt durchgeführt. Damit waren Pellinen et al. in der Lage, die Inkubationszeit auf nur 30 Minuten anstatt 120 Minuten bei Kurittu zu reduzieren. Zudem erreichte Pellinen durch die Verwendung des zellfreien Extraktes eine verbesserte Nachweisempfindlichkeit.

Weber et al. [157] beschrieben 2005 ein Biosensor-Verfahren, welches in Form eines ELISAs in einer Mikrotiterplatte durchgeführt wurde. Auch sie nutzten das Tetracyclin-Operator-Repressor-System. Der Ablauf dieses Assays ist in Abbildung 3-9 schematisch dargestellt.



**Abbildung 3-9 Schematische Darstellung des Biosensors auf ELISA-Basis [157]. Ablauf siehe Text.**

Sie beschichteten die Oberfläche zunächst mit Streptavidin, was zum Anbinden des biotinylierten Tetracyclin-Operators diente. Auf diesen wurde der mit einem Histidin-Rest modifizierte Repressor gegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation mit der Probenlösung. Ist Tetracyclin in der Probe enthalten, löst dies den Repressor ab, welcher zum folgenden Waschschriff von der Platte entfernt wird. Ohne Tetracyclin verbleibt der Repressor an dem Operator. Abschließend wird die Menge von TetR in der Kavität durch einen anti-Histidin-Antikörper, einen gegen diesen gerichteten Sekundär-Antikörper und einer entsprechenden Enzymreaktion nachgewiesen, wie dies bei einem herkömmlichen ELISA üblich ist.

## 4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Screening-Test für Tetracycline auf der Basis der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie. Dazu sollte zunächst ein geeigneter Bindungspartner gefunden und isoliert werden. Mit diesem sollten unterschiedliche Assay-Formate getestet werden. Das beste Format sollte näher charakterisiert und auf die Matrices Honig und Rohmilch angewendet werden.

Als ein möglicher Bindungspartner kam das bakterielle Ribosom in Frage. Tetracycline wirken durch Bindung an das Ribosom und verhindern dadurch die Proteinbiosynthese, was letztlich zum Absterben des Bakteriums führt. Ribosome sind in jedem Bakterium vorhanden und somit leicht zugänglich. Aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes sind sie für die Entwicklung eines indirekten SPR-Assay zum Rückstandsnachweis von Antibiotika gut geeignet. Für ein indirektes Assay-Format musste zunächst ein Tetracyclin-Derivat hergestellt werden, welches ohne Verlust seiner biologischen Aktivität an der Chipoberfläche immobilisiert werden konnte. Diese sollte mit Tetracyclin aus rückstandspositiven Probe um die Bindungsstellen am Ribosom konkurrieren, welches zuvor der Probe zugesetzt wurde.

Aus der Tetracyclin-Resistenz-Forschung ist ein weiterer, sehr spezifischer Bindungspartner für Tetracycline bekannt – der Tetracyclin-Repressor (TetR). Bei Abwesenheit von Tetracyclin bindet er an den Tetracyclin-Operator (*tetO*), eine kurze DNA-Sequenz im bakteriellen Genom. Gelangt Tetracyclin in die Zelle, bindet es dort an den Operator, der sich vom Repressor löst und so die Expression des Tetracyclin-Resistenzgens ermöglicht. Durch die Verwendung dieser beiden Moleküle sollten weitere SPR-Assay-Varianten für einen Rückstandsnachweis von Tetracyclinen entwickelt werden.

Das Assay-Format mit den besten Eigenschaften sollte näher charakterisiert werden. Dabei sollte zunächst der Einfluss der Arbeitsparameter wie Konzentrationen der einzelnen Komponenten, Flussgeschwindigkeiten und Injektionsdauer sowie Regenerationsbedingungen untersucht werden. Für eine weitere Optimierung des Tetracyclin-Nachweises sollten unterschiedliche Repressor- und Operator-Varianten untersucht werden.

Die 4-Epimere der Tetracycline müssen gemeinsam mit der jeweiligen Muttersubstanz zur Kontrolle der Höchstmengen untersucht werden. Bei der Ermittlung von Kreuzreaktivitäten

des Assays auf unterschiedliche Tetracycline sollte daher besonderes Augenmerk auf die 4-Epimere gelegt werden. Zusätzlich sollte die Spezifität des Tetracyclin-Assays durch Analyse anderer Antibiotika-Klassen mit dem Assay überprüft werden.

Das entwickelte Assay-Format sollte für Honig und Rohmilch angewendet werden. Dabei stand zunächst die Erkennung und Beseitigung von Matrixeffekten im Vordergrund. Da der entwickelte Tetracyclin-Assay zum Screening auf diese Antibiotika-Klasse verwendet werden soll, sollte eine aufwändige Probenaufarbeitung zur Beseitigung von Matrixinterferenzen möglichst vermieden werden.

Mit den beiden Matrices Honig und Rohmilch wurden sehr unterschiedliche Ansprüche an die Sensitivität des Testes gestellt. Für Milch hat die Europäische Union eine Höchstmenge von 100 µg/kg festgelegt, wohingegen die Verwendung von Tetracyclinen zur Behandlung von Honigbienen nicht erlaubt ist [4]. Aus diesem Grund müssen Tetracyclin-Rückstände in Honig in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Bei der Entwicklung des Tetracyclin-Assay sollte daher besonderes Augenmerk auf einen weiten Konzentrationsbereich, in dem Tetracycline nachgewiesen werden können, gelegt werden.

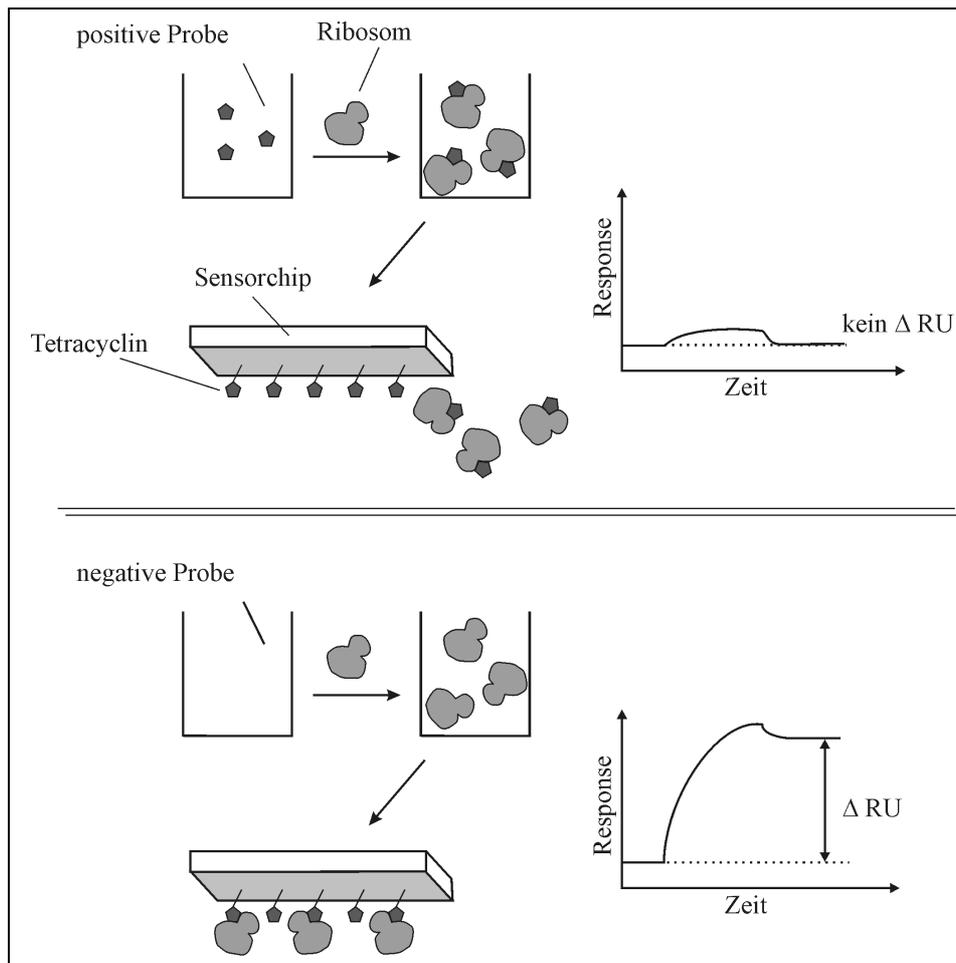
## 5 Aufbau der möglichen Assay-Formate

### 5.1 indirekter Assay

Als biomolekularer Bindungspartner für Tetracycline können in diesem Assay-Format sowohl Ribosome als auch TetR eingesetzt werden. Durch das hohe Molekulargewicht der Ribosome eignen sie sich für diesen Aufbau besonders, da der Nachweis des Tetracyclins indirekt über die Anbindung des Bindungspartners nachgewiesen wird. Hier zeigt sich der Vorteil der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie (SPR-Spektroskopie) gegenüber anderen Verfahren wie z.B. dem Radioimmunoassay (RIA) oder dem enzym linked immuno sorbent assay (ELISA) ohne die Markierung von Verbindungen auszukommen.

Diese Assay-Variante verlangt die Immobilisierung eines Tetracyclins bzw. Tetracyclin-Derivates an einem Sensorchip. Dieses sollte über eine Kopplung mit Ethylendiaminopropyl-Carbodiimid (EDC) und N-Hydroxy-succinimid (NHS) an einen mit Carboxymethyldextran vorimmobilisierten CM-5-Chip geschehen.

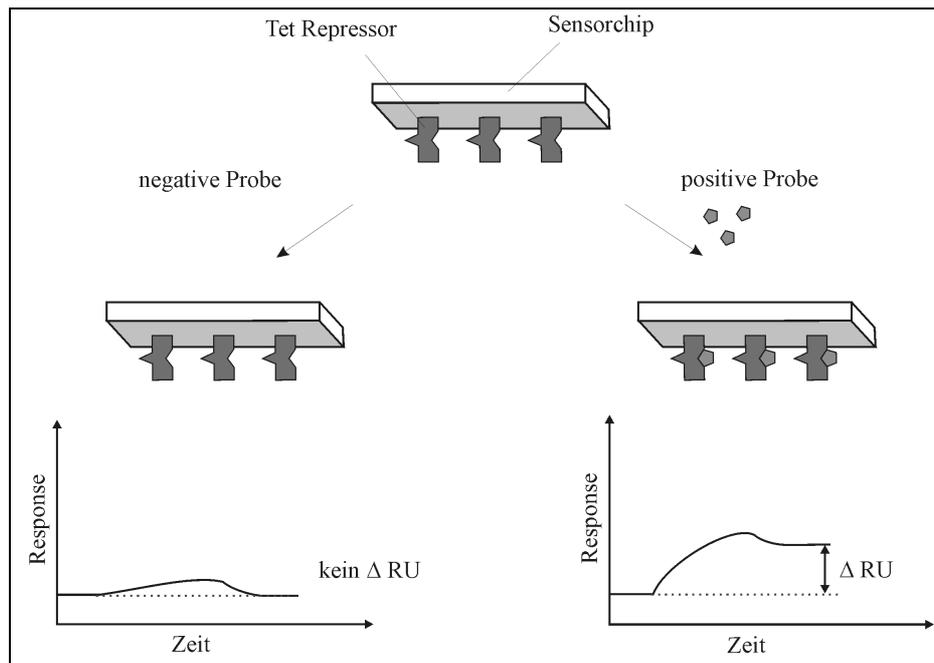
In Abbildung 5-1 ist der Ablauf des indirekten Assay-Formates mit Ribosomen als Bindungspartner schematisch dargestellt. Die Probe wird mit Ribosomen inkubiert, wobei das Tetracyclin aus positiven Proben an diese bindet und damit die Tetracyclin-Bindungsstellen absättigt. Bei der anschließenden Biosensor-Analyse können die Ribosome nicht mehr an die immobilisierten Tetracycline binden und das Signal zeigt nur einen kurzen Anstieg während der Injektion aufgrund der Änderung des Brechungsindex der Lösung (= Bulk-Effekt). Nach der Injektion kehrt es wieder auf sein Ausgangsniveau zurück. Bei negativen Proben werden die Ribosome mit freien Bindungsstellen auf den Chip injiziert und können hier an die Tetracyclin-Moleküle binden. Dadurch wird die Masse auf der Chipoberfläche erhöht, und das SPR-Signal steigt an. Das erhaltene Messsignal verhält sich umgekehrt proportional zur Tetracyclin-Konzentration in der Probe.



**Abbildung 5-1** Schematische Darstellung des indirekten Assay-Formates zum Nachweis von Tetracyclinen mittels Ribosomen. Erklärung siehe Text.

## 5.2 Direkter Assay

Der direkte Assay ist der einfachste Weg zum Nachweis eines Analyten. Dazu wird ein selektives Bindungsprotein an der Chipoberfläche immobilisiert. Auch für diese Assay-Variante können sowohl Ribosome als auch TetR eingesetzt werden. Beide lassen sich auf einem mit Carboxymethyldextran belegten CM-5-Chip über eine Kopplung mit EDC und NHS kovalent an die Chipoberfläche binden. Der Ablauf des direkten Assays ist in Abbildung 5-2 schematisch dargestellt.



**Abbildung 5-2** Schematische Darstellung des direkten Assay-Formates zum Nachweis von Tetracyclin

Ist kein Tetracyclin in der Probe enthalten, kehrt das Signal nach der Injektion wieder auf Ausgangsniveau zurück. Bei rückstandspositiven Proben bindet der Analyt an den Repressor und erhöht damit die chipgebundene Masse. Als Folge verbleibt das Signal nach der Probeninjektion auf einem höheren Niveau, so dass ein  $\Delta$  RU (Signal vor und nach Probeninjektion) detektiert werden kann. Diese Änderung steigt in Abhängigkeit von der Tetracyclin-Konzentration.

Der direkte Weg, Tetracyclin mittels SPR nachzuweisen, birgt jedoch ein Problem. Die Höhe des erhaltenen SPR-Signals ist abhängig von der Massenänderung vor und nach der Probeninjektion. Aufgrund der kleinen Masse des Analyten von 444,4 g/mol ist das zu erwartende SPR-Signal ebenfalls relativ gering. Um Tetracyclin an seinem MRL nachzuweisen, zeigt dieser Assay-Aufbau möglicherweise keine ausreichende Sensitivität.

### 5.3 Indirekter Assay mit *tetO* und TetR

Durch die Verwendung des Paares *tetO* und TetR ist der Aufbau weiterer Assay-Varianten möglich. Auch hier wird Tetracyclin nicht direkt, sondern durch die Ablösung des Tet-Repressor von der Chipoberfläche aufgrund der Injektion einer tetracyclinhaltigen Probenlösung. Da dieser mit rund 46.000 g/mol eine weitaus größere Masse als das

Tetracyclin selbst besitzt, dient er quasi zur Signalverstärkung. Abbildung 5-3 zeigt den Aufbau eines solchen Assays.

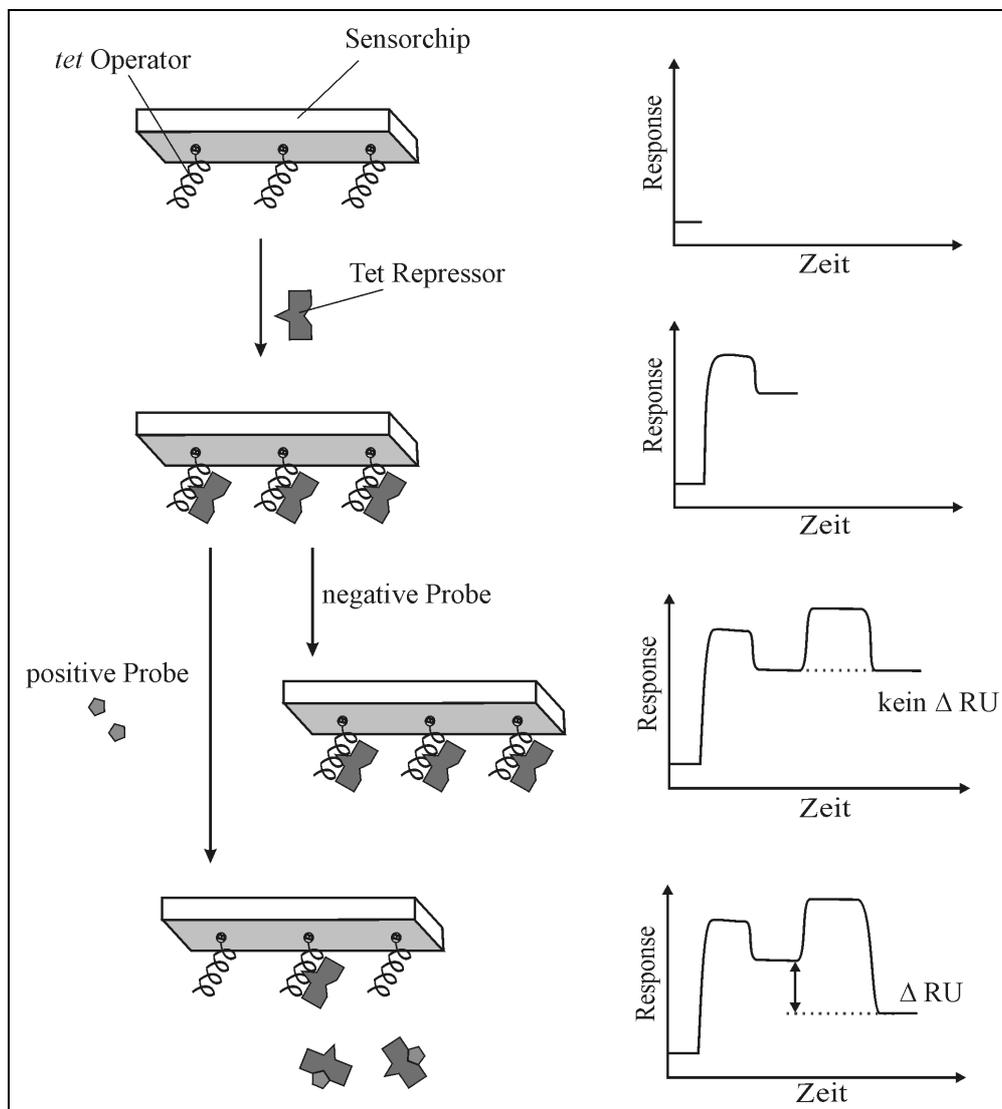


Abbildung 5-3 Schematische Darstellung des indirekten Assay-Formates zum Nachweis von Tetracyclinen

Für den indirekten Assay mit *tetO* und TetR muss der Chip zunächst mit dem *tet*-Operator belegt werden. Dafür wurde ein bereits Streptavidin vorimmobilisierter SA-Chip gewählt. So konnte der biotinylierte Operator durch eine einfache Injektion an den Chip gebunden werden (in Abbildung 5-3 nicht dargestellt). Dieser Schritt muss pro Chip nur einmal durchgeführt werden. Die Bindung von Streptavidin und Biotin ist zwar nicht kovalent, jedoch besteht zwischen diesen beiden Bindungspartnern eine so hohe Affinität (Affinitätskonstante  $K_A = 10^{15}$  L/mol [151]), dass ein Ablösen des *tet*-Operators nicht zu erwarten ist.

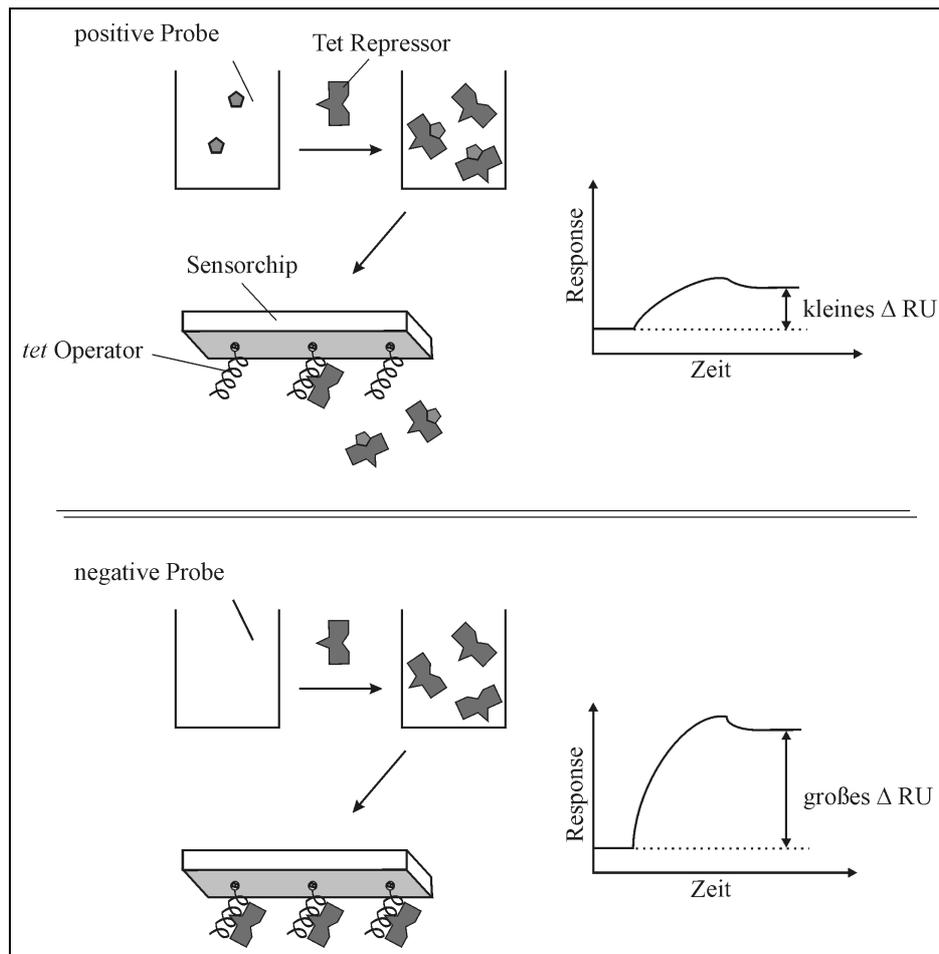
Für die Analyse wird in einem ersten Schritt der Chip mit TetR beladen. In dieser Form ist er bereit für die Probeninjektion. Das Tetracyclin in positiven Proben bindet an den Repressor, der daraufhin seine Konformation ändert und sich vom Operator ablöst. Das SPR-Signal fällt ab, da sich eine große Masse von der Chipoberfläche löst. Positive Proben zeigen also ein negatives Signal. Analytfreie Proben lösen den Repressor nicht vom Chip ab, und es kommt zu keiner Signaländerung.

Dieser Assay hat gegenüber dem direkten Nachweis den Vorteil der größeren Signalintensität aufgrund des Ablösens einer höheren Masse. Es ist deshalb zu erwarten, dass dieser Assay sensitiver ist als der direkte. Ein Nachteil ist die Tatsache, dass hier das Protein vor jeder Probeninjektion erneut auf dem Chip gebunden werden muss. Dies verlängert zum einen die Analysenzeit pro Probe, zum anderen wird dadurch ein Reagenz verbraucht, das nicht kommerziell zu erwerben ist. Jedoch wird durch den Einsatz eines frischen Proteins für jeden Zyklus eine dauerhaft gleich bleibende Aktivität des tetracyclinspezifischen Bindungspartners gewährleistet. Dieser Vorteil wiegt die etwas längere Analysenzeiten auf.

#### **5.4 Indirekter Gleichgewichts-Assay**

Eine weitere Möglichkeit für einen indirekten Assay, bei dem ebenfalls der Tetracyclin-Repressor und nicht das Tetracyclin nachgewiesen wird, ist in Abbildung 5-4 dargestellt. Auch für diesen Aufbau ist eine Bindung des *tetO* an dem Sensorchip nötig, so dass hier ein Chip mit dem gleichen Aufbau wie in dem zuvor beschriebenen Format verwendet werden kann.

Die Probe wird vor der eigentlichen SPR-Analyse mit Repressor-Protein inkubiert. Bei positiven Proben bindet das Tetracyclin an den Repressor, und es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen freiem TetR und dem [TetR\*TC]-Komplex ein. Der Komplex kann nicht an den immobilisierten Operator binden und das Signal wird mit steigender Tetracyclin-Konzentration in der Probenlösung geringer. Bei negativen Proben wird TetR in freier Form auf den SPR-Chip injiziert und kann vollständig an den immobilisierten Operator binden. Das resultierende SPR-Signal ist maximal.



**Abbildung 5-4** Schematische Darstellung des indirekten Gleichgewichts-Assays zum Nachweis von Tetracyclin.

Diese Art des Assays hat den Nachteil, dass durch die vorangehende Inkubation ein zusätzlicher Arbeitsschritt nötig ist. Zudem wird auch bei dieser Variante des Assays TetR verbraucht. Allerdings bietet sich hier die Möglichkeit bei Matrixstörung Matrix-Blindwerte anzufertigen. Durch Inkubation der Probe ohne Zugabe des Repressors und anschließende Biosensor-Analyse kann der Anteil des SPR-Signals ermittelt werden, der allein durch die Wechselwirkungen zwischen Matrix und Chipoberfläche entsteht. Dieser kann vom erhaltenen Probensignal abgezogen werden und man erhält das Messsignal, das durch in der Probe enthaltenes Tetracyclin verursacht wurde. Diese Vorgehensweise bedingt jedoch die doppelte Analysenzahl, so dass sie nur bei einzelnen Proben angewendet werden kann.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Ribosome als Bindungspartner für einen tetracyclinspezifischen SPR-Assay

Ausgangspunkt für die Arbeiten mit Ribosomen waren die Versuche von Degand et al. [158], die Ribosome (aus *Bacillus stearothermophilus*) als Bindungspartner zum Nachweis von Tetracyclinen und Makrolid-Antibiotika verwendeten. Dazu setzten sie Ribosome und radioaktiv markiertes Tetracyclin bzw. Erythromycin einer Lebensmittelprobe zu. Der radioaktive Marker konkurriert mit dem Rückstand aus der Probe um die Bindungsstellen am Ribosom. Je mehr Rückstand in der Probe ist, desto weniger Marker kann an das Ribosom binden. Durch Adsorption an Aktivkohle und anschließende Zentrifugation trennten Degand et al. die freien Antibiotika von den ribosomal gebundenen. Anschließend wurde die an den Ribosomen verbliebene Radioaktivität bestimmt. Auf diese Weise gelang Degand et al. der Nachweis von Tetracyclinen und Makroliden in Schweine- und Hühnerfleisch an ihrem jeweiligen MRL (maximum residue limit).

Für die Entwicklung eines tetracyclinspezifischen SPR-Assays sollten in dieser Arbeit mehrere Strategien verglichen werden. Kern eines solchen Assays ist der Rezeptor für das Antibiotikum. Dieser sollte zum einen eine hohe Bindungsaffinität zum Analyten besitzen. Zum zweiten sollte für die Entwicklung eines indirekten Assay-Formates die Masse des Rezeptors hoch sein, um eine ausreichende Nachweisempfindlichkeit zu erreichen. Prokaryotische Ribosome haben ein Molekulargewicht zwischen 0,85 und 1,45 MegaDa [48] und zeigen mit einer Bindungskonstante von  $1,3 \cdot 10^6$  L/mol [159] eine gute Bindung zum Tetracyclin. Sie sollten sich daher für einen SPR-Assay eignen.

#### 6.1.1 Isolierung von Ribosomen

In einer Bakterienzelle liegen während der Zellteilung ca. 20.000 Ribosome vor [160], da hier in großem Umfang Proteine benötigt werden. Aus diesem Grund sollten die Bakterien kurz vor Ende ihrer exponentiellen Wachstumsphase geerntet werden.

Zunächst wurde das Bakterium *Bacillus stearothermophilus* für die Isolierung der Ribosome verwendet. Dabei handelt es sich um ein grampositives, stäbchenförmiges Bakterium, das in

der Lage ist, terminale Endosporen zu bilden. Es zeigt ein Wachstumsoptimum bei einer Temperatur von 55-60 °C [161].

Um möglichst hohe Zellausbeuten zu erreichen, wurde das Bakterium in einem Medium mit doppelt konzentriertem Nährstoffgehalt unter Zusatz von Mangan, Calcium und Magnesium (pH 7,0) bei 60°C im Wasserbad kultiviert. Wie Wachstumskurven zeigten, ging das Bakterium bereits bei einer optischen Dichte (OD) von 1,2 (gemessen bei 600 nm) von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase über. Daher wurden die Bakterien bei einer OD<sub>600</sub> von maximal 1,0 geerntet. So konnte eine Zellausbeute von rund 7g Feuchtgewicht aus 1 Liter Medium erhalten werden.

Die Isolierung der Ribosome erfolgte in Anlehnung an Madjar [162] und Doucet-Populaire [163]. Dazu wurden die Bakterienzellen mit einer French Press aufgeschlossen und die Ribosome durch mehrere aufeinander folgende Zentrifugationsschritte von anderen Zellbestandteilen getrennt. Abschließend wurden die Ribosome von Substanzen geringerer Dichte abgetrennt, indem sie durch eine 1molare Saccharoselösung zentrifugiert wurden (siehe Abschnitt 10.1, Seite 152). Die Isolierung der Ribosome aus *B. stearothermophilus* führte jedoch nur zu sehr geringen Ausbeuten. So konnten aus 1 Liter Medium nur rund 500 µl einer Lösung mit 4 µg/ml Ribosomen erhalten werden.

Um eine höhere Ausbeute zu erhalten, wurde für weitere Versuche das Bakterium *Escherichia coli* genutzt. Dabei handelt es sich um ein gramnegatives Bakterium, dass bei einer Temperatur von 37 °C kultiviert werden kann. Das Medium für eine möglichst hohe Zellausbeute wurde mit 1 % Glucose versetzt und durch den Zusatz von 50 mmol/L Dinatriumhydrogenphosphat gepuffert, da *E. coli* bei der Verstoffwechslung von Zucker verschiedene Säuren bildet, die den pH-Wert des Mediums auf ein für das Bakterium ungünstigen Wert absenken können [164]. Bei Kultivierung in diesem Medium konnte der Übergang von der exponentiellen in die Stationäre Wachstumsphase des Bakteriums bei einer OD<sub>600</sub> von rund 6,5 beobachtet werden. *E. coli* konnte also bis zu einer OD von mehr als 4 problemlos kultiviert werden, so dass aus einem Liter Medium 24 g Zellen Feuchtgewicht erhalten werden konnten. Die Isolierung der Ribosome aus *E. coli* erbrachte eine Ausbeute von 108 mg/ml in insgesamt rund 300 µl Lösung. Da bei der Isolierung aus *B. stearothermophilus* nur geringe Ribosomenausbeuten erhalten wurden, wurden hier die im letzten Schritt der Aufreinigung pelletierten Ribosome in einem geringen Puffervolumen aufgenommen um höher konzentrierte Lösungen zu erhalten.

## **6.1.2 Bestimmung der Aktivität der Ribosome**

Nach Isolierung der Ribosome sollte deren Aktivität bestimmt werden, um festzustellen, ob sie im Zuge der Aufreinigung beschädigt wurden. Für den SPR-Assay ist alleine die Tetracyclin-Bindungsfähigkeit der Ribosome wichtig. Daher wurde deren Unversehrtheit über die Bindung des Antibiotikums bestimmt. Dazu wurden verschiedene Verfahren angewendet.

### **6.1.2.1 ELISA mit Konkurrenz zwischen Ribosom und Primärantikörper**

Für den Nachweis einer Bindung von Tetracyclin durch die isolierten Ribosome wurden diese in einem kommerziellen Tetracyclin-ELISA-Kit in Konkurrenz mit dem tetracyclin-spezifischen Primärantikörper des Testkits eingesetzt (siehe Abbildung 6-1). Da die Bindungsaffinität des im Testkit enthaltenen Antikörpers zum Tetracyclin nicht bekannt war, wurden sehr hohe Konzentrationen an Ribosomen mit diesem in Konkurrenz gesetzt. Dadurch war auch bei einer stärkeren Bindung des Antikörpers zum Tetracyclin eine Verdrängung durch Ribosome zu erwarten.

In dem Testkit war eine bereits mit Tetracyclin vorimmobilisierte Mikrotiterplatte enthalten. Zur Kontrolle des korrekten Versuchsablaufs wurden zwei Tetracyclin-Standard-Lösungen („0,05 µg/L TC“ und „4050 µg/L TC“) des Kits und eine Blindprobe („ohne Rib“) jeweils ohne Zugabe von Ribosomen gemessen. Um eine eventuelle unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers an Ribosome zu erkennen, wurde eine Kavität mit Ribosomen, aber ohne Primärantikörper befüllt. In die anderen Kavitäten wurden Ribosomen-Lösungen in unterschiedlichen Konzentrationen gegeben. In jede Kavität wurde zusätzlich zu den Standards bzw. den Ribosomen-Lösungen der Primärantikörper in konstanter Konzentration gegeben. Die Zusammensetzung der Lösungen in den jeweiligen Kavitäten ist in Tabelle 6-1 zusammengefasst.

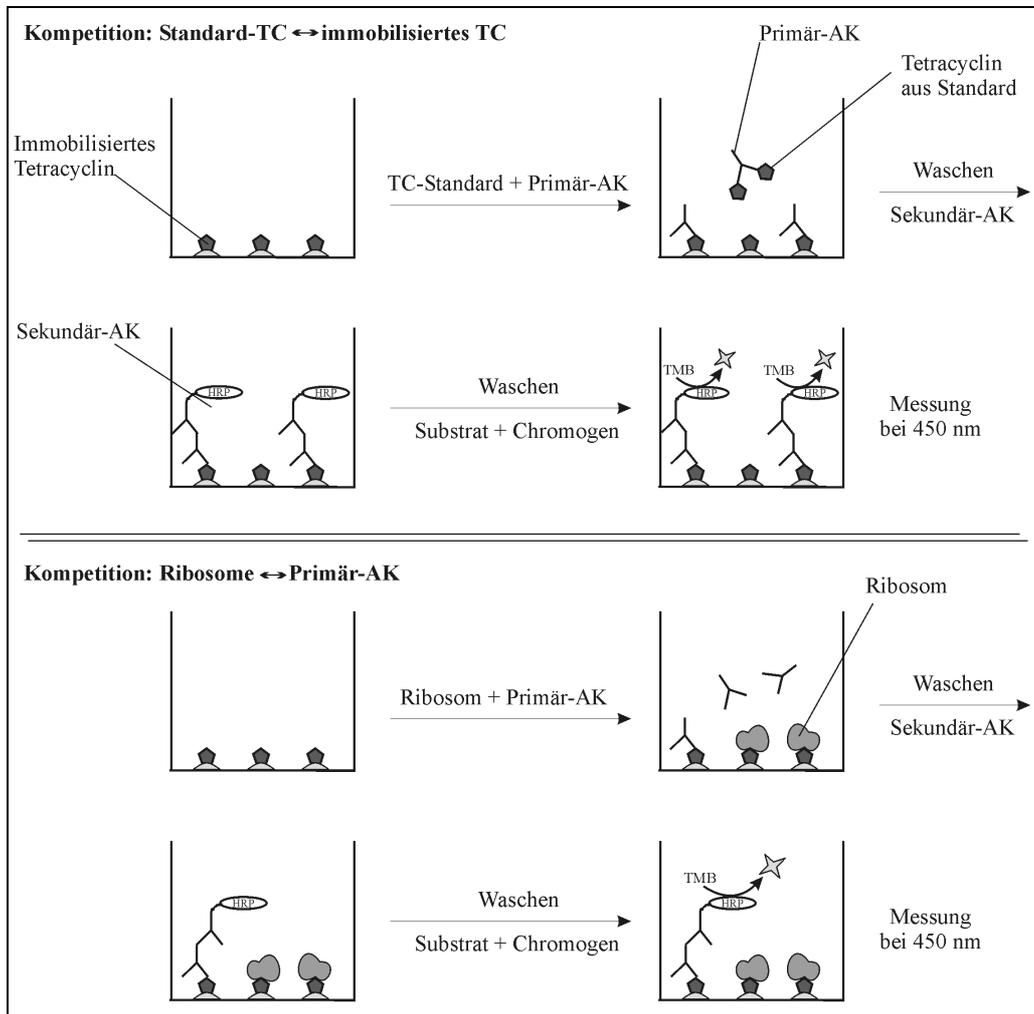
	Ribosomen- Konz [µg/ml]	Tetracyclin- Konz [µg/L]	Primär- antikörper	Zweck
„ohne Rib“	-	-	ja	Blindwert (Maximal- OD des Tests)
„0,05 µg/L TC“	-	0,05	ja	Positivkontrolle des Tests
„4050 µg/L TC“	-	4050	ja	
„kein Primär-AK“	100.000	-	-	unspezifische Wechselwirkungen
„1 µg/ml Rib“	1	-	ja	Verdrängung des Primärantikörpers durch Ribosome
„10 µg/ml Rib“	10	-	ja	
„100 µg/ml Rib“	100	-	ja	
„10.000 µg/ml Rib“	10.000	-	ja	
„100.000 µg/ml Rib“	100.000	-	ja	

**Tabelle 6-1 Zusammensetzung der Lösungen in der jeweiligen Kavitäten für den ELISA mit Konkurrenz zwischen Ribosome und Tetracyclin-Antikörper. Die Lösung des Primärantikörpers wurde nach den Vorgaben des Testkits eingesetzt.**

Während der folgenden Inkubationszeit waren folgende Vorgänge möglich (siehe auch Abbildung 6-1):

- a) In den Kavitäten ohne Ribosomen-Zusatz bindet bei Abwesenheit von Tetracyclin der Primärantikörper an das immobilisierte Tetracyclin und bleibt beim folgenden Waschschrift an der Oberfläche haften. Im zweiten Schritt wird ein Sekundärantikörper zugegeben, der gegen den Primärantikörper gerichtet und mit Meerrettichperoxidase markiert ist. Dieser binden an den Primärantikörper und setzt das im letzten Schritt zugegebene Substrat in ein farbiges Produkt um. Die gemessene Farbintensität ist bei negativen Standards maximal.
- b) Bei den Tetracyclin-Standard-Lösungen bindet der zugegebene Primärantikörper teilweise in der Lösung befindliches Tetracyclin. Diese Bindungsstellen sind für eine Bindung an das immobilisierte Tetracyclin blockiert. Im folgenden Waschschrift werden die nicht an der Oberfläche haftenden Antikörper entfernt. Der nun zugesetzte Sekundärantikörper kann nur an die verbliebenen Primärantikörper binden, so dass die abschließende Farbreaktion schwächer ausfällt als bei Standards ohne Tetracyclin (In Abbildung 6-1 oben).
- c) In den Kavitäten mit Ribosomen sollten diese mit dem ebenfalls zugegebenen Primärantikörper um die oberflächengebundenen Tetracyclin-Moleküle konkurrieren. Dabei sollte sich mit steigender Konzentration an Ribosomen eine stärkere

Verdrängung des Antikörpers zeigen, was letztlich zu einer zunehmend schwächeren Farbreaktion führen sollte (in Abbildung 6-1 unten).



**Abbildung 6-1** Schematische Darstellung des Ablaufes des Tetracyclin-ELISA und des erwarteten Ablaufes des modifizierten ELISA zum Nachweis einer Bindung von Tetracyclin an die isolierten Ribosome. Erläuterung siehe Text.

Abbildung 6-2 zeigt die gemessenen Extinktionswerte. Die maximale Extinktion („ohne Rib“) lag bei 1,528. Die beiden Tetracyclin-Standards zeigten in Abhängigkeit vom Tetracyclin-Gehalt geringere Extinktionswerte, so dass von einer einwandfreien Arbeitsweise des ELISAs auszugehen war. Wurde kein Primärantikörper zugegeben, konnte nur eine minimale Extinktion von 0,041 gemessen werden. Es konnte demnach auch keine Kreuzreaktivität des Sekundärantikörpers mit den zugesetzten Ribosomen festgestellt werden. Die Ribosomen-Lösungen zeigten unabhängig von ihrer Konzentration eine Extinktion von rund 1,2. Sie lagen damit zwar etwas niedriger als die maximale Extinktion des Blindwertes, von einer Verdrängung des Primärantikörpers durch Ribosome war aber dennoch nicht auszugehen. In

diesem Fall hätte eine Abhängigkeit der Extinktion von der Konzentration der eingesetzten Ribosome erkennbar sein müssen.

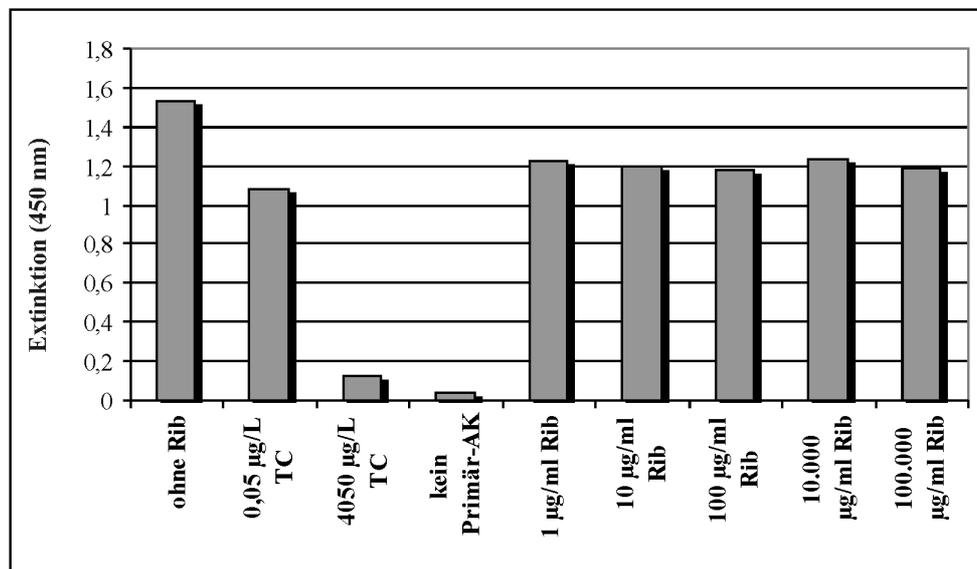


Abbildung 6-2 Extinktionswerte des ELISA mit Konkurrenz zwischen Primärantikörpern und Ribosomen. „1-100.000 µg/ml Rib“ stellen unterschiedliche Konzentrationen der Ribosomen-Lösung dar, die in Konkurrenz zu Lösungen des Primärantikörpers gesetzt wurden, „ohne Rib“ bedeutet Zugabe einer reinen Pufferlösung ohne Ribosomen-Zusatz, „0,05 µg/L TC“ und „4050 µg/L TC“ sind zwei Tetracyclin-Standards, die als Kontrolle für die Funktionsweise des Testkits ohne Zusatz von Ribosomen vermessen wurden, und bei „kein Primär-AK“ wurde nur die Ribosomen-Lösung ohne Primärantikörper zugegeben, um eine evtl. Kreuzreaktion des Sekundärantikörpers mit Ribosomen erkennen zu können.

Mit dem modifizierten Tetracyclin-ELISA konnte keine Bindung der Ribosome an die oberflächengebundenen Tetracycline nachgewiesen werden. Dies könnte durch sterische Hinderungen der großen Ribosome mit der Oberfläche der Mikrotiterplatte verursacht worden sein. Um dies zu überprüfen, wurden weitere Messungen durchgeführt.

### 6.1.2.2 Affinitäts-Kapillarelektrophorese

Die Affinitäts-Kapillarelektrophorese bietet die Möglichkeit, Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Ligand zu untersuchen, ohne die Notwendigkeit der Markierung oder der Bindung eines der beiden Moleküle an eine Oberfläche. Dazu wird die Wanderungsgeschwindigkeit eines geladenen Liganden im elektrischen Feld beobachtet. Bindet dieser an einen Rezeptor und verändert sich dabei die Ladung oder das Molekulargewicht, so ändert sich auch die Wanderungsgeschwindigkeit [165; 166]. Als Maß für die Wanderungsgeschwindigkeit dient die sog. Migrationszeit, also die Zeit, die das Molekül benötigt, um von der Injektion am einen Ende der Kapillare bis zum Detektor am anderen Ende zu gelangen.

Um einen möglichst deutlichen Unterschied der Migrationszeiten zu erkennen, wurde die Wanderungsgeschwindigkeit des Tetracyclins beobachtet. Dieses sollte durch die Bindung an das Ribosom einen Komplex mit einer sehr viel größeren Masse bilden und aufgrund dessen eine starke Migrationsänderung erfahren. Die Ribosomen wurden in wechselnden Konzentrationen im Elektrophoresepuffer vorgelegt und Tetracyclin in gleich bleibender Konzentration injiziert. Für die Messung mit Ribosomen aus *B. stearothersophilus* wurden 45  $\mu\text{mol/L}$  Tetracyclin mit Ribosomen-Konzentrationen von 0 bis 74  $\mu\text{mol/L}$  vermessen. Die Messung der *E. coli*-Ribosome erfolgte mit einem deutlichen Überschuss an Tetracyclin gegenüber der eingesetzten Menge an Ribosomen (siehe Tabelle 6-2).

Konzentration Ribosom		Migrationszeiten [min]	
[ $\mu\text{g/ml}$ ]	[ $\mu\text{mol/L}$ ]	<i>E. coli</i>	<i>B. stearothersophilus</i>
0	0	18,31 $\pm$ 0,04	18,37 $\pm$ 0,03
50	18,5	18,87 $\pm$ 0,05	18,55 $\pm$ 0,04
100	37,0	19,19 $\pm$ 0,05	19,12 $\pm$ 0,07
200	74,0	19,56 $\pm$ 0,00	19,55 $\pm$ 0,04

**Tabelle 6-2 Migrationszeiten der unterschiedlich konzentrierten Ribosomen-Lösungen. Die Messungen mit den *E. coli*-Ribosomen wurden mit 450  $\mu\text{mol/L}$  Tetracyclin, die Messungen mit den *B. stearothersophilus*-Ribosomen mit 45  $\mu\text{mol/L}$  Tetracyclin durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 3 Einzelmessungen.**

Tabelle 6-2 zeigt die zur Messung eingesetzten Ribosomen-Konzentrationen sowie die bestimmten Migrationszeiten für Ribosome beider Organismen. Sowohl bei Ribosomen aus *B. stearothersophilus* als auch aus *E. coli* konnte eine leichte Zunahme der Migrationszeiten mit steigender Ribosomen-Konzentration festgestellt werden. Die Migration des Tetracyclins bei der Injektion der höchsten Ribosomen-Konzentration lag jeweils rund 80 Sekunden höher als ohne Ribosomen-Zusatz. Daher konnte von einer Bindung von Tetracyclin an die isolierten Ribosome ausgegangen werden. Es ließ sich kein Unterschied zwischen dem Zusatz von Ribosomen unterschiedlicher Herkunft feststellen. Die Bindung von Tetracyclin an die Ribosome beider Organismen war demnach vergleichbar. Über das Ausmaß der Bindung des Tetracyclins an die isolierten Ribosome konnten keine Aussagen gemacht werden. Dazu wären weitere Messreihen notwendig gewesen. Eine Erhöhung der Migrationszeit von nur rund 1,2 Minuten bei Anbindung eines Moleküls mit einer Masse von mehreren kDa ist jedoch gering.

### 6.1.2.3 Gleichgewichtsanalysen

Um quantitative Aussagen über eine Bindung von Tetracyclin an die isolierten Ribosome machen zu können, wurden beide Bindungspartner in einem Reaktionsgefäß miteinander gemischt und inkubiert. Nach Einstellung eines Gleichgewichtszustandes zwischen gebundenem und freiem Tetracyclin wurde das freie Antibiotikum abgetrennt und konnte über eine HPLC-Analyse quantifiziert werden. Je aktiver die Ribosome waren, desto weniger Tetracyclin sollte als frei vorliegend gemessen werden können.

Die Trennung des freien vom gebundenen Antibiotikum wurde auf zwei unterschiedlichen Wegen erreicht. Zum einen wurde eine Ultrazentrifugation durchgeführt, die zu einer Sedimentierung der Ribosome und dem daran gebundenen Tetracyclin führte. Das freie Tetracyclin konnte im Überstand bestimmt werden. Als zweite Möglichkeit der Trennung wurde eine Zentrifugationsfiltereinheit (Centriprep<sup>®</sup>) verwendet. Dabei wird die Trennung durch eine semipermeable Membran erreicht, die mit einem Größenausschluss von 50 kDa die Ribosome zurückhielt, während das nicht gebundene Tetracyclin ungehindert durch die Membran ins Filtrat gelangen konnte.

Herkunft / Konzentration Ribosom [μmol/L]	Konzentration TC		Inkuba- tionszeit [min]	Konzentration freies TC [mg/L]	Trennung durch	
	[μmol/l]	[mg/L]				
<i>E. coli</i>	2,2	23,00	10,0	30	9,93	Zentrifu- gation
	2,2	0,23	0,1	30	0,096	
	2,2	-	-	30	-	
<i>E. coli</i>	2,2	0,23	0,1	60	0,10	Centriprep <sup>®</sup>
<i>B. stearo- thermophilus</i>	0,7	0,23	0,1	30	0,078	

**Tabelle 6-3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Gleichgewichtsanalysen**

Tabelle 6-3 zeigt die eingesetzten Verhältnisse von Ribosomen zu Tetracyclin. Um sicher zu gehen, dass eine Bindung auch bei schlechter Aktivität der Ribosome erkannt würde, wurden molare Verhältnisse von Tetracyclin zu Ribosomen im Bereich von 1:10 bis 10:1 verwendet. Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte bei 37 °C.

Bei keiner der Analysen mit Ribosomen aus *E. coli* konnte eine Bindung des Antibiotikums nachgewiesen werden. Das eingesetzte Tetracyclin konnte auch bei verdoppelter Inkubations-

zeit in vollem Umfang als frei nachgewiesen werden. Einzig die Verwendung der aus *B. stearothermophilus* isolierten Ribosome brachte einen kleinen Erfolg, indem ca. 20 % des eingesetzten Tetracyclins über die indirekte Analyse als ribosomal gebunden nachgewiesen wurde. Jedoch ist diese Bindung bei einem 3-fachen molaren Überschuss der Ribosomen zum Tetracyclin sehr gering.

Bei den isolierten Ribosomen konnte keine ausreichende Bindung von Tetracyclin nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden die Versuche, Ribosome für den Aufbau eines tetracyclinspezifischen SPR-Assays zu verwenden, eingestellt.

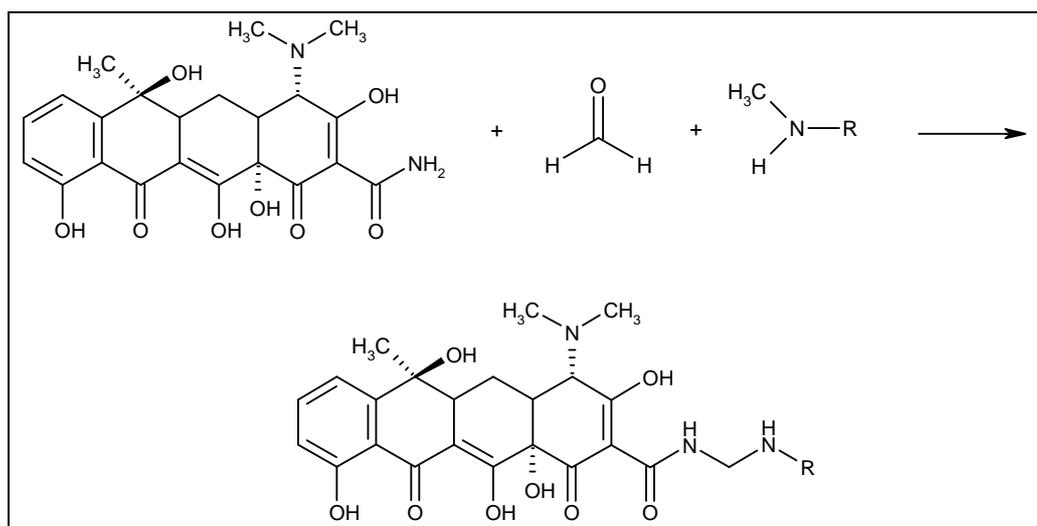
### **6.1.3 Versuche zur Herstellung von Tetracyclin-Derivaten für einen indirekten SPR-Assay**

Um einen indirekten SPR-Assay aufzubauen, muss ein Tetracyclin-Derivat an die Chipoberfläche gekoppelt werden (prinzipieller Aufbau siehe Abschnitt 5.1, Seite 47). Dieses sollte über ein Spacer-Molekül gekoppelt sein, das eine ausreichende Entfernung zur Oberfläche ermöglicht um so sterische Behinderungen des Tetracyclin-Rezeptor-Proteins (TetR oder Ribosom) durch die Chipoberfläche selbst möglichst zu verhindern. Solche Hinderungen würden zur Abschwächung oder sogar zum völligen Verlust des Tetracyclin-Bindevermögens führen.

Zur Kopplung von Tetracyclin an die Chipoberfläche wurde ein bifunktionelles Reagenz gesucht. Dabei sollte es sich um ein möglichst einfaches Molekül handeln, um unspezifischen Wechselwirkungen mit Matrixbestandteilen vorzubeugen. Zudem sollte es in der Lage sein, eine Distanz zwischen dem Tetracyclin-Molekül und der Oberfläche zu ermöglichen, um eine ungehinderte Bindung des Rezeptors zu gewährleisten. Die Kopplung wurde mit der 12-N-Methylamino-Laurinsäure versucht, da dieses Molekül mit seine Aminofunktion prinzipiell in der Lage sein sollte, über Formaldehyd mit dem Tetracyclin zu reagieren [167]. Die Methylierung der Aminogruppe verhinderte eine mögliche Anlagerung eines zweiten Tetracyclin-Moleküls. Über die Carboxylfunktion der Laurinsäure wäre eine Kopplung des Tetracyclin-Derivates an die Oberfläche eines Sensorchips möglich.

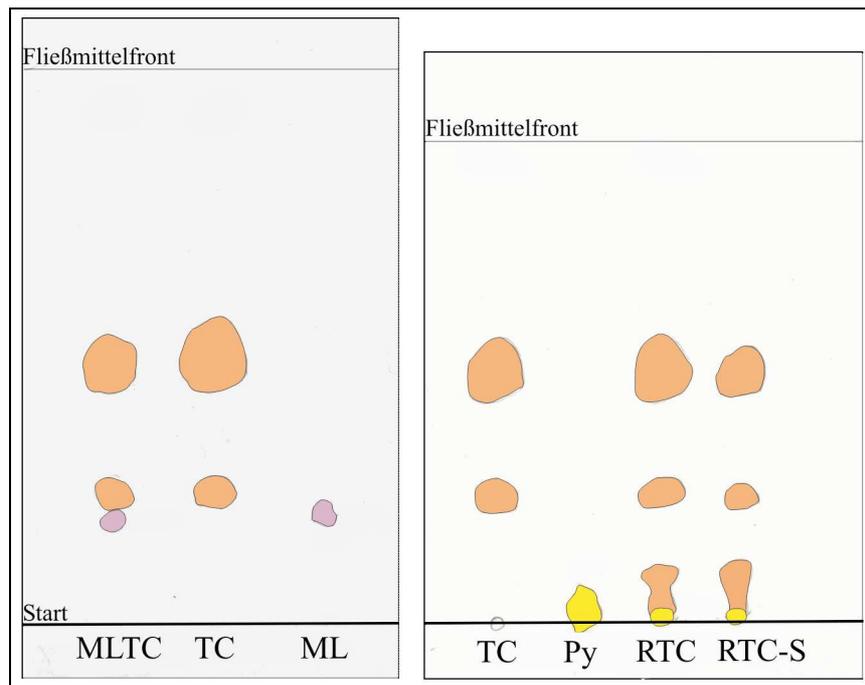
Ito et al. [168] beschrieben 1977 die Umsetzung von Amiden mit verschiedenen Aminosäuren unter Verwendung von Formaldehyd nach dem in Abbildung 6-3 angegebenen Reaktionsschema. Dabei wurden die Reaktionspartner in Ethanol gelöst, gemischt und über Nacht bei

Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Produkt im Kühlschrank auskristallisiert. Bei dieser einfachen Reaktionsführung erhielten Ito et al. die Produkte in Reinform mit Ausbeuten zwischen 42 und 94 %. Über diese als Einhornreaktion bekannte Reaktion wurde auch Tetracyclin an unterschiedliche Amine [167; 169], Aminosäuren [170] und Proteinen [92; 93] gekoppelt. Dabei unterschieden sich die einzelnen Versuchsbedingungen lediglich in der Wahl des Lösungsmittels, der molaren Verhältnisse der Reaktionspartner und der Reaktionstemperatur.



**Abbildung 6-3** Postulierter Reaktionsablauf von Tetracyclin mit Methylaminen unter Verwendung von Formaldehyd

Die Derivatisierung von Tetracyclin mit der 12-N-Methylamino-Laurinsäure über Formaldehyd wurde unter unterschiedlichen Reaktionsbedingungen versucht. Dabei wurde in Methanol oder t-Butanol sowohl bei Raumtemperatur als auch unter Erhitzung auf den Siedepunkt gearbeitet. Eine Umsetzung des Tetracyclins konnte unter keinen Reaktionsbedingungen festgestellt werden. Die zur Reaktionskontrolle angefertigten Dünnschichtchromatogramme zeigten nur die beiden Ausgangssubstanzen (siehe Abbildung 6-4 links).



**Abbildung 6-4** Dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle der Derivatisierungsversuche des Tetracyclins. MLTC = Methylamino-Laurinsäure-Tetracyclin, TC = Tetracyclin, ML = Methylamino-Laurinsäure, Py = Pyrrolidin, RTC = selbst synthetisiertes Rolitetracyclin, RTC-S = Rolitetracyclin-Standard. Reaktionsbedingungen siehe Abschnitt 10.3.1, Seite 160.

Zur Kontrolle der Reaktion wurde unter den bei Gottstein et al. [167] angegebenen Reaktionsbedingungen versucht, Rolitetracyclin aus Tetracyclin, Formaldehyd und Pyrrolidin zu synthetisieren. Hier zeigte die DC-Kontrolle eine Umsetzung an. Der Vergleich mit einem käuflichen Rolitetracyclin-Standard brachte eine vollständige Übereinstimmung (Abbildung 6-4 rechts). Sowohl bei dem selbst synthetisierten, als auch bei dem käuflichen Standard waren neben dem Produkt auch beide Edukte zu erkennen. Es scheint, dass das Rolitetracyclin unter den Bedingungen der Dünnschichtchromatographie instabil ist und innerhalb weniger Minuten wieder zerfällt.

Tetracyclin konnte mit 12-N-Methylamino-Laurinsäure und Formaldehyd nicht umgesetzt werden. Jedoch war die Reaktion mit Pyrrolidin möglich, führte aber zu einem instabilen Produkt. Bei dem indirekten SPR-Assay sollte das Tetracyclin-Derivat an die Chipoberfläche immobilisiert werden und dort für möglichst lange Zeit stabil bleiben. Dies konnte mit einem Tetracyclin-Derivat, welches über die Amidfunktion in Ring A gekoppelt wird, nicht gewährleistet werden (siehe hierzu auch Diskussion in Abschnitt 7.2 auf Seite 125). Ein indirektes Assay-Format ließ sich über diesen Weg nicht entwickeln.

## 6.2 SPR-Untersuchungen mit dem Tetracyclin Operator-Repressor-System

Die SPR-Analysen zu dieser Arbeit wurden an zwei unterschiedlichen Geräten durchgeführt. Durch eine Kooperation mit der Universität Utrecht (Institute for Risk Assessment Sciences), Niederlande stand das SPR-Spektrometer Biacore 3000<sup>®</sup> zur Verfügung. Hier war die Messzeit jedoch begrenzt, so dass alle Messungen an diesem Gerät über einen Zeitraum von August 2004 bis Dezember 2005 mit insgesamt 6 Wochen reiner Messzeit durchgeführt werden mussten. Später ergab sich eine Kooperation mit der Firma Biacore<sup>®</sup>. Dadurch stand für die Weiterentwicklung des Tetracyclin-Assays das SPR-Spektrometer Biacore Q<sup>®</sup> in Wuppertal zur Verfügung.

Da zu Beginn dieser Arbeit die Messzeit an einem SPR-Spektrometer begrenzt und nur wochenweise möglich war, wurden bereits in einem sehr frühen Entwicklungsstadium des Tetracyclin-Assays Untersuchungen mit Matrix durchgeführt. In dem Bewusstsein der unüblichen Vorgehensweise (Messungen mit Matrix bevor die Optimierungen mit Standard-Lösungen abgeschlossen waren) wurde der Assay früh auf seine Anwendbarkeit für die Matrizes Rohmilch und Honig geprüft. Parallel dazu wurden (später auch auf dem Biacore Q<sup>®</sup>) weitere Optimierungsversuche (z.B. TetR-Variante, Injektionsdauer der TetR-Lösung, Immobilisierungslevel der Operator-DNA,...) durchgeführt.

## 6.3 Aufbau der Repressor-Proteine

Für die Entwicklung des Biosensor-Assays für Tetracycline standen durch eine Kooperation mit der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg 5 TetR-Varianten zur Verfügung: TetR(BD), TetR(DB)S135L, TetR(D)V113A, TetR(B)P184Q und scTetR(BD).

Abbildung 6-5 zeigt die Aminosäuresequenz jeweils eines Monomers der beiden Wildtypen TetR(B) und TetR(D), sowie der synthetischen Varianten TetR(BD) und scTetR(BD).



Bei dem Repressor-Protein TetR(BD) handelt es sich um eine synthetische Chimäre aus den beiden Wildtypen TetR(B) und TetR(D) [171]. Die Aminosäuren 1-50 stammen aus dem Wildtyp TetR(B). Diese schließen die drei Helices  $\alpha 1$  bis  $\alpha 3$  ein, welche für die Bindung an den Operator verantwortlich sind. Durch diese Aminosäuresequenz bekommt das chimäre Protein die hohe Bindungsaffinität des TetR(B) zum Operator mit [171]. Die restlichen Aminosäuren stammen aus dem Wildtyp TetR(D). Somit beinhaltet die Chimäre TetR(BD) im gesamten Molekül kein Cystein, was dem Protein eine geringere Oxidationsempfindlichkeit und damit verbunden eine höhere Stabilität und bessere Handhabbarkeit verleiht.

Das Protein TetR(BD)S135L ist eine Mutante des oben beschriebenen TetR(BD). Dabei wurde die Aminosäure Serin an Position 135 durch Leucin ersetzt. Scholz et al. [68] konnten zeigen, dass dieser Austausch zu einer erhöhten Bindungsaffinität des Repressors bezüglich Tetracyclin und einiger Derivate führt.

Bei TetR(D)V113A, eine Mutante von TetR(B), wurde an Stelle 113 Valin durch Alanin ersetzt. Die Aminosäure an Position 113 ist an der Bindung des Tetracyclins beteiligt. Auch dieser Austausch führt zu einer Erhöhung der Bindungsaffinität von Tetracyclin zum Repressor [172; 173].

Auch bei der TetR-Variante TetR(B)P184Q wurde eine Aminosäure ausgetauscht. Das Original-Protein TetR(B) weist an Stelle 184 ein Prolin auf, welches durch ein Glutamin ersetzt wurde. Viele Proteine haben die Eigenschaft, bei zu hohen Verdünnungen zu denaturieren, was eine Bindung von Tetracyclin verhindern würde. Der Austausch der Aminosäuren an Stelle 184 bewirkt eine Verbesserung der Stabilität [174].

Als weitere TetR-Variante mit erhöhter Stabilität wurde der Repressor scTetR(BD) getestet. Dieser ist eine Mutante von TetR(BD), bei dem die beiden Untereinheiten des Proteins durch Einfügen einer 27 Aminosäuren umfassenden Kette miteinander kovalent verknüpft wurden. Dadurch weist das Protein eine erhöhte Stabilität gegenüber Denaturierung durch von Dissoziation der beiden Monomere bei kleinen Konzentrationen auf [175].

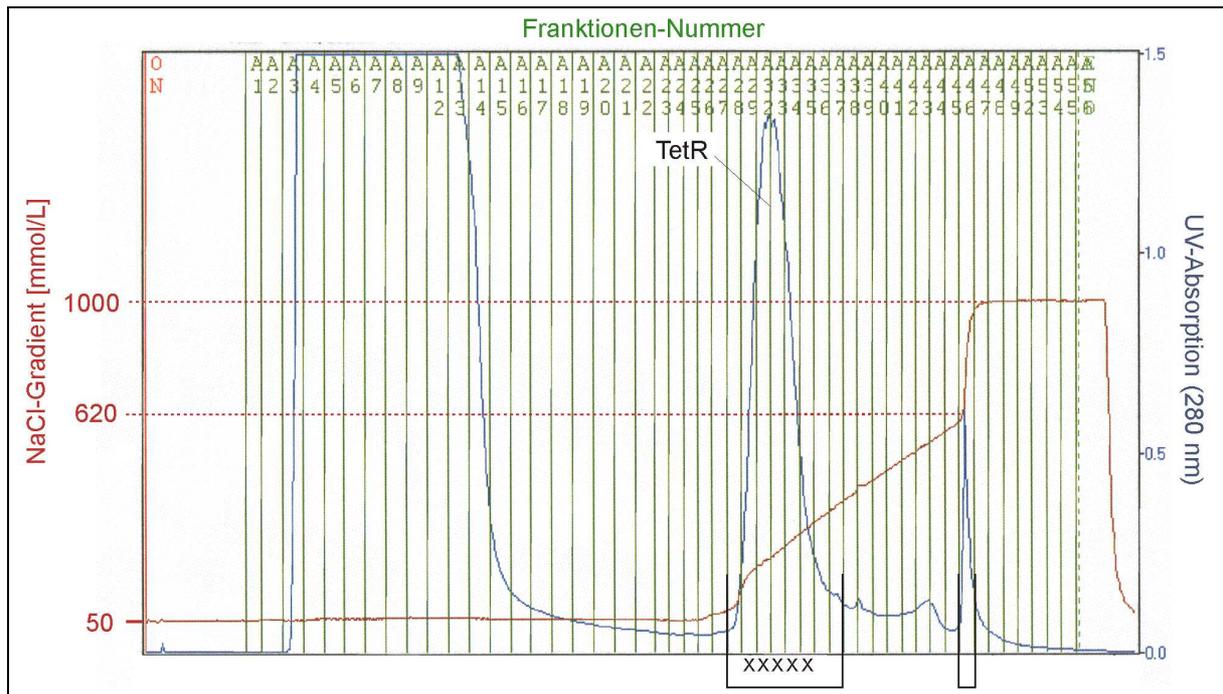
## 6.4 Expression und Isolierung der Repressor-Proteine TetR(BD) und TetR(BD)S135L

Von den für diese Arbeit verwendeten Repressor-Proteinen wurden TetR(BD) und TetR(BD)S135L eigenständig isoliert. Die anderen Varianten wurden mir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. W. Hillen, Universität Erlangen-Nürnberg als aufgereinigte Proteine zur Verfügung gestellt.

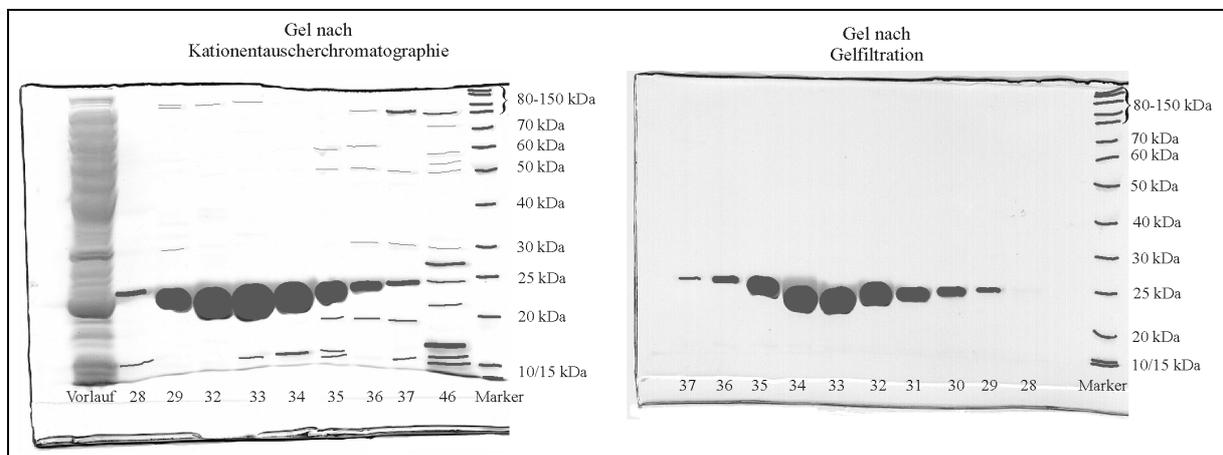
Die Isolierung der Tet-Repressoren erfolgte an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen. Es standen Plasmide zur Verfügung, bei denen die Gensequenz für die jeweilige TetR-Variante unter Transkriptionskontrolle eines starken synthetischen Promotors stand. Die Plasmide wurden in *E. coli* transformiert und dort exprimiert. So war es möglich, eine hohe Proteinausbeute zu erhalten.

Die Expression und Isolierung der Repressor-Proteine wurde wie in Abschnitt 10.4, Seite 160 beschrieben durchgeführt. Nach dem Zellaufschluss wurden grobe Zellbestandteile über eine Zentrifugation abgetrennt. Aus dem Zellextrakt wurde anschließend das jeweilige Repressor-Protein zunächst mittels Kationenaustauscher-Chromatographie angereichert. Dazu wurde der Zellextrakt vollständig auf die Säule aufgebracht und mit einem linearen Natriumchlorid-Gradienten von 50 bis 620 mmol/L in einem 20 mmol/L Phosphatpuffer pH 6,6 von der Kationenaustauscher-Säule eluiert. Nach der Elution des TetR wurde die Säule mit einem NaCl-Gehalt von 1000 mmol/L gespült. Die Elution der Proteine wurde über ihre UV-Absorption bei 280 nm verfolgt (Abbildung 6-6). Die meisten Fremdproteine wurden im Vorlauf bei 50 mmol/L NaCl eluiert (bei SDS-PAGE nicht sichtbar, da sie nicht im dargestellten Größenbereich lagen), während der Repressor in den Fraktionen 28 bis 37 von der Säule gespült wurde. Zur Bestätigung der Identität des bei diesen Fraktionen eluierten Proteins und zur Kontrolle der Reinheit wurden Proben aus den jeweiligen Fraktionen über eine SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Er wurde in dem Polyacrylamid-Gel mit einer Masse von rund 23,3 kDa detektiert, da es sich hierbei um das Monomer handelt. Die Fraktionen 29 – 35 wurden für die weitere Aufreinigung des Repressor-Proteins vereinigt.

Eine Probe aus Fraktion 46 wurde ebenfalls mittels SDS-PAGE analysiert, um zu überprüfen, ob es sich bei dem zu diesem Zeitpunkt eluierten Protein auch um den Repressor handelt. Dies konnte ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 6-7, links).



**Abbildung 6-6** Elutionsprofil der Kationenaustauscher-Säule für die Aufreinigung von TetR(BD)S135L. In blau gezeigt ist die UV-Absorption der Proteine bei 280 nm, in rot eingezeichnet ist der NaCl-Gradient. Die Nummern der Fraktionen, in denen das Eluat gesammelt wurde, sind am oberen Bildrand angegeben. Durch schwarze Striche sind die mittels SDS-PAGE analysierten Fraktionen, durch schwarze Kreuze die zur weiteren Aufreinigung vereinigten Fraktionen markiert.

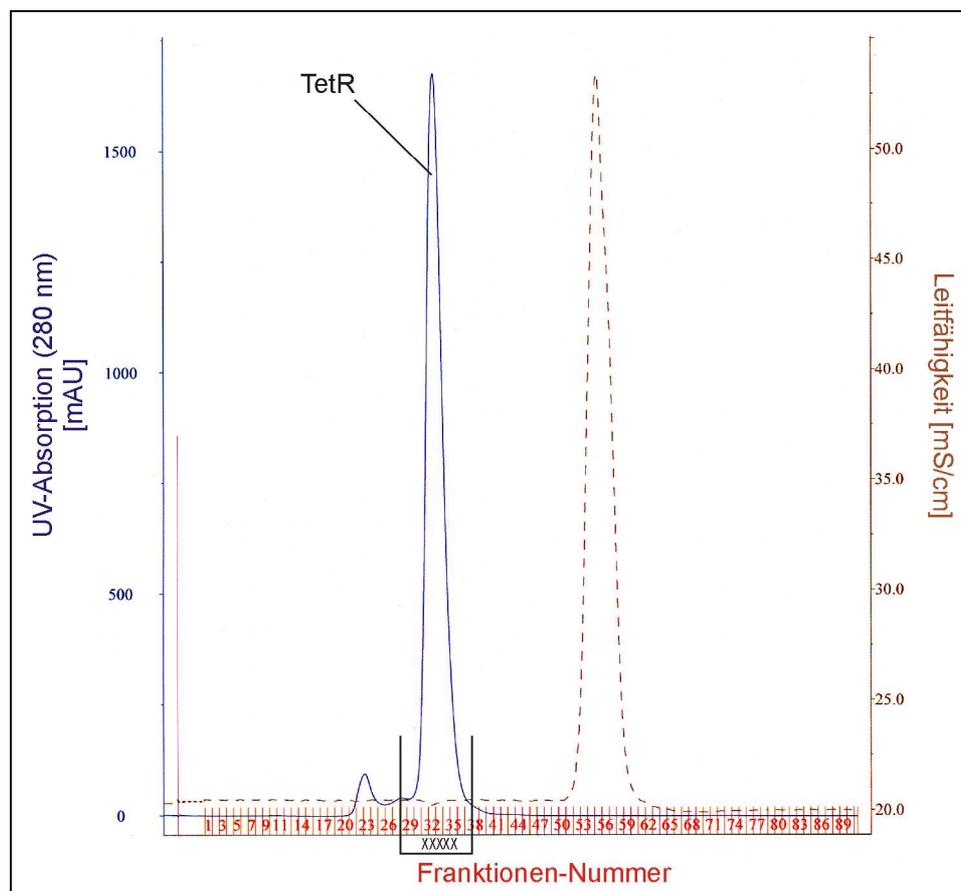


**Abbildung 6-7** Kontrolle der Aufreinigung der Repressor-Proteine mittels Kationenaustauscher-Chromatographie und Gelfiltration am Beispiel des TetR(BD)S135L durch SDS-PAGE (10 %ig). Aufgetragen wurden jeweils 5  $\mu$ l (Verdünnung: 3  $\mu$ l Probe + 5  $\mu$ l Puffer) aus den gesammelten Fraktionen.

Eine weitere Anreicherung und Volumenverringerng auf ein für die anschließende Gelfiltration geeignetes Volumen wurde durch eine fraktionierte Ammoniumsulfat-präzipitation erreicht. Durch die sich anschließende Gelfiltration wurde der Repressor von anderen Proteinen befreit. Abbildung 6-8 zeigt das Elutionsprofil der Proteine von der

Gelfiltrations-Säule. Der Repressor eluiert hauptsächlich in den Fraktionen 28-37, was durch das zur Kontrolle angefertigte SDS-Gel bestätigt wurde (Abbildung 6-7 rechts). Das SDS-Gel zeigt auch deutlich, dass die Repressor-Lösung nach der Gelfiltration praktisch keine Fremdproteine mehr enthält.

Abbildung 6-8 zeigt in blau die UV-Absorption der Proteine bei 280 nm und in braun die Leitfähigkeit der von der Säule eluierten Lösung. Die Signalerhöhung in den Fraktionen 52 bis 60 ist auf die Elution des Ammoniumsulfates aus der zuvor durchgeführten Proteinpräzipitation zurückzuführen.



**Abbildung 6-8** Elutionsprofil der Proteine von der Gelfiltrations-Säule zur Aufreinigung des TetR(BD)S135L. In blau dargestellt ist die UV-Absorption bei 280 nm in Milliabsorptions-Einheiten (mAU), in braun eingezeichnet ist die Leitfähigkeit. Die Nummern der gesammelten Fraktionen sind in rot am unteren Bildrand angegeben. Durch schwarze Striche sind die mittels SDS-PAGE analysierten Fraktionen, durch schwarze Kreuze die zur weiteren Aufreinigung vereinigten Fraktionen markiert.

Die Fraktionen 31-35 wurden vereinigt und das Volumen mittels Zentrifugationsfiltereinheiten mit einem Größenausschluss von 20 kDa reduziert.

Nach der Aufreinigung folgten eine photometrische Konzentrationsbestimmung bei 280 nm (Abschnitt 10.4.5, Seite 165) und eine Aktivitätsmessung des Proteins über die Zunahme der

Fluoreszenz von Anhydrotetracyclin bei der Bindung an den Repressor (Abschnitt 10.4.6, Seite 166). Tabelle 6-4 gibt die Ergebnisse dieser Messungen wieder.

Repressor	Konzentration [mg/ml]	Konzentration [ $\mu\text{mol/L}$ ]*	errechnete Aktivität [%]
BD	10,14	435,1	107
S135L	9,98	428,1	121

**Tabelle 6-4 Konzentration und errechnete Aktivität der isolierten Repressor-Proteine TetR(BD) und TetR(BD)S135L. \* Die Konzentrationsangabe in  $\mu\text{mol/L}$  bezieht sich auf das Monomer.**

Bei der Aktivitätsbestimmung zeigte sich eine Bindung von Anhydrotetracyclin, die über der berechneten lag. Daraus ergaben sich Aktivitäten von mehr als 100 %. Wahrscheinlich wurde dies durch Ungenauigkeiten bei Konzentrations- und Aktivitätsbestimmung und Fehlern, die beim Pipettieren von kleinen Volumina auftreten verursacht. Da jedoch die Aktivität von beiden Repressor-Proteinen mit mehr als 100 % bestimmt wurde, kann von einer annähernd 100 %igen Aktivität ausgegangen werden.

## 6.5 Vergleich der Assay-Formate

Um einen sensitiven Tetracyclin-Assay aufzubauen, sollten die drei möglichen Assay-Formate miteinander verglichen werden. Dazu sollte zunächst getestet werden, mit welchem Format Tetracycline in den geringsten Konzentrationen nachgewiesen werden können. Dieses sollte anschließend optimiert werden. Der Vergleich der Assay-Formate wurde mit dem SPR-Gerät Biacore 3000<sup>®</sup> durchgeführt.

### Direktes Assay-Format

Zunächst wurde das direkte Format (Abschnitt 5.2, Seite 48) getestet, wobei an der Chipoberfläche gebundenes TetR die mit einer Standard-Lösung injizierten Tetracycline binden sollte. Da das Tetracyclin-Molekül mit 444 g/mol eine sehr geringe Masse aufweist, musste möglichst viel Tetracyclin aus der Standard-Lösung gebunden werden, um empfindlich messen zu können. Deshalb wurde die Chipoberfläche mit TetR gesättigt. Auf dem verwendeten CM-5-Chip konnten Immobilisierungslevel von rund 15.500 RU erreicht werden, was 333 pmol/mm<sup>2</sup> TetR entspricht.

Um dieses Assay-Format zu testen, wurden Pufferlösungen mit 50, 100, 250 und 500 mg/L Tetracyclin dotiert. Diese wurden mit 4 unterschiedlichen Flussraten vermessen, wobei das

Injektionsvolumen jeweils so angepasst wurde, dass die Injektionsdauer konstant auf 5 Minuten gehalten wurde. Tabelle 6-5 zeigt die erhaltenen Messwerte [RU].

		Konzentration [mg/L]			
		50	100	250	500
Flussrate [ $\mu\text{l}/\text{min}$ ]	2	59,9	70,7	128,3	193,2
	5	15,3	19,9	38,3	58,5
	10	10,7	12,5	27,5	44,9
	20	5,9	7,3	19,3	38,3

Tabelle 6-5 Messwerte in RU, die mit dem direkten Assay-Format erhalten wurden. Es wurden unterschiedlich konzentrierte Tetracyclin-Lösungen mit 4 Flussraten vermessen, wobei die Injektionsdauer auf 5 Minuten konstant gehalten wurde.

Man erkennt eine deutliche Abhängigkeit des Messsignals von der verwendeten Flussrate, die bei dem Übergang von 2 auf 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  besonders stark ausgeprägt war. Hier nahm das Messsignal bei allen Tetracyclin-Konzentrationen im Schnitt um den Faktor 3,5 ab. Bei Flussraten oberhalb von 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  war nur noch ein geringer Abfall zu beobachten (siehe auch Abbildung 6-9).

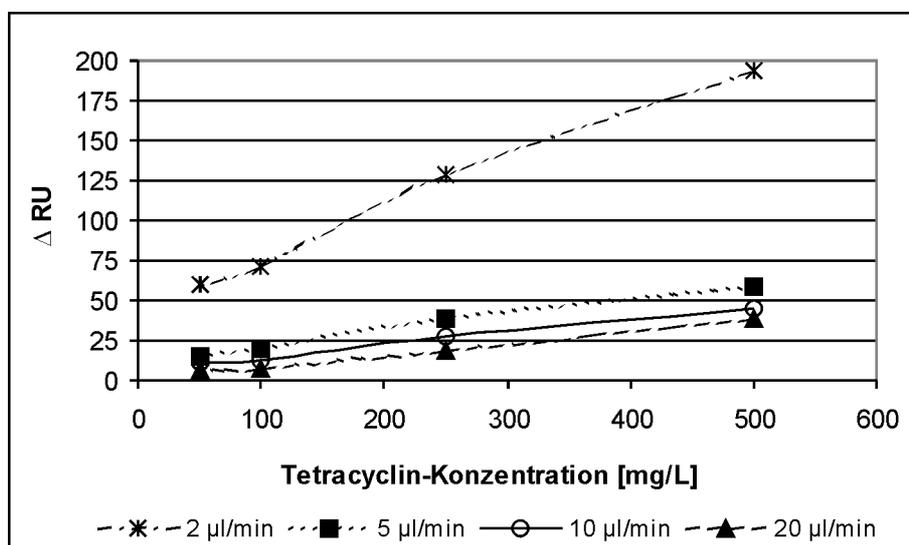


Abbildung 6-9 Abhängigkeit des Messsignals von der Tetracyclin-Konzentration bei unterschiedlichen Flussraten im direkten Assay-Format.

Im Konzentrationsbereich von 100 bis 500 mg/L war für alle Flussraten eine lineare Abhängigkeit des Messsignals von der Tetracyclin-Konzentration zu erkennen. 50 mg/L schien jedoch etwas außerhalb des linearen Bereiches zu liegen, was sich an dem Abknicken

der Kurven bei dieser Konzentration erkennen lässt. Es ist davon auszugehen, dass die Nachweisgrenze dieser Assay-Variante in der Nähe von 50 mg/L Tetracyclin in Puffer liegt. Die für diesen Assay gewählten Tetracyclin-Konzentrationen lagen im Bereich 50 bis 500 mg/L und damit mindestens um den Faktor 500 höher als der MRL in Milch (100 µg/kg). Folglich konnte auch unter optimierten Bedingungen keine ausreichende Nachweisempfindlichkeit erreicht werden, so dass sich dieses Assay-Format nicht für den Rückstandsnachweis von Tetracyclinen eignete.

### **Indirekter Assay mit *tetO* und TetR**

Als zweite Möglichkeit des Tetracyclin-Nachweises wurde ein indirekter Weg gewählt. Hierbei wurde der Operator an den Chip gebunden und in einem zweiten Schritt mit TetR belegt. Bei dieser Assay-Variante wird die zur Quantifizierung genutzte Signaländerung durch das Ablösen des Proteins bei Anwesenheit von Tetracyclin verursacht (siehe Abschnitt 5.3, Seite 49). Da TetR ungefähr ein 100-fach höheres Molekulargewicht als Tetracyclin besitzt, sollte mit diesem Assay eine verbesserte Nachweisempfindlichkeit erreichbar sein.

Es wurden drei *tetO*-Immobilisierungslevel (72, 132 und 779 RU) mit unterschiedlich konzentrierten TetR-Lösungen (2,5 bis 10 µmol/L) im Konzentrationsbereich von 0 bis 100 µg Tetracyclin pro Liter Puffer getestet.

Bei einer *tetO*-Belegung von 72 RU war nur eine sehr geringe Abhängigkeit des Messsignals von der injizierten Tetracyclin-Menge zu erkennen (siehe Tabelle 6-6). Es befand sich nicht genug *tetO* auf der Chipoberfläche, um TetR in einer für einen sensitiven Assay ausreichender Menge zu binden. Mit steigender Operator-Belegung nahm der  $\Delta$  RU-Wert bei hohen Tetracyclin-Konzentrationen deutlich zu, so dass bei 799 RU *tetO* bereits ein Signalunterschied von 369 RU zwischen einem Blindwert und einem Standard mit 100 µg/L Tetracyclin beobachtet werden konnte. Dieser Effekt wurde mit zunehmender *tetO*-Belegung deutlicher.

Die Konzentration des injizierten Repressors hingegen zeigte nur minimalen Einfluss auf das Messsignal. Es konnte ein leichter Anstieg der  $\Delta$  RU-Werte mit sinkender TetR-Konzentration beobachtet werden. Dies war vor allem bei der Flusszelle mit der höchsten Operator-Bindung ausgeprägt.

Tetracyclin-Konzentration [µg/L]	72 RU <i>tetO</i>	132 RU <i>tetO</i>	799 RU <i>tetO</i>	TetR-Konzentration [µmol/L]
100	-4,9	-45,7	-342,1	10
50	0,2	-21,6	-202,9	
20	3,6	-4,0	-79,4	
10	5,0	3,4	-22,5	
5	5,5	6,6	1,4	
0	5,6	7,6	17,2	
100	-6,3	-49,2	-360,4	5
50	-0,4	-26,9	-216,8	
20	2,5	-8,4	-94,5	
10	3,8	-0,9	-36,5	
5	3,8	3,7	-6,4	
0	5,2	7,2	16,4	
100	-6,9	-50,2	-357,2	2,5
50	-1,6	-29,0	-219,8	
20	1,8	-11,3	-109,5	
10	3,6	-2,3	-42,2	
5	4,0	2,8	-8,1	
0	4,5	6,1	11,8	

**Tabelle 6-6** Abhängigkeit des  $\Delta$  RU bei unterschiedlicher *tetO*-Belegung von der Tetracyclin-Konzentration im indirekten Assay mit *tetO* und TetR. Der Einfluss der Konzentration der TetR-Lösung wurde ebenfalls im Bereich 2,5 bis 10 µmol/L untersucht.

Durch die Nutzung des großen Repressor-Proteins für den Assay wurde eine „Signalverstärkung“ gegenüber dem direkten Assay erreicht, so dass der Nachweis von Tetracyclin im angestrebten Konzentrationsbereich von ca. 100 µg/L erreicht werden konnte.

### Indirekter Gleichgewichts-Assay

Für die dritte Assay-Variante wurden tetracyclinhaltige Standard-Lösungen in Gegenwart des Repressor-Proteins bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei sollte das Tetracyclin an TetR binden, und bei der anschließenden SPR-Analyse eine Bindung des Repressors am chipgebundenen Operator verhindern (siehe Abschnitt 5.4, Seite 51). Nur der nicht mit Tetracyclin besetzte Repressor verursacht ein Signal, welches mit steigender Tetracyclin-Konzentration geringer werden sollte. Bei dieser Assay-Variante führen hohe TetR-Mengen

in der Mischung mit der tetracyclinhaltigen Lösung dazu, dass geringe Analyt-Mengen nur wenige TetR-Moleküle an der Bindung mit dem *tetO* hindern können, so dass noch genug freies TetR zur Verfügung steht, um den Operator auf der Chipoberfläche „abzusättigen“. Um mit diesem Assay möglichst sensitiv zu messen, wurde daher die TetR-Konzentration auf 0,05  $\mu\text{mol/L}$  in der Injektions-Lösung reduziert.

Es wurden Tetracyclin-Lösungen im Konzentrationsbereich von 0 bis 20  $\mu\text{g/L}$  in Laufpuffer<sup>3</sup> auf unterschiedlich stark mit *tetO* belegte Flusszellen vermessen. Durch die Injektion von 1,2  $\mu\text{g/ml}$  Tetracyclin ließ sich die Chipoberfläche regenerieren. Die Inkubation der Standard-Lösung mit TetR fand bei Raumtemperatur für Zeitspannen zwischen 6,5 und 50 Minuten statt. Zwischen unterschiedlichen Inkubationszeiten konnte kein Unterschied der TetR-Bindung beobachtet werden. Daher sind in Tabelle 6-7 nur die Messwerte, die durch 8-minütige Inkubation erhalten wurden wiedergegeben.

Tetracyclin-Konzentration [ $\mu\text{g/L}$ ]	72 RU <i>tetO</i>	132 RU <i>tetO</i>	799 RU <i>tetO</i>
0	15,7	53,0	337,2
5	15,7	52,7	332,1
10	14,9	53,6	337,5
20	14,3	50,9	319,0

**Tabelle 6-7** Messwerte erhalten mit dem indirekten Gleichgewichts-Assay mit unterschiedlicher *tetO*-Belegung. Die Tetracyclin-Lösungen wurden vor der Injektion auf den Sensorchip im Volumen-Verhältnis 1:1 mit 0,1  $\mu\text{mol/L}$  TetR(BD) gemischt und für 8 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Auch bei diesem Assay-Format zeigte sich die unterschiedlich starke Anbindung des Repressors in Abhängigkeit von der zuvor immobilisierten *tetO*-Menge. Die Flusszelle mit der höchsten Operator-Belegung war in der Lage, am meisten TetR zu binden.

Bei keiner der *tetO*-Belegungen konnte die Injektion einer Puffer-Lösung mit 10  $\mu\text{g/L}$  Tetracyclin von einem Blindwert unterschieden werden. Erst die Injektion von 20  $\mu\text{g/L}$  Tetracyclin lässt das Messsignal vom reinen Puffer abweichen. Im Gegensatz dazu konnte im indirekten Assay mit *tetO* und TetR bereits zwischen 0 und 5  $\mu\text{g/L}$  Tetracyclin unterschieden werden (siehe Tabelle 6-6, Seite 73). Die Nachweisempfindlichkeit nimmt durch eine Vorinkubation von tetracyclinhaltiger Lösung mit TetR und anschließender SPR-Analyse ab.

<sup>3</sup> Auf der Suche nach der Assay-Variante mit der besten Nachweisempfindlichkeit zeigte die zuvor getestete indirekte Assay-Variante mit *tetO* und TetR eine Empfindlichkeit unterhalb von 20  $\mu\text{g/L}$  Tetracyclin. Daher wurde aus Zeitgründen darauf verzichtet, den indirekten Gleichgewichts-Assay mit höheren Tetracyclin-Konzentrationen zu testen.

Da bei der Analyse der Tetracyclin-Standards im indirekten Assay mit *tetO* und TetR eine Unterscheidung zwischen einer Lösung mit 10 µg/L Tetracyclin von einem Blindwert problemlos möglich war, wurde diese empfindlichste Assay-Variante nun weiter charakterisiert und optimiert.

## **6.6 Charakteristika von Injektionszyklen und Messreihen im indirekten Assay mit *tetO* und TetR**

Zum besseren Verständnis sollen hier kurz einige der im Folgenden verwendeten Begriffe erläutert werden.

Jede Messreihe einer SPR-Analyse besteht aus einer Anzahl von hintereinander geschalteten Zyklen. Jeder Zyklus wiederum besteht aus einer Abfolge von Injektionen unterschiedlicher Lösungen, die zur Analyse einer Probe notwendig sind. In dem in Abbildung 6-10 dargestellten Sensorgramm ist die Reihenfolge der Lösungen angegeben, wie sie im Rahmen eines Zyklus bei dem indirekten Assay mit *tetO* und TetR (Abschnitt 5.3, Seite 49) über den Chip fließen. Dabei zeigt das Messsignal (= Response) bei der Injektion einer Lösung eine sprunghafte Änderung. Sie wird verursacht durch die Injektion einer Lösung mit einem vom Laufpuffer abweichenden Brechungsindex. Assoziations- und Diffusionsvorgänge (= Änderung der Masse auf der Chipoberfläche) werden durch diesen sog. Bulk-Effekt überlagert. Sie werden erst deutlich, wenn nach der Injektion einer Lösung wieder Laufpuffer über den Chip fließt und damit der Bulk-Effekt aufgehoben wird.

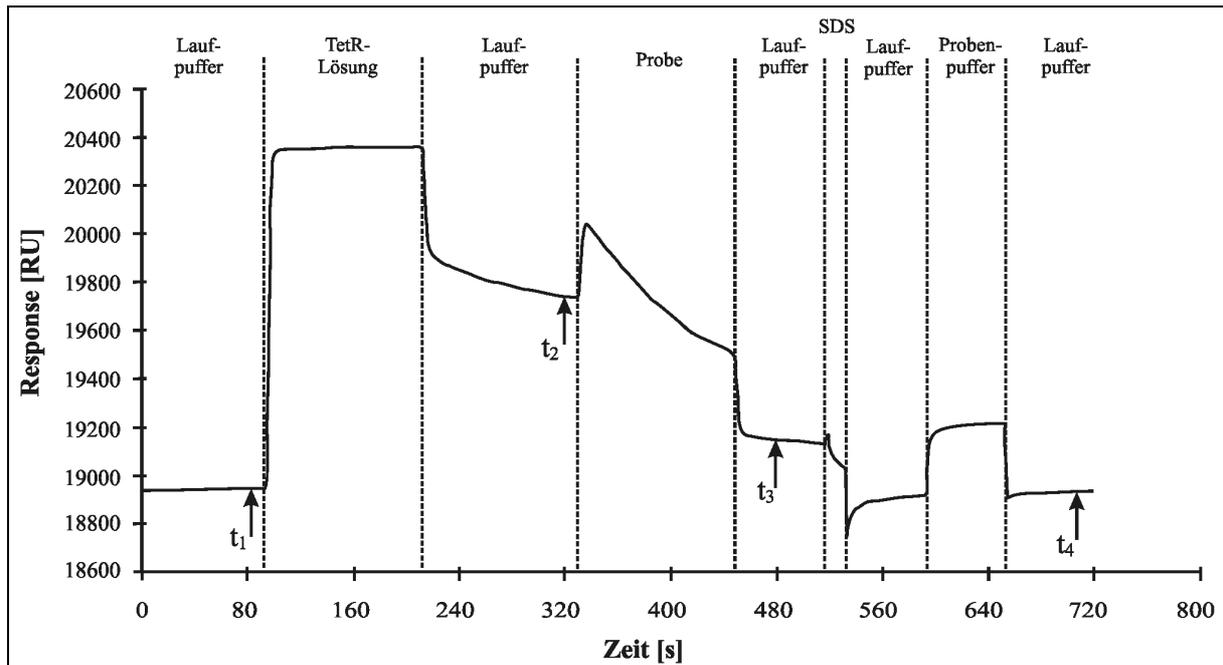


Abbildung 6-10 Sensorgramm eines Zyklus des indirekten SPR-Assays. Dargestellt ist die Injektion einer Standard-Lösung mit 20  $\mu\text{g/L}$  Tetracyclin und zwei Regenerationsschritten (SDS und Probenpuffer). Die Pfeile markieren die unterschiedlichen Messpunkte.

Zu bestimmten Zeiten wurden Messpunkte gesetzt, die das Messsignal zu diesem Zeitpunkt repräsentieren ( $t_1$  bis  $t_4$ ). Diese Messpunkte dienen zum Auswerten des jeweiligen Zyklus.

Es wurden Messpunkte zu folgenden Zeiten gewählt:

Messpunkt	Zeitpunkt
$t_1$	10 s vor TetR-Injektion
$t_2$	10 s vor Proben-Injektion
$t_3$	30 s nach Proben-Injektion
$t_4$	60 s nach Probenpuffer-Injektion

Tabelle 6-8 Lage der Messpunkte in einem Zyklus des indirekten Assay-Formates

Der Messpunkt  $t_1$  steht zu Beginn des Zyklus, bevor die erste Lösung injiziert und damit das Messsignal verändert wird.  $t_1$  repräsentiert damit den ausschließlich mit *tetO* belegten Chip. Eine Veränderung der Höhe dieses Messpunktes im Laufe einer Messreihe deutet auf eine Veränderung der Chipoberfläche hin. Ein Absinken kann die Ablösung des Operators und damit eine Verringerung der TetR-Bindungsstellen bedeuten, ein Ansteigen die stetige Anreicherung von Matrixkomponenten auf der Chipoberfläche. Der absolute Response zum Zeitpunkt  $t_1$  eines jeden Zyklus, aufgetragen gegen die jeweilige Zyklusnummer, wird in dieser Arbeit als Basislinie bezeichnet. Der Begriff der Basislinie wird hier also als Folge von

Messwerten unterschiedlicher Zyklen zum gleichen Zeitpunkt verstanden. Im Gegensatz dazu steht der Begriff der Basislinie, wie man ihn z.B. aus der Chromatographie kennt. Hier stellt die Basislinie eine fortwährende Betrachtung eines Messsignals dar.

Die Anbindung des Tet-Repressors an den *tet*-Operator in einem Zyklus kann durch die Differenz der Messwerte zum Zeitpunkt  $t_2$  und  $t_1$  bestimmt werden. Die Bildung einer Differenz aus zwei Messpunkten eines Zyklus wird als relativer Response bezeichnet. Trägt man diese Differenz gegen die jeweilige Zyklusnummer auf, so erhält man einen Graphen, der die TetR-Bindung über die gesamte Messreihe beschreibt. Sie gibt Auskunft über eventuellen Aktivitätsverlust des an der Chipoberfläche gebundenen Operators. Im Folgenden wird der Begriff TetR-Bindung synonym mit der Differenz der Signale zwischen den Messpunkten  $t_2$  und  $t_1$  für jeden Cyclus einer Messreihe verwendet.

Durch die Injektion einer tetracyclinhaltigen Lösung wird der Repressor teilweise von der Chipoberfläche abgelöst. Die Folge ist ein Signalabfall zwischen den Messpunkten  $t_2$  und  $t_3$ . Die Differenz der Messwerte an diesen beiden Punkten ist der injizierten Tetracyclin-Menge proportional. Der relative Response zwischen diesen beiden Messpunkten wird daher mit  $\Delta RU$  bezeichnet. Im Folgenden wird der  $\Delta RU$  mit negativem Vorzeichen versehen, um anzudeuten, dass es sich um ein Abfallen des SPR-Signals handelt. Bei einem Signalanstieg zwischen den Messpunkten  $t_2$  und  $t_3$  wird der  $\Delta RU$  mit positivem Vorzeichen dargestellt.

Nach der Injektion der Regenerationslösung(en) sollte das Messsignal wieder auf den Level zurücksinken, der zu Beginn des Zyklus ( $t_1$ ) bestand. Eine Differenz des Messsignals zwischen den Zeitpunkten  $t_4$  und  $t_1$  (innerhalb eines Zyklus) kann also zur Beurteilung der Effektivität der eingesetzten Regeneration herangezogen werden. Das relative Messsignal  $t_4$  minus  $t_1$  wird im Zuge dieser Arbeit auch als Regeneration bezeichnet.

Die vier soeben beschriebenen Parameter – die Basislinie, die TetR-Bindung, der  $\Delta RU$  und die Regeneration – wurden in dieser Arbeit routinemäßig für jede Messreihe ausgewertet.

## 6.7 Regeneration der Chipoberfläche

An die Regenerationsbedingungen werden bei SPR-Biosensoren besondere Anforderungen gestellt. Es muss gewährleistet sein, dass alle störenden Matrixkomponenten von der Chipoberfläche entfernt werden, ebenso wie - im hier vorgestellten Assay - das Repressor-Protein. Dabei darf jedoch die Bindung zwischen Streptavidin und biotinyliertem *tetO* nicht angegriffen werden, da sich dieser sonst vom Chip lösen würde. Darüber hinaus darf die Operator-DNA durch die Regenerationsbedingungen nicht beschädigt werden. Dies hätte ebenfalls einen Verlust der TetR-Bindung und damit eine Verschlechterung der Leistungsfähigkeit des Messsystems zur Folge.

Geeignete Regenerationsbedingungen zu finden ist jedoch nicht ganz einfach, da unterschiedliche Wechselwirkungen durch unterschiedlich Reagenzien aufgehoben werden müssen. So können beispielsweise ionische Wechselwirkungen durch Injektion einer Lösung mit hohem Salzgehalt oder Wechselwirkungen zwischen Lewis-Säuren und Lewis-Basen durch ein Reagenz mit wenig polaren Lösungsmitteln gelöst werden [176]. Häufig liegen jedoch unterschiedliche Wechselwirkungen gleichzeitig vor, die möglichst alle in einem Schritt gelöst werden sollen. Dass gerade die Art der Wechselwirkungen von Matrixkomponenten mit der Chipoberfläche im allgemeinen nicht bekannt sind, erschwert das Auffinden geeigneter Regenerationsbedingung zusätzlich. Um nicht dem Prinzip „Versuch und Irrtum“ folgen zu müssen, schlagen Andersson *et al.* [176; 177] eine strategische Vorgehensweise vor, die auf dem Prinzip des Experimental Design beruht. Sie verwenden 6 Stammlösungen aus jeweils mehreren Einzelkomponenten. Dabei sind alle Einzelkomponenten einer Stammlösung in der Lage, nur eine bestimmte Art von Wechselwirkung zu lösen. So nutzen sie beispielsweise eine Lösung aus Kaliumthiocyanat, Magnesiumchlorid, Harnstoff und Guanidin-Hydrochlorid, um ionische Wechselwirkungen zu lösen. Jede Stammlösung enthält mehrere Komponenten, da manchmal die Wahl der Substanz einen Einfluss auf die Regeneration hat. Brigham-Burke und O’shannessy [178] haben festgestellt, dass es bei der Regeneration in ihrem System nicht alleine auf den pH-Wert der Lösung ankam, sondern die Art der Säure eine wichtige Rolle spielte.

Jede der Stammlösungen wird – dem Experimental Design folgend - mit einer oder zwei anderen Stammlösungen zu einem Dreikomponenten-System gemischt. Diese Arbeitslösungen werden dann als Regenerationslösungen eingesetzt, wobei die besten Lösungen bei Bedarf weiter untersucht werden können, um herauszufinden, welcher / welche Inhaltsstoff(e) für die Regeneration verantwortlich waren, oder welche Inhaltsstoffe unnötig sind.

Für die Ermittlung eines geeigneten Regenerationsreagenzes wurden zunächst die drei Lösungen 0,5 % SDS in Laufpuffer, 20 mmol/L EDTA und 50 mmol/L NaOH in 1 mol/L NaCl getestet, indem jede in jeweils 6 aufeinander folgenden Zyklen als Regenerationsreagenz eingesetzt wurden. Als Matrix wurde entfettete, 1:5 verdünnte UHT-Milch ohne Tetracyclin-Zusatz injiziert. Die Regenerationskraft wurde als prozentualer Anteil der durch die Regenerationslösung vom Chip gespülten Masse (TetR und Matrix) von der zuvor gebundenen berechnet. Eine Regenerationskraft nahe 100 % zeigt ein vollständiges Ablösen des Repressors und der Matrixkomponenten von der Chipoberfläche an. Die Regenerationskraft der 3 Lösungen ist in Abbildung 6-11 mit schwarzen Balken dargestellt.

Die Lösung NaOH/NaCl zeigte mit einer Regenerationskraft von 155 % vermutlich ein Ablösen des *tetO* an, wohingegen EDTA zu keiner ausreichenden Regeneration führte. SDS war als einziges der getesteten Reagenzien in der Lage, die Chipoberfläche zu regenerieren, ohne diese anzugreifen. Da jedoch SDS die nachteilige Eigenschaft besitzt, sich in die Chipmatrix einzulagern und von dort nur langsam wieder entfernt werden kann [179] (siehe auch Abbildung 6-12), wurde nach einem anderen geeigneten Regenerationsreagenz gesucht. Diese Suche wurde gemäß dem von Andersson et al. vorgeschlagenen System durchgeführt, wobei jedoch die dort angegebene Lösung C – eine 20 mM EDTA-Lösung – durch eine 0,3 %ige SDS-Lösung (S) ersetzt wurde, da zuvor bereits festgestellt wurde, dass EDTA zur Regeneration nicht geeignet ist.

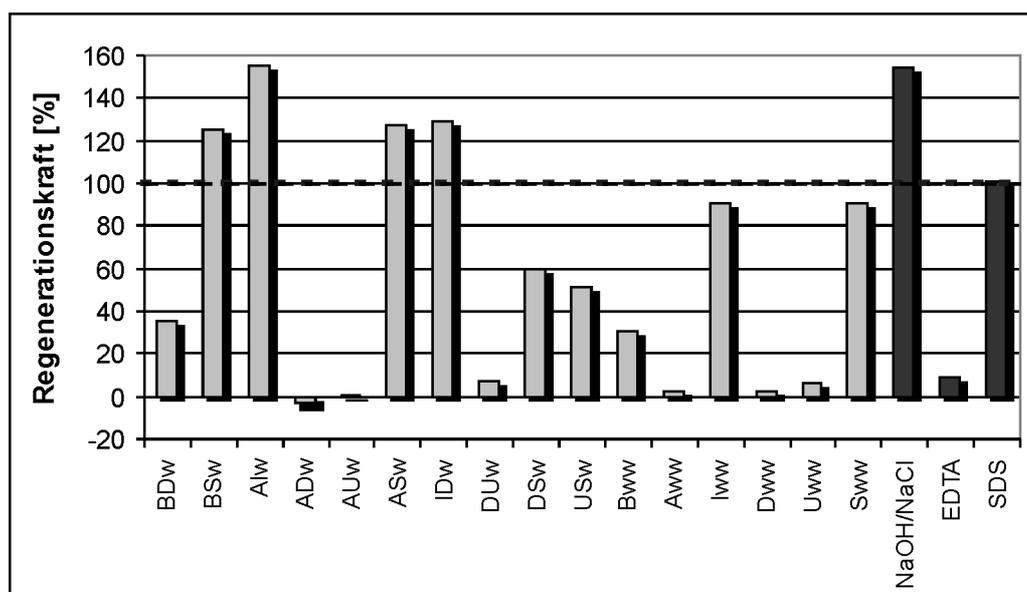
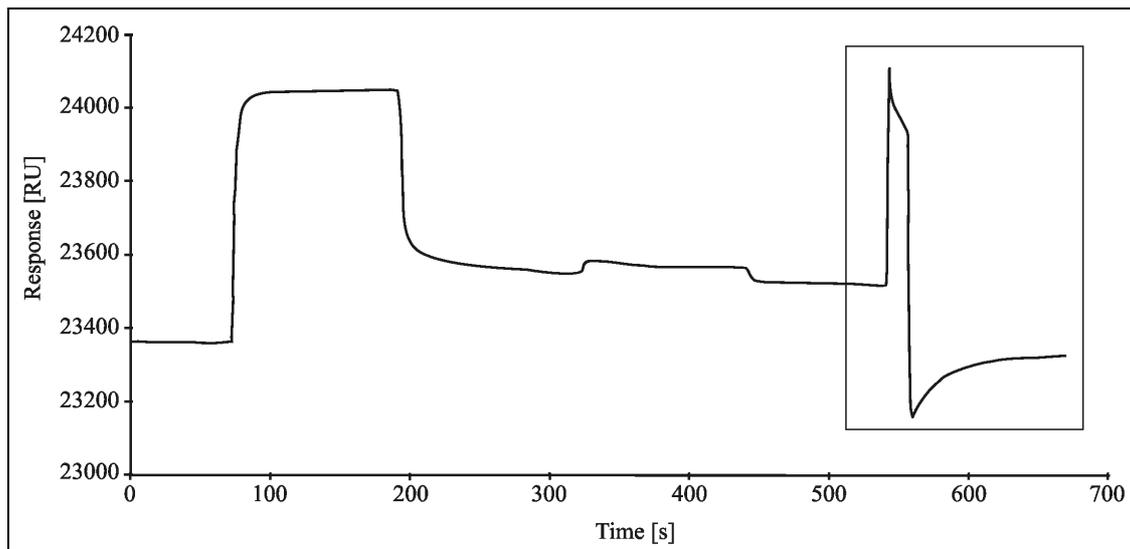


Abbildung 6-11 Regenerationskraft der unterschiedlichen Regenerationslösungen. Die Lösungen, die in separaten Messreihen getestet wurden, sind in schwarz dargestellt. Die in Grau dargestellten Lösungen entsprechen den Lösungen nach Andersson et al. [176; 177]. Jede Lösung besteht aus 3 Komponenten. B = basische Lösung, A = saure Lösung, D = Lösung mit Detergenzien, S = SDS-Lösung, I = ionische Lösung, U = Lösung mit unpolaren Lösungsmitteln, w = Wasser (Zusammenetzung siehe Abschnitt 10.6.3, Seite 173).



**Abbildung 6-12 Injektionszyklus mit SDS-Regeneration.** Eingerahmt dargestellt ist das Auswaschen von SDS nach der Regeneration aus der Chipmatrix.

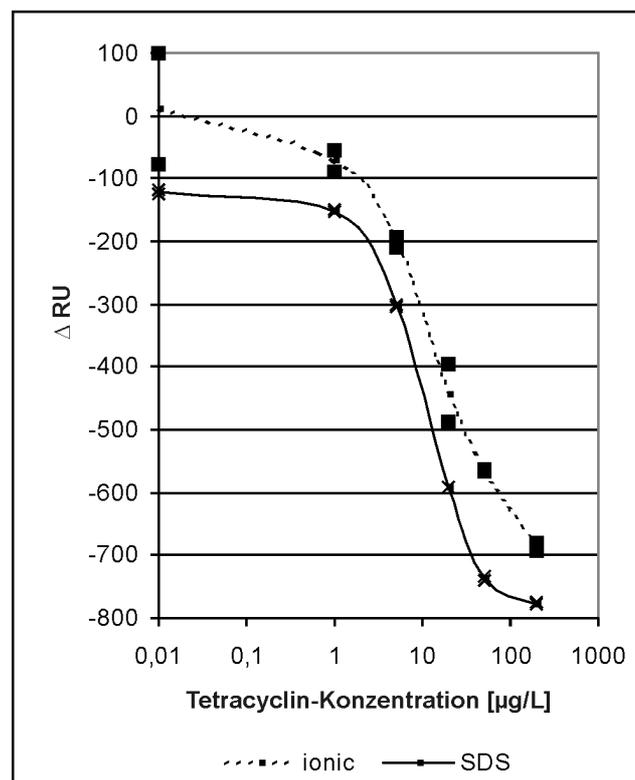
Abbildung 6-11 zeigt die Regenerationskraft jedes der getesteten 3 Komponenten-Systeme als graue Balken. Die Regenerationskraft der ionischen Lösung oder SDS, oder Lösungen, die einer dieser beiden Komponenten enthielten, besaßen die stärkste Regenerationskraft. Alle anderen Lösungen regenerierten die Chipoberfläche zu maximal 40 %. Die Mischungen BSw, AIw, ASw und IDw zeigten sogar eine Regenerationskraft von über 100 %. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Lösungen die Chipoberfläche angegriffen und einen Teil des *tetO* abgelöst haben. Die hier dargestellten Werte sind jedoch mit einem hohen Fehler behaftet, wie im Folgenden näher erläutert wird.

Die Regenerationskraft wurde wie folgt bestimmt: Als Bezugsgröße für die jeweilige Regenerationskraft diente die Masse an der Chipoberfläche aus dem vorangegangenen Cyclus. Zu ihr wurde die Masse in Relation gesetzt, die durch die Injektion der Regenerationslösung abgelöst werden konnte. Um für jede Regenerationslösung in etwa gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen, wurde nach Injektion jeder Regenerationslösung der Chip wieder erneut mit TetR und Matrix belegt. Einige Regenerationslösungen waren nicht in der Lage, TetR und die Matrixkomponenten vollständig von der Chipoberfläche zu entfernen. Es verblieb also nach jedem Zyklus eine wechselnde Menge an TetR bzw. Matrix auf dem Chip. Dies beeinträchtigt die Bindung v.a. von TetR im nächsten Zyklus, so dass die absolut auf den Chip befindliche Masse mit Ausnahme von Zyklus 1 nicht direkt aus dem jeweiligen Sensorgramm abgelesen werden konnte. Sie wurde deshalb berechnet als:

$$(\text{Masse auf Chip vor Regeneration})_{\text{Cy } x-1} - (\text{regenerierte Masse})_{\text{Cy } x-1} + (\text{addierte Masse})_{\text{Cy } x}$$

Da die Masse, die sich auf dem Chip befand, in Zyklus 1 direkt aus dem Sensorgramm abgelesen werden konnte, konnte von da aus gehend für jeden weiteren Zyklus die Masse mit dieser Formel abgeschätzt werden. Dabei kommt es jedoch zwangsläufig zu Ungenauigkeiten, was ebenfalls zu einer rechnerischen Regenerationskraft von mehr als 100 % führen kann.

Ausgehend von den in Abbildung 6-11 dargestellten Resultate kam als Alternative zu SDS nur die von Andersson et al. vorgeschlagene ionische Lösung in Betracht. Bei ihrer Verwendung für die Regeneration stellte sich jedoch heraus, dass zwar eine vollständige Regeneration der Chipoberfläche ohne Angriff auf das gebundene *tetO* – erkennbar an der stabilen Basislinie bzw. TetR-Bindung – erreicht werden konnte, jedoch zeigten sich bei Mehrfachinjektionen einer Lösung zum Teil sehr hohe Varianzen in den bestimmten  $\Delta$  RU-Werten (siehe Abbildung 6-13).



**Abbildung 6-13** Kalibrierkurven identischer Standard-Lösungen mit unterschiedlichen Regenerationslösungen. Bei jeder Kalibrierkurve sind die Einzelwerte einer Doppelbestimmung gezeigt.

Bei der Kalibrierkurve, die mit SDS als Regenerationsreagenz aufgenommen wurde, liegen die beiden Einzelwerte dicht beieinander.

Als Ergebnis der durchgeführten Versuche kamen zu Regeneration für den Tetracyclin-Assay also entweder die von Andersson et al. vorgeschlagene ionische Lösung, SDS oder Mischungen mit mindestens einer dieser beiden Komponenten in Frage. SDS zeigte eine nachteilige Einlagerung in die Chipmatrix, so dass nach der Regeneration einige Zeit benötigt wurde, um eine vollständige Entfernung des SDS zu erreichen. Die ionische Lösung hingegen verursachte eine schlechte Reproduzierbarkeit bei Mehrfachinjektionen und damit verbunden eine hohe Ungenauigkeit bei quantitativen Messungen. Beide Regenerationsreagenzien zeigten Nachteile, jedoch war die etwas verlängerte Analysenzeit mit der SDS-Lösung weniger problematisch als die schlechte Reproduzierbarkeit mit der ionischen Lösung. Deshalb wurde im Weiteren mit SDS unter Reduktion der Kontaktzeit der Lösung mit der Chipoberfläche regeneriert. Dazu wurde eine 0,3 %ige SDS-Lösung mit einem Fluss von 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  für 15 Sekunden injiziert. Unter diesen Bedingungen konnte eine vollständige Regeneration der Chipoberfläche nach Injektion von Rohmilch- und Honigproben erreicht werden. Um das Auswaschen von SDS aus der Chipmatrix zu beschleunigen, wurde nach der SDS-Injektion eine Injektion von Probenpuffer für 1 Minute mit einem Fluss von 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  durchgeführt (entspricht dem Bereich „Probenpuffer“ in Abbildung 6-10, Seite 76), so dass zu Beginn eines neuen Zyklus das SDS aus der Chipmatrix vollständig entfernt war.

## 6.8 Belegung mit *tet*-Operator

Das Prinzip des Tetracyclin-Assays beruht auf die Ablösung des TetR von der Operator-DNA bei Anwesenheit von Tetracyclin. Da *tetO* auf dem Chip quasi die Basis für die Reaktion  $tetO + TetR \rightarrow [tetO*TetR]$  und damit auch für die nachfolgende Reaktion  $[TC-Mg]^{+} + [tetO*TetR] \rightarrow [tetO] + [TC-Mg*TetR]$  bildet, sollte der Einfluss des Tetracyclin-Operators auf die Leistungsfähigkeit des Assays betrachtet werden.

### 6.8.1 Belegungsdichte

Zunächst wurde der Einfluss der Belegungsdichte der Operator-DNA auf der Chipoberfläche geprüft. Diese legt die Anzahl der Bindungsstellen für TetR fest, und sollte daher mit dessen Anbindung korreliert sein. Die Belegungsdichte eines Sensorchips lässt sich über den Immobilisierungslevel aus dem Sensorgramm (= Messsignal nach Ende der *tetO*-Injektion abzüglich des Messsignals vor der *tetO*-Injektion) abschätzen.

Der Einfluss der Belegungsdichte auf das Testsystem wurde sowohl am Biacore 3000<sup>®</sup> als auch am Biacore Q<sup>®</sup> untersucht. Es wurden Belegungen im Bereich von 72 bis 2197 RU pro Flusszelle verwendet. Die verschiedenen Immobilisierungslevel wurden durch Variation der *tetO*-Injektionsdauer erreicht, wohingegen die Konzentration der Lösung (20 nmol/L) und die Flussrate (4 µl/min) konstant gehalten wurden. Die höchste *tetO*-Belegung in Abbildung 6-14 wurde durch Injektion der Operator-Lösung für 63 Minuten erhalten. Die Chipoberfläche war nach dieser Injektion gesättigt. Im Sensorgramm konnte kein weiterer Signalanstieg (= Bindung von *tetO* an die Chipoberfläche) während der *tetO*-Injektion beobachtet werden. Die Experimente in beiden Geräten zeigen die gleichen Abhängigkeiten, so dass im Folgenden die Resultate anhand der Messreihen am Biacore<sup>®</sup> Q dargestellt werden sollen, da die beobachteten Effekte in diesen Experimenten aufgrund höherer *tetO*-Belegungen deutlicher zutage traten.

### **Bindung von TetR**

Abbildung 6-14 zeigt 4 Sensorgramme, die auf 4 Flusszellen des selben Chips mit unterschiedlicher Belegungsdichte von *tetO* aufgenommen wurden. Man erkennt eine deutliche Abhängigkeit der Bindung des TetR. Je höher der Immobilisierungslevel mit *tetO* war, desto mehr TetR konnte auf der Chipoberfläche gebunden werden. Dabei wurden durchschnittlich 80 % des immobilisierten Operators mit Repressor belegt (siehe Tabelle 6-9). Dieser Zusammenhang war bis zu einem Immobilisierungslevel von 1059 RU linear. Erst bei Sättigung der Chipoberfläche mit Operator (Belegung von 2197 RU *tetO*) wurde weniger *tetO* mit TetR belegt (55 %).

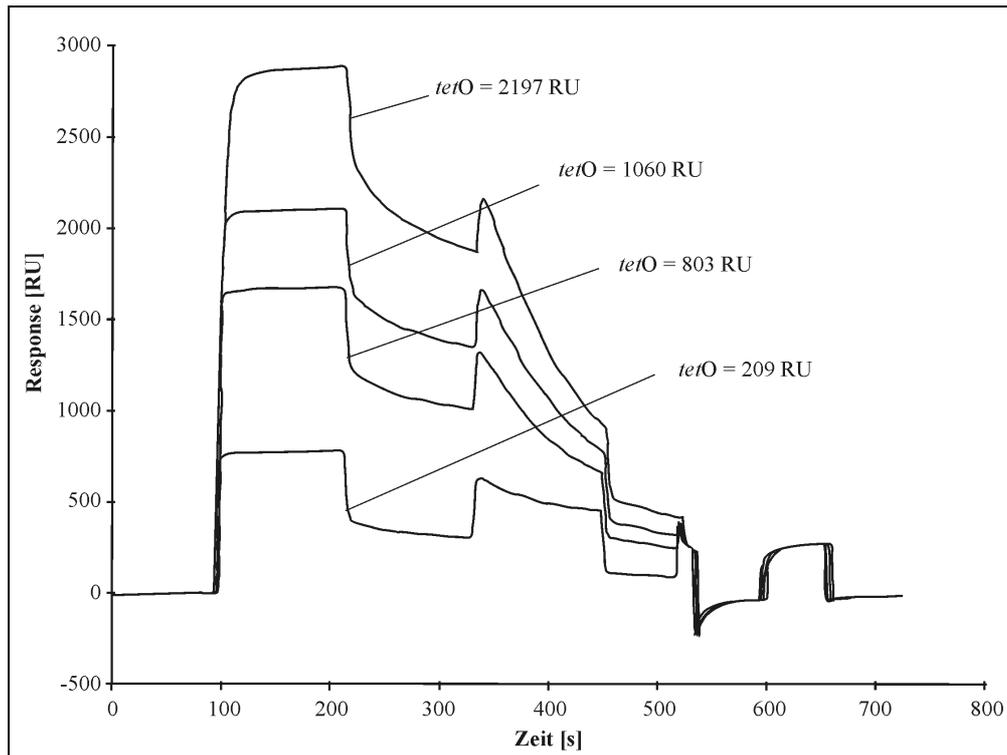


Abbildung 6-14 Zunehmende TetR-Belegung mit steigender *tetO*-Beladung. Für jedes Sensorgramm wurden 1  $\mu\text{mol/L}$  TetR(BD) und nachfolgend 20  $\mu\text{g/l}$  Tetracyclin in Probenpuffer injiziert. (*tetO* = „1x Biotin“ – Aufbau siehe Tabelle 6-12, Seite 88; gemessen im Biacore Q<sup>®</sup>.)

<i>tetO</i>		TetR		Mit TetR belegter <i>tetO</i> [%]
[RU]	[fmol/cm <sup>2</sup> ]	[RU]	[fmol/cm <sup>2</sup> ]	
209	7,1	226	5,5	78
803	27,0	992	21,3	79
1060	35,7	1348	28,9	81
2197	73,9	1880	40,3	55

Tabelle 6-9 Bindung von Repressor an Operator bei unterschiedlichem Immobilisierungslevel. Zur Berechnung der Masse auf dem Sensorchip wurde die Beziehung 1000 RU = 1 ng/mm<sup>2</sup> [180] herangezogen.

### Ablösung von TetR durch Tetracyclin

Die Menge an TetR, die mit 20  $\mu\text{g/L}$  Tetracyclin vom Chip gespült werden konnte ( $\Delta$  RU), stieg mit höherer Belegungsichte an *tetO* (Abbildung 6-14, Tabelle 6-10). In allen Fällen war der Chip jedoch nicht vollständig von TetR befreit. Es befand sich nach der Tetracyclin-Injektion immer noch TetR auf der Oberfläche. Die gleiche Menge Tetracyclin, die bei höchster *tetO*-Belegung in der Lage war, 1407 RU TetR abzulösen, war bei der geringsten *tetO*-Belegung nur in der Lage, 198 RU TetR abzulösen.

<i>tetO</i> -Belegung [RU]	209	803	1060	2197
$\Delta$ RU bei 20 $\mu\text{g/L}$ TC [RU]	-198	-732	-971	-1407
IB <sub>50</sub> -Konzentration [ $\mu\text{g/L}$ ]	11,1	10,3	10,6	10,7

**Tabelle 6-10  $\Delta$  RU bei 20  $\mu\text{g/L}$  Tetracyclin in Abhängigkeit von der *tetO*-Belegung und die benötigte Tetracyclin-Konzentration für eine 50 %ige Ablösung von TetR (IB<sub>50</sub>)**

Die Tatsache, dass mit steigender *tetO*-Belegung mehr TetR durch Injektion der gleichen Tetracyclin-Menge vom Chip gespült werden konnte, muss jedoch nicht zwangsläufig Einfluss auf die Sensitivität des Assays haben. Um diese zu beurteilen, wurde die Tetracyclin-Konzentration herangezogen, mit der 50 % des maximal abgelösten TetR abgelöst werden konnten. Sie wird in dieser Arbeit in Anlehnung an typische kompetitive Assays mit IB<sub>50</sub> bezeichnet (IC<sub>50</sub> = Konzentration bei 50 %iger Hemmung in kompetitiven Assays). Verschiebt sich die IB<sub>50</sub>-Konzentration hin zu kleineren Tetracyclin-Konzentrationen, wird eine Zunahme der Messempfindlichkeit erreicht.

Bei Berechnung der IB<sub>50</sub>-Konzentrationen von Kalibrierkurven mit unterschiedlicher *tetO*-Immobilisierung ergaben sich für alle Kurven ähnliche Werte (siehe Tabelle 6-10). Sie schwankten zwischen 10,3  $\mu\text{g/L}$  und 11,1  $\mu\text{g/L}$  Tetracyclin in Puffer, ohne dass sich ein Zusammenhang mit der Belegungsdichte herstellen ließ.

### 6.8.2 Belegung mit unterschiedlichen Flussraten und Nachbelegung eines bereits genutzten Chips

Die *tetO*-Belegung mit unterschiedlichen Flussraten bzw. die *tetO*-Belegung in Abhängigkeit der Vorgeschichte einer Flusszelle wurden untersucht (Tabelle 6-11). Dazu wurde ein Chip genutzt, in dessen Flusszellen 2 und 3 im August 05 mit unterschiedlichen Flussraten Operator immobilisiert wurde. Die Auswirkung der Immobilisierung mit unterschiedlichen Flussraten auf die TetR-Bindung wurde über mehrere Messreihen sowohl mit Standard-Lösungen als auch mit Milch- und Honigproben untersucht. Dabei wurde die unbelegte Flusszelle 1 als Referenz verwendet. Flusszelle 4 wurde nicht genutzt. In den folgenden 4 Monaten wurde der Chip bei 4 °C trocken gelagert. Im Dezember wurden versucht, *tetO* in den Flusszellen 1 und 4 zu immobilisieren.

Für die Immobilisierung aller Flusszellen wurde dieselbe Lösung des *tetO* „2x Biotin“ (Aufbau siehe Tabelle 6-12, Seite 87) verwendet. Um eine gute Vergleichbarkeit der

Messungen auf den unterschiedlichen Flusszellen zu erreichen, sollte bei allen Immobilisierungen ein Level von rund 350 RU erreicht werden. Während der Injektion der *tetO*-Lösung wurde das Messsignal beobachtet, so dass die Injektion bei Erreichen des gewünschten Immobilisierungslevels abgebrochen werden konnte. Tabelle 6-11 fasst die Ergebnisse dieser Versuche zusammen.

	Flusszelle 1	Flusszelle 2	Flusszelle 3	Flusszelle 4
Datum der Immobilisierung mit <i>tetO</i>	Dez. 05	Aug. 05	Aug. 05	Dez. 05
Kontaktzeit [min]	31	14	12	100
Fluss [ml/min]	4	4	10	4
Immobilisierungslevel mit <i>tetO</i> [RU]	-10	336	356	155

**Tabelle 6-11 Vergleich der *tetO*-Bindung in unterschiedlichen Flusszellen eines Sensorchips: Fc 1: Immobilisierung nach mehreren Messreihen und Lagerung, Fc 2 und Fc 3: Immobilisierung von frischen Flusszellen mit unterschiedlicher Flussrate, Fc 4: Immobilisierung nach Lagerung (4 Monate). Die Untersuchungen wurden am Biacore 3000® durchgeführt, immobilisiert wurde jeweils „2x Biotin“.**

Die Immobilisierung von *tetO* in den beiden Flusszellen 2 und 3 zeigte, dass trotz unterschiedlicher Flussraten (Fc 2 = 4 µl/min, Fc 3 = 10 µl/min) eine vergleichbare Injektionszeit nötig war, um den gleichen Immobilisierungslevel zu erreichen. Flusszelle 3 zeigt nur eine geringe Zeitersparnis, bei gleichzeitig verdoppeltem Verbrauch an *tetO*-Lösung (Verbrauch für Fc 2 = 56 µl, für Fc 3 = 120 µl). In den folgenden Messreihen zeigten die beiden Flusszellen bezüglich TetR-Bindung, Basislinie und Tetracyclin induzierter TetR-Ablösung keinen Unterschied. Die unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten für die Immobilisierung spiegelten sich also ausschließlich im erhöhten Verbrauch an *tetO*-Lösung wieder, so dass eine Flussrate von 10 µl/min für eine Immobilisierung wenig sinnvoll war.

In der zuvor als Referenz genutzten Flusszelle (Fc 1) konnte im Dezember 05 keine Anbindung von *tetO* festgestellt werden. Selbst nach einer *tetO*-Injektion von 31 Minuten konnte kein Signalanstieg im Sensorgramm beobachtet werden. Die Ursache hierfür könnte einer Beeinträchtigung des Streptavidins auf der Sensorchip-Oberfläche durch die vorangegangene Benutzung und Lagerung sein. Evtl. wurde dies so stark verändert, dass eine Anbindung des biotinylierten Operators nicht mehr möglich war.

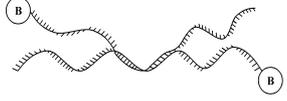
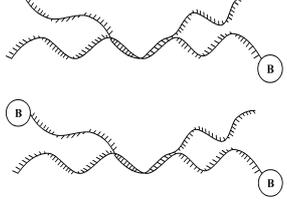
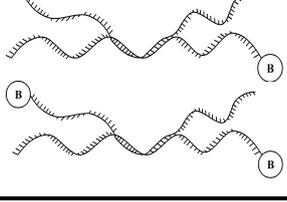
In der zuvor ungenutzt gebliebenen Flusszelle 4 konnte eine im Vergleich zu Flusszelle 2 und 3 stark verminderte *tetO*-Bindung beobachtet werden. Selbst nach einer Kontaktzeit mit der *tetO*-Lösung von 100 Minuten konnte nur ein Immobilisierungslevel von 155 RU erreicht werden. Die Bindungsstellen für den Operator in der Flusszelle waren jedoch noch nicht gesättigt, da auch nach Ablauf der 100 Minuten noch ein ansteigendes Messsignal beobachtet werden konnte. Die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen *tetO* und TetR war durch die Lagerung jedoch stark beeinträchtigt.

### 6.8.3 *tetO*-Varianten

Die TetR-Bindung und die tetracyclininduzierte TetR-Ablösung von vier unterschiedlichen *tetO*-Varianten wurden geprüft. Zur Herstellung der *tetO*-Varianten wurden 3 verschiedene Oligonukleotide genutzt, die die bei Kamionka [73] beschriebenen Sequenzen aufwiesen. In Tabelle 6-12 sind die zur Herstellung der *tetO*-Varianten genutzten Oligonukleotide und deren Mischungsverhältnisse angegeben. Oligo a stellte ein 48 Basen langes Fragment dar, welches in der Mitte die palindrome Sequenz des *tetO*1 hat und am 5'-Ende biotinyliert ist (Sequenz siehe Abschnitt 10.5, Seite 168). Oligo b ist aufgebaut wie Oligo a, jedoch ohne Biotin, und Oligo c weist eine zu Oligo a und b komplementäre Basenabfolge auf. Diese DNA-Einzelstränge wurden vor dem Annealing (= Zusammenlagerung zweier Einzelstränge zu einem Doppelstrang) in unterschiedlichen molaren Verhältnissen miteinander gemischt, um die 4 gewünschten *tetO*-Varianten zu erhalten.

Für die Variante „komplementär“ wurden Oligo a und Oligo c zu gleichen Anteilen miteinander gemischt. Es ergab sich die *tetO*-Variante, die über die komplette Sequenz einen Doppelstrang bildet und damit dem natürlich vorkommenden *tet*-Operator entspricht. Für „2x Biotin“ wurde Oligo a mit sich selbst annealt, so dass sich ein Operator ergab, der nur über die palindrome Sequenz einen Doppelstrang bildete und an jeder Seite jeweils ein Biotin aufwies. Für die Variante „1x Biotin“ wurde Oligo a mit dem 10-fachen Überschuss an Oligo b gemischt. In diesem Ansatz bilden sich 3 unterschiedliche DNA-Doppelstränge, wobei jede dieser Varianten ebenfalls nur über die 18 palindromen Basenpaare annealt ist. Eine einfach biotinylierte und eine doppelt biotinylierte Variante im statistischen Verhältnis von 20 : 1 bilden die an den Sensorchip bindenden *tetO*-Moleküle. Die dritte im Überschuss vorliegende nicht biotinylierte Variante wurde in die Tabelle 6-12 nicht aufgenommen, da sie nicht in der Lage ist, an der Streptavidin-Oberfläche des Sensorchips zu binden. Sie wurde aber bei der Berechnung des mittleren Molekulargewichtes des jeweiligen *tetO* berück-

sichtigt, damit später vergleichbare Konzentrationen an bindungsfähigem *tetO* auf den Chip injiziert werden konnten. Die vierte *tetO*-Variante – „mixed“ – wurde aus einer Mischung von Oligo a und Oligo b zu gleichen Teilen hergestellt. Hier ergaben sich der einfach biotinylierte und der doppelt biotinylierte Operator in einem statistischen Verhältnis von 2 : 1. Auch in diesem Fall wurde die nicht biotinylierte Variante nicht aufgeführt.

Name	erstes Oligonukleotid	zweites Oligonukleotid	<i>tetO</i> Variante	Verhältnis
komplementär	Oligo a 	Oligo c 		
„2x Biotin“	Oligo a 	Oligo a 		
„1x Biotin“	Oligo a 	Oligo b 		20 : 1
„mixed“	Oligo a 	Oligo b 		2 : 1

**Tabelle 6-12** Darstellung der verschiedenen *tetO*-Varianten. Jeweils auf der rechten Seite sind die statistisch berechneten Verhältnisse der beim Annealing entstehenden Varianten angegeben. Die Oligonukleotide wurden jeweils am 5'-Ende biotinyliert. Die DNA-Doppelstränge ohne Biotin wurden lediglich bei der Berechnung der statistischen Verhältnisse und des mittleren Molekulargewichtes berücksichtigt, darüber hinaus jedoch nicht weiter beachtet, da sie nicht an die Chipoberfläche binden können.

Der *tet*-Operator enthält eine palindrome Sequenz, mit einem nicht palindromen Basenpaar in der Mitte. Die DNA windet sich innerhalb dieser palindromen Sequenz einmal, so dass den beiden Monomeren von TetR die gleichen Basen als Bindungspartner zur Verfügung stehen. Sänger et al. [57] beschreibt die Basen 2 bis 5, von der nicht palindromen Base aus gezählt, als die für die Bindung zu TetR unabdingbaren Basen. Diese sind bei allen hier getesteten *tetO*-Varianten als gepaarte Basen vorhanden. Die Operatoren unterscheiden sich lediglich in der Zahl der Basen, über die annealt wurde, und über die Anzahl der Biotin-Moleküle, über die sie an die Chipoberfläche binden können. Es sollte also nicht zu Unterschieden durch verschiedene Bindungsaffinitäten aufgrund des identischen Aufbaus der Bindungsregion des

*tetO* kommen. Unterschiede zwischen den einzelnen *tetO*-Varianten waren jedoch z.B. durch sterische Hinderungen der losen Enden der Varianten „1x Biotin“, „2x Biotin“ oder „mixed“ möglich.

Um einen Unterschied der einzelnen *tetO*-Varianten zu erkennen, wurden zwei Parameter betrachtet. Zunächst gibt die TetR-Bindung Aufschluss darüber, ob und in wie weit die betreffende *tetO*-Variante eine Bindung zum Repressor erlaubt. Der  $IB_{50}$ -Wert aufgenommener Kalibrierkurven gibt auch hier wieder Auskunft darüber, ob die *tetO*-Variante einen Einfluss auf die Leistungsfähigkeit des Testsystems hat, was bei Betrachtung der reinen TetR-Bindung nicht zu erkennen ist.

### **Repressor-Bindung**

In Abbildung 6-15 werden die molaren Massen von an die Chipoberfläche immobilisiertem *tetO* und dem daran gebundenen TetR gegenübergestellt. Jede TetR-Bindung wurde durch Injektion einer TetR-Lösung von 1  $\mu\text{mol/L}$  für 120 Sekunden erreicht. Betrachtet werden Messungen mit insgesamt 19 Sensorchips, die in beiden SPR-Spektrometern vermessen wurden. Die unterschiedlichen *tetO*-Varianten wurden mit unterschiedlichen Symbolen dargestellt.

Die Messpunkte der *tetO*-Variante „1x Biotin“ verteilten sich sowohl oberhalb als auch unterhalb der eingezeichneten Regressionsgeraden. Hingegen lagen die Messpunkte der Variante „2x Biotin“ mehrheitlich auf und unterhalb der Geraden. Sie zeigten also eine Verschiebung des molaren Verhältnisses hin zu einer geringeren TetR-Bindung.

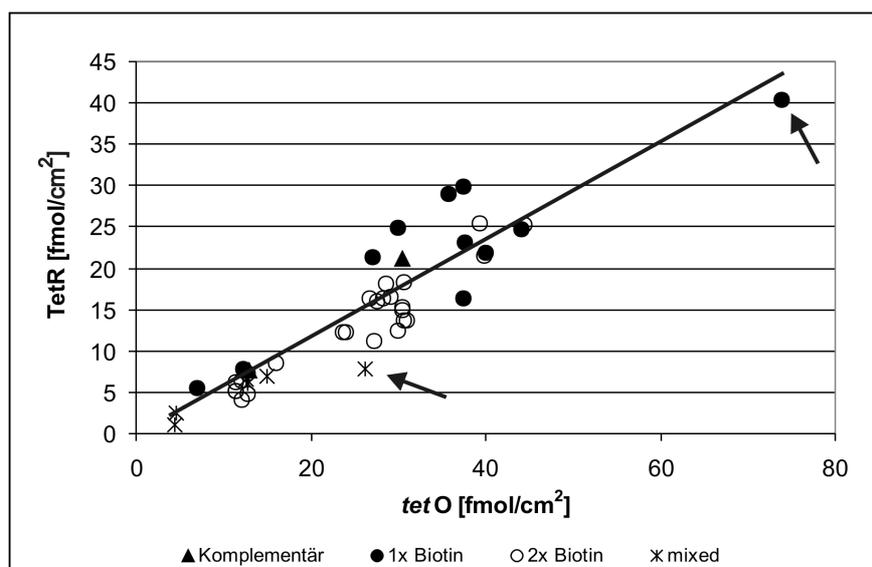


Abbildung 6-15 Molare Verhältnisse der Bindung von TetR an den Operator. Es sind Messungen aller mit *tetO* belegten Flusszellen der insgesamt 19 verwendeten Chips dargestellt, die sowohl mit dem Biacore 3000<sup>®</sup> als auch mit dem Biacore Q<sup>®</sup> vermessen wurden. Die schwarze Linie stellt die Regressionsgerade über alle Messpunkte dar. Die beiden Pfeile markieren die zwei Flusszellen, bei denen eine Sättigung der Chipoberfläche mit *tetO* erreicht wurde.

Die unterschiedlichen Bindungsverhältnisse werden deutlicher, wenn man die prozentuale Belegung der *tetO*-Varianten mit TetR betrachtet, wie sie in Tabelle 6-13 angegeben ist.

	„2x Biotin“ (1341 RU)	„1x Biotin“ (1123 RU)	„komplementär“ (911 RU)	„mixed“ (373)
<i>tetO</i> [fmol/cm <sup>2</sup> ]	45	38	30	13
TetR [fmol/cm <sup>2</sup> ]	25	30	21	7
Belegung <i>tetO</i> [%]	57	79	70	52

Tabelle 6-13 Prozentuale Belegung der unterschiedlichen *tetO*-Varianten mit TetR.

Die Variante „2x Biotin“ wies eine geringere TetR-Bindung als die Varianten „1x Biotin“ und „komplementär“ auf, deren Bindungsverhältnisse untereinander nur wenig unterschiedlich waren. Die geringere TetR-Bindung von „2x Biotin“ konnte demnach nicht auf die Anzahl angelegter Basen zurückgeführt werden. Möglicherweise wurde das *tetO*-Molekül durch die Bindung über 2 Biotine so stark unter Spannung gesetzt, dass sich die Windung der DNA veränderte. Entfernen sich die *tetO*-bindenden  $\alpha$ -Helices der beiden Untereinheiten von TetR um 3 Å voneinander, löst TetR von *tetO* ab. [57]. Es ist daher denkbar, dass auch ein geringes „Verbiegen“ der DNA zu einer Verringerung, wenn nicht gar zum Verlust der Bindungsaffinität zum Repressor führt. Auch wäre denkbar, dass der doppelt biotinylierte

Operator mit nur einem Biotin an die Chipoberfläche gebunden hat und das zweite Biotin die Anbindung von TetR behinderte.

Die Variante „mixed“ zeigte die schlechteste TetR-Bindung von allen. Die Ursache hierfür könnte das Alter der für die Immobilisierung verwendeten *tetO*-Lösung sein. Zwischen Annealing und Immobilisierung dieser Variante lagerte die Lösung bereits 6 Monate bei – 20 °C und wurde zur Immobilisierung weiterer Chip wiederholt aufgetaut. Eine Veränderung der TetR-Bindungsstelle am Operator durch mögliche Abbauprozesse würden zu einer verringerten Bindung führen. Da bei der Immobilisierung nur die absolut auf die Chipoberfläche aufgebrachte Masse detektiert wird, konnte mit einer alten *tetO*-Lösung ein vergleichbarer Immobilisierungslevel erreicht werden. Die TetR-Bindung hingegen nahm aufgrund defekter oder veränderter DNA jedoch ab. Alle anderen *tetO*-Lösungen wurden wenige Wochen nach dem Annealing verwendet, so dass hier Abbaureaktionen als unwahrscheinlich anzunehmen sind.

### Einfluss auf die Sensitivität des Assays

Anhand von Kalibrierkurven mit Standard-Lösungen von Tetracyclin konnte der Einfluss der *tetO*-Varianten auf das Testsystem weiter charakterisiert werden. Hier konnten Einflüsse der unterschiedlichen *tetO*-Varianten auf die Sensitivität des Assays erkannt werden.

Tabelle 6-14 zeigt die IB<sub>50</sub>-Werte von Kalibrierkurven in Probenpuffer für die unterschiedlichen *tetO*-Varianten gemessen im Biacore 3000®.

	IB <sub>50</sub> -Werte
„2x Biotin“	7,4 µg/L
„1x Biotin“	7,3 µg/L
„komplementär“	8,4 µg/L
„mixed“	8,7 µg/L

**Tabelle 6-14** IB<sub>50</sub>-Werte von aufgenommenen Kalibrierkurven in Probenpuffer. Die Kalibrierkurven umfassten jeweils den Bereich von 0 bis 200 µg/L Tetracyclin und wurde durch 3-fach Injektionen der einzelnen Lösungen bestimmt. Die Bestimmung der IB<sub>50</sub>-Werte erfolgte im Biacore 3000®.

Alle *tetO*-Varianten zeigten einen sehr ähnlichen IB<sub>50</sub>-Wert, so dass keine Beeinflussung der Sensitivität durch den verwendeten Operator festgestellt werden konnte.

Die Variante „1x Biotin“ zeigte von allen die höchste TetR-Bindung. Aus diesem Grund wurde die weitere Testentwicklung mit diesem Operator durchgeführt. Abbildung 6-16 zeigt beispielhaft eine Kalibrierkurve mit Standard-Lösungen von Tetracyclin bei Verwendung der Operator-Variante „1x Biotin“. Der bestimmte  $IB_{50}$ -Wert wurde ebenfalls eingezeichnet.

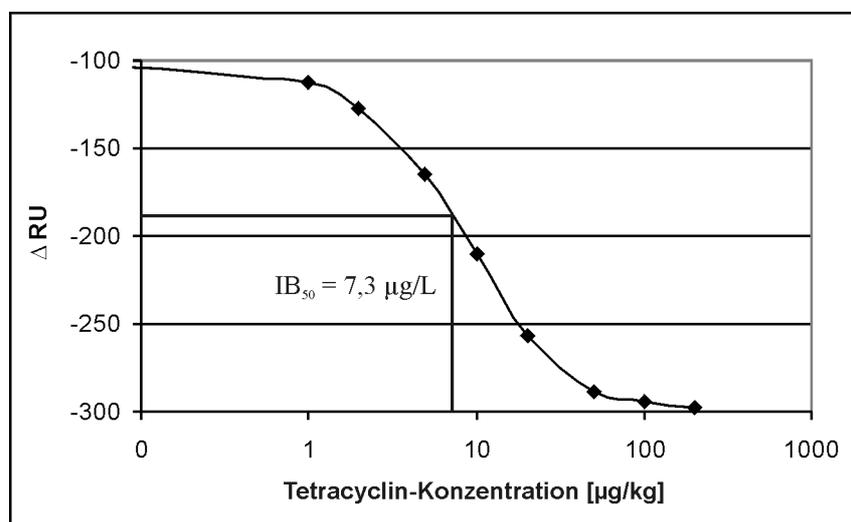


Abbildung 6-16 Kalibrierkurve mit Standard-Lösungen von Tetracyclin aufgenommen mit der *tetO*-Variante „1x Biotin“. Die Messung erfolgte mit einem Immobilisierungslevel von 362 RU im Biacore 3000®.

#### 6.8.4 Reproduzierbarkeit der Belegung

Tabelle 6-15 gibt eine Aufstellung von 6 Chips der gleichen Charge wieder, die alle mit derselben *tetO*-Lösung in gleicher Vorgehensweise belegt wurden. Dazu wurde eine *tetO*-Lösung auf eine Konzentration von 20 nmol/L verdünnt und jeweils für 10 Minuten mit einem Fluss von 4 µl/min injiziert. Die Immobilisierungen erfolgten über einen Zeitraum von 11 Wochen. Während dieser Zeit wurde die *tetO*-Stammlösung bei -20 °C gelagert.

	Belegung mit <i>tetO</i> („1x Biotin“) [RU]					
	Chip A	Chip B	Chip C	Chip D	Chip E	Chip F
Flusszelle 1	1312	1189	1122	n.b.	1427	1045
Flusszelle 2	1190	1120	n.b.	1123	1120	n.b.
Flusszelle 3	1170	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Flusszelle 4	1220	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Tabelle 6-15 Reproduzierbarkeit der Chipbelegung. Alle 6 Chips wurden mit der selben *tetO*-Lösung im Biacore Q® immobilisiert. Angegeben ist jeweils der Immobilisierungslevel nach einem abschließenden Waschschrift mit SDS und Probenpuffer. n.b. = Flusszelle wurde nicht, mit anderer Injektionsdauer oder nicht mit *tetO* („1x Biotin“) belegt.

Die Immobilisierungslevel aller Chips lagen zwischen 1045 und 1427 RU. Die Abweichungen der Immobilisierungslevel zwischen verschiedenen Chips der selben Charge waren gering. Sie entsprechen einer prozentualen Standardabweichung von 9 %. Die Chipbelegung mit der Operator-DNA zeigte eine gute Reproduzierbarkeit. Es war somit möglich, mit einer Standardprozedur immer wieder zum gleichen Immobilisierungslevel zu gelangen.

Die *tetO*-Stammlösung wurde innerhalb der 11 Wochen auch durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren (um einen weiteren Chip zu belegen) nicht negativ beeinflusst. Sie war über diesen Zeitraum bei  $-20\text{ °C}$  lagerstabil.

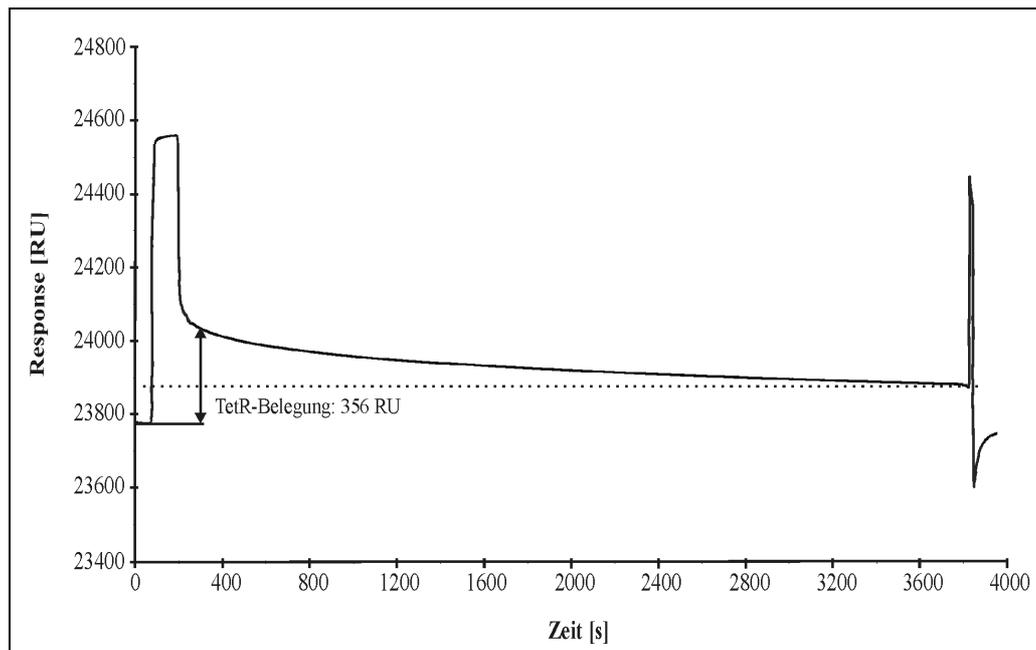
## 6.9 Anbindung des Tet-Repressors

Dem Tetracyclin-Repressor kommt in dem entwickelten Assay eine Schlüsselrolle zu, da er der Bindungspartner für den nachzuweisenden Analyten ist. Die Bindungsaffinität und die Bindungskinetik des Repressors zum Tetracyclin sind von entscheidender Bedeutung für die Reaktion  $[\text{TC-Mg}]^+ + [\text{tetO}^*\text{TetR}] \rightarrow [\text{tetO}] + [\text{TC-Mg}^*\text{TetR}]$ , die hier für den Nachweis von Tetracyclin ausgenutzt wird.

### 6.9.1 Dissoziation des Operator-Repressor- Komplexes

Die Dissoziation des  $[\text{tetO}^*\text{TetR}]$ -Komplexes an der Chipoberfläche lässt sich als langsamer Signalabfall unmittelbar nach Injektion der TetR-Lösung beobachten. Dabei ist der Abfall mit steigendem *tetO*-Immobilisierungslevel stärker ausgeprägt (siehe Abbildung 6-14, Seite 84). Abbildung 6-17 gibt den zeitlichen Verlauf der Dissoziation über eine Stunde wieder.

Über die gesamte Zeit konnte ein asymptotischer Abfall des Messsignals beobachtet werden. Innerhalb von 1 Stunde fiel es bei einer anfänglichen Belegung von 356 RU um ca. 170 RU ab. Auch innerhalb eines Zyklus zeigte der Operator-Repressor-Komplex eine permanente Dissoziation. Dies war die Ursache für den beobachteten negativen  $\Delta$  RU bei Lösungen ohne Tetracyclin.



**Abbildung 6-17** Dissoziation des  $[tetO^*TetR]$ -Komplexes an der Chipoberfläche. Es wurde  $1 \mu\text{mol/L}$  TetR für 120 Sekunden injiziert. Anschließend folgt eine Haltephase von 60 Minuten, bei der die Dissoziation zu beobachten ist. Abschließend wurde mit 0,5 % SDS regeneriert. Die gestrichelte Linie gibt das Niveau an, auf das der TetR-level nach 60 Minuten gefallen ist. Der Pfeil zeigt die TetR-Belegung zum Zeitpunkt  $t_2$  an. Die Messung erfolgte im Biacore 3000<sup>®</sup> mit einer *tetO*-Belegung von 356 RU „2x Biotin“.

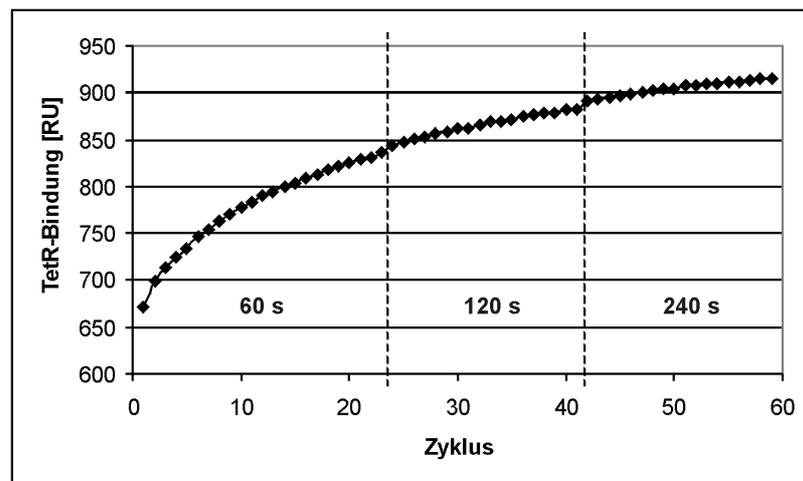
Da der Messpunkt für die Bestimmung des  $\Delta$  RU-Wertes ( $t_2$  in Abbildung 6-10, Seite 76) immer zum gleichen Zeitpunkt nach der Proben-Injektion gesetzt wurde und diese immer im gleichen Abstand zur TetR-Injektion erfolgte, konnten die  $\Delta$  RU-Werte einer mehrfach injizierten tetracyclinhaltigen Lösung reproduziert werden. Die Quantifizierung von Tetracyclin wurde durch die Dissoziation von TetR vom Operator nicht beeinflusst.

## 6.9.2 Änderung der Kontaktzeit der TetR-Lösung mit der *tetO*-Oberfläche

Die Verlängerung der Injektionsdauer ist insbesondere bei einer langsamen Bindungskinetik zwischen Rezeptor und Bindungspartner von Vorteil, da man dadurch den Bindungspartnern mehr Kontaktzeit verschafft. Auf diese Weise könnte eine erhöhte TetR-Bindung an den immobilisierten Operator erreicht werden.

Um den Einfluss der Kontaktzeit auf die Anbindung von TetR zu untersuchen, wurden Injektionszeiten von 60, 120 und 240 Sekunden verglichen. Es wurde für jede Injektionszeit eine Kalibrierkurve aufgenommen, um etwaige Einflüsse auf die Sensitivität des Assays (Betrachtung von  $IB_{50}$ ) feststellen zu können. Die Messreihen wurden in der Matrix Honig im Biacore Q<sup>®</sup> durchgeführt.

Die TetR-Anbindung stieg im Laufe der Messreihe unabhängig von der Injektionsdauer der TetR-Lösung stetig an (Abbildung 6-18; siehe hierzu auch Abschnitt 6.9.4 Seite 98 und Diskussion unter Abschnitt 7.3.5 Seite 134). Zu Beginn der Messreihe konnte eine TetR-Bindung von 671 RU, zum Ende der Messreihe von 915 RU beobachtet werden. Aus diesem Grund konnte die Änderung der TetR-Bindung, die durch die Verlängerung der Injektionszeit zustande kam, nur als Differenz zwischen dem letzten Zyklus mit der kürzeren und dem ersten Zyklus mit der längeren Injektionszeit angegeben werden.



**Abbildung 6-18** TetR-Bindung der Messreihe mit unterschiedlichen Kontaktzeiten der TetR-Lösung. Die Zyklen mit unterschiedlichen Kontaktzeiten sind jeweils durch eine gestrichelte Linie getrennt.

	TetR-Bindung [RU]	Differenz [RU]
60 Sekunden	671 – 836	9
120 Sekunden	845 – 882	9
240 Sekunden	891 – 915	

**Tabelle 6-16** Änderung der TetR-Bindung bei unterschiedlichen Kontaktzeiten. Die Differenz wurde jeweils aus dem letzten Zyklus mit kürzerer Injektionszeit und dem ersten Zyklus mit längerer Injektionszeit gebildet.

Es zeigte sich, dass eine Verdopplung der TetR-Injektionszeit von 60 auf 120 Sekunden und von 120 auf 240 Sekunden nur eine Erhöhung der Anbindung um jeweils 9 RU bewirkte. Die Tatsache, dass eine Vervielfachung der Injektionszeit keine wesentlich höhere TetR-Bindung zeitigt, lässt auf eine schnelle Bindungskinetik zwischen TetR und *tetO* schließen. Kedracka-

Krok und Wasylewski [181] fanden – abhängig von der Salz-Konzentration des Mediums und von der Bindung an Operator O1 oder O2 – Geschwindigkeitskonstanten zwischen 2,3 und  $3,0 \cdot 10^6$  L/(mol\*s). Die Bildung des [tetO\*TetR]-Komplexes verlief offensichtlich auch unter den in-vivo-Bedingungen des entwickelten SPR-Assays so schnell, dass bereits nach weniger als 1 Minute der chipgebundene Operator mit TetR abgesättigt war.

Eine Beeinflussung der Sensitivität des Assay durch eine Veränderung der Kontaktzeit der Chipoberfläche mit der TetR-Lösung konnte nicht festgestellt werden.

### 6.9.3 Änderung der TetR-Konzentration

Der Einfluss verschiedener Konzentrationen der injizierten TetR-Lösung wurde mit der TetR-Variante TetR(BD) im Biacore 3000<sup>®</sup> getestet. Sie wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 10  $\mu\text{mol/L}$  eingesetzt. Für jede TetR-Konzentration wurde eine Kalibrierkurve mit Standard-Lösungen aufgenommen.

Tabelle 6-17 zeigt die Anbindung von TetR an den Operator in Abhängigkeit von der Konzentration der injizierten TetR-Lösung. Die Repressor-Bindung war bei höheren Konzentrationen größer. Verglichen mit dem Konzentrationsunterschied war der beobachtete Anstieg der TetR-Bindung jedoch auffallend gering. Eine Erhöhung der Konzentration um den Faktor 100 bewirkte nur eine um den Faktor 0,8 erhöhte Bindung des TetR.

TetR-Konzentration [ $\mu\text{mol/l}$ ]	TetR gebunden an <i>tetO</i> [ $\Delta$ RU]	TetR gebunden an unbelegte Flusszelle [ $\Delta$ RU]	TetR abgelöst durch Injektion von 10 $\mu\text{g/L}$ Tetracyclin [ $\Delta$ RU]
0,1	265	10	170
1	286	14	162
5	316	20	146
10	332	22	118

**Tabelle 6-17 Konzentrationen der injizierten TetR-Lösungen mit daraus resultierenden TetR-Bindungen an *tetO* bzw. an eine unbelegte Flusszelle und Ablösung von TetR durch Injektion von 10  $\mu\text{g/L}$  Tetracyclin in Probenpuffer. Injektionszeit TetR = 120 Sekunden; *tetO*: „2x Biotin“ mit einem Immobilisierungslevel von 340 RU.**

Wie bereits in Abschnitt 6.9.2 (Seite 94) festgestellt wurde, verläuft die Bildung des Komplexes [tetO\*TetR] sehr schnell, wobei die verfügbaren *tetO*-Bindungsstellen innerhalb von weniger als einer Minute abgesättigt wurden. Eine längere Injektion der TetR-Lösung

brachte keine weitere Anbindung von TetR. In Tabelle 6-17 ist ein deutlicher, wenn auch geringer Anstieg der TetR-Bindung mit steigender Konzentration der injizierten Lösung zu erkennen. Die unspezifische Bindung von TetR an die Chipoberfläche der Referenz-Flusszelle (ohne *tetO*-Belegung) nahm zwar mit steigender Konzentration der injizierten TetR-Lösung zu, blieb aber auf einem für den Tetracyclin-Assay vernachlässigbaren Niveau.

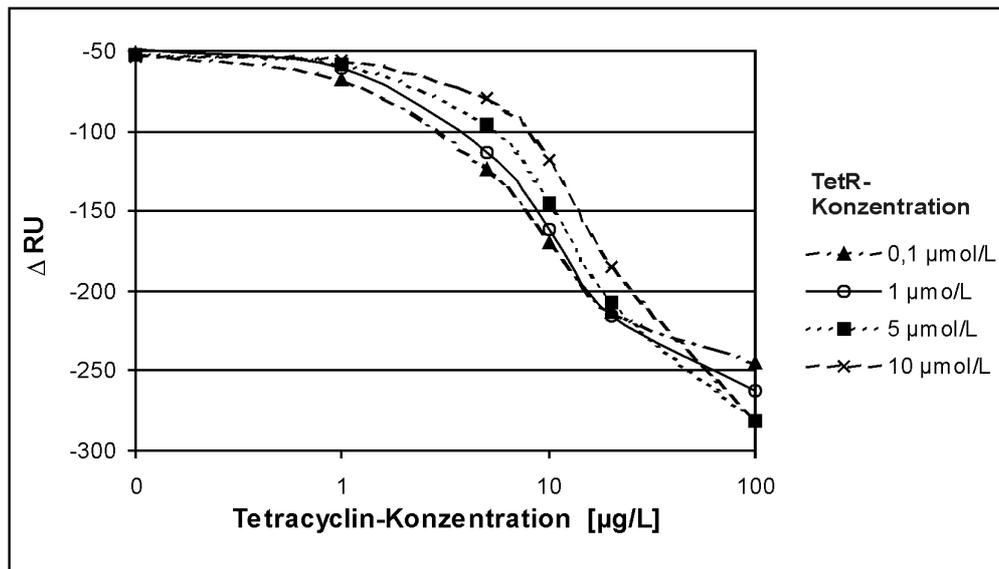


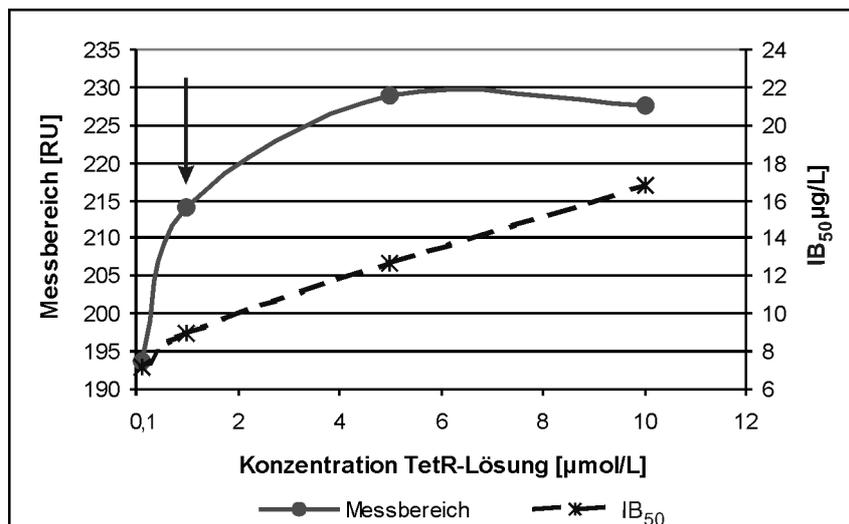
Abbildung 6-19 Kalibrierkurven in Probenpuffer, aufgenommen bei unterschiedlichen Konzentrationen der zur Beladung injizierten TetR-Lösung. Injektionszeit TetR = 120 Sekunden; *tetO*: „2x Biotin“ mit einem Immobilisierungslevel von 340 RU.

Abbildung 6-19 zeigt die Ablösung von TetR durch Injektion unterschiedlicher Tetracyclin-Konzentrationen. Die Ablösung durch Injektion reinen Puffers lässt keinen Unterschied zwischen den verschiedenen TetR-Lösungen erkennen. In der Mitte aufgenommener Kalibrierkurven (besonders bei 5 und 10 µg/L Tetracyclin) zeigt sich eine höhere TetR-Ablösung für geringer konzentrierte Lösungen (siehe auch Tabelle 6-17).

Bei höheren Tetracyclin-Konzentrationen unterschieden sich die Kurven zwar voneinander, jedoch war kein Trend der TetR-Ablösung mehr erkennbar. Dies kommt vermutlich dadurch zustande, dass es bei diesen Tetracyclin-Konzentrationen bereits zu einer fast vollständigen Ablösung von auf der Chipoberfläche gebundenem TetR kommt. Eine weitere Erhöhung der Tetracyclin-Konzentration über diesen Punkt hinaus könnte keine größere Signaldifferenz verursachen. Als Resultat dieser Untersuchungen kann festgestellt werden, dass der Assay mit niedriger konzentrierten TetR-Lösungen empfindlicher wurde.

Für die Beurteilung einer Kalibrierkurve ist neben dem  $IB_{50}$ -Wert als Maß für die Sensitivität auch der Messbereich (= Unterschied der  $\Delta$  RU-Werte bei maximaler und minimaler

Tetracyclin-Konzentration), in dem quantifiziert werden kann, interessant. Da dieser Assay sowohl für den Nachweis von Tetracyclinen in Rohmilch (MRL von 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) als auch in Honig (kein MRL, also niedrigst mögliche Nachweisgrenze) entwickelt werden sollte, ist ein hoher Messbereich von Vorteil. Abbildung 6-20 zeigt beide Kriterien für die unterschiedlichen TetR-Lösungen.



**Abbildung 6-20** Messbereich und IB<sub>50</sub>-Konzentrationen der Kalibrierkurven mit unterschiedlich konzentrierten TetR-Lösungen aufgenommen. Die beste Konzentration ist mit einem Pfeil markiert. Die Messreihe wurde mit einer *tetO*-Immobilisierung von 340 RU „2x Biotin“ am Biacore 3000<sup>®</sup> durchgeführt.

Bei niedrigen TetR-Konzentrationen der Injektionslösung wurden geringere IB<sub>50</sub>-Werte erhalten. Gleichzeitig resultierte ein geringerer Messbereich. Die Differenz der IB<sub>50</sub>-Werte zwischen einer TetR-Lösung mit 0,1 und 1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  war geringer als bei allen anderen Lösungen. Das heißt, hier war der Sensitivitätsgewinn durch Verwendung einer geringeren konzentrierten Lösung am geringsten. Im Gegensatz dazu war die Steigerung des Messbereiches durch den Wechsel von einer 0,1 auf eine 1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  TetR-Lösung am größten. Die Verwendung einer TetR-Lösung mit einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  wurde als der geeignetste Kompromiss zwischen Sensitivität und Messbereich des Assays angesehen. Daher wurde bei weiteren Analysen zur Beladung des Operators mit dieser TetR-Konzentration gearbeitet.

#### 6.9.4 Zunahme der Repressor-Bindung während einer Messreihe

Die TetR-Bindung über eine gestammte Messreihe betrachtet zeigte einen Anstieg. Mit jedem neuen Zyklus wurde mehr TetR an den immobilisierten Operator gebunden, während die

SPR-Signale bei  $t_1$  (siehe Abbildung 6-10, Seite 76) auf einer Höhe blieben oder sogar geringfügig abfielen. Abbildung 6-21 zeigt einen typischen Verlauf der TetR-Bindung innerhalb einer Messreihe.

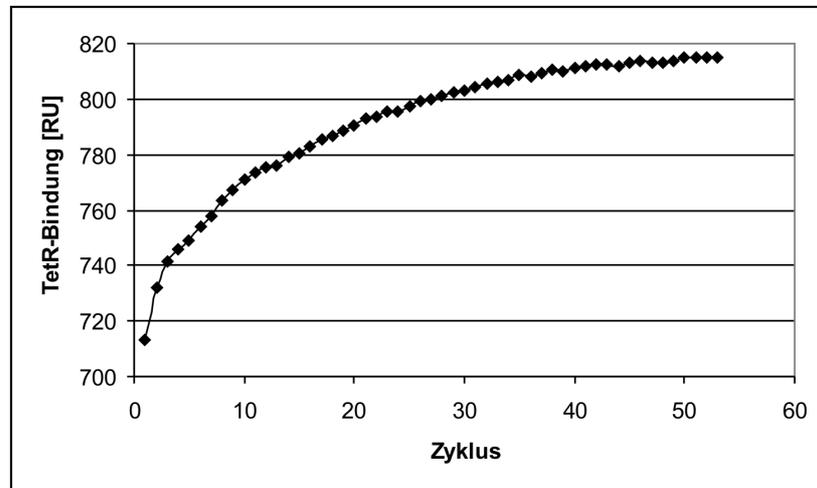
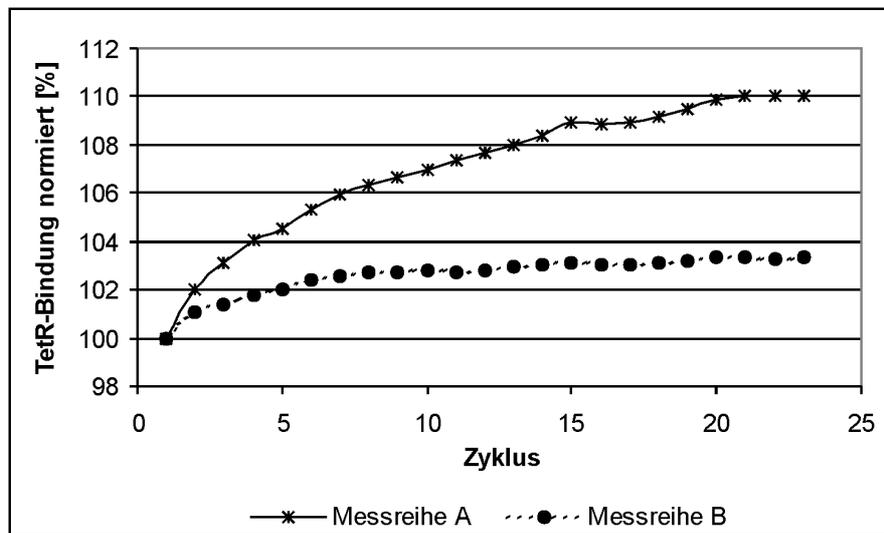


Abbildung 6-21 Typischer Verlauf der TetR-Bindung während einer Messreihe. *tetO* „komplementär“, Immobilisierungslevel = 911 RU, Biacore Q®

Der TetR-Anstieg war zu Beginn der Messreihe am deutlichsten. Bei langen Läufen wurde bei den hohen Zyklenzahlen eine konstante (hohe) Beladung mit TetR erhalten. Bei Verwendung eines Chips mit frisch immobilisiertem *tetO* war ein TetR-Anstieg innerhalb einer Messreihe von mehreren hundert RU möglich. Während der weiteren Benutzung des Chips zeigte der TetR-Anstieg einen weniger extremen Verlauf, wurde jedoch bei jeder neu gestarteten Messreihe beobachtet.

Das SPR-Gerät geht nach einer Messreihe automatisch in den Standby-Modus. In diesem Modus beträgt die Flussrate des Laufpuffers 0,5  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Wurde die Flussrate vor einer Messreihe für mehrere Stunden auf den für eine Messreihe verwendeten Wert von 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  erhöht, zeigte sich ein deutlich geringerer Anstieg der TetR-Bindung. Abbildung 6-22 zeigt die TetR-Bindung von zwei identischen Messreihen, wobei unmittelbar vor der zweiten Messreihe (Messreihe B) der Chip mit der höheren Flussrate für 2,9 Stunden konditioniert wurde. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde in Abbildung 6-22 die TetR-Bindung normiert aufgetragen, da sich die beiden Messreihen in ihrer absoluten TetR-Bindung leicht unterschieden. Messreihe A zeigte eine TetR-Bindung, die von 815 RU auf 852 RU anstieg. Damit zeigte sie eine durchschnittliche Erhöhung der TetR-Bindung von 2,0 RU/Zyklus. Messreihe B zeigte unmittelbar nach der Konditionierung eine TetR-Bindung, die von 879 bis

887 RU reichte und damit einem durchschnittlichen Anstieg von nur 0,5 RU/Zyklus entsprach.



**Abbildung 6-22 TetR-Bindung innerhalb einer Messreihe.** Dargestellt sind zwei vergleichbare Messreihen, wobei für Messreihe B die Chipoberfläche für 2,9 Stunden vorkonditioniert wurde. Messreihe A wurde ohne Konditionierung durchgeführt. Es wurde die normierte TetR-Bindung aufgetragen ( $(\text{TetR-Bindung})_{\text{Zyklus } X} / (\text{TetR-Bindung})_{\text{Zyklus } 1} * 100$ ). *tetO*-Bindung: 1341 RU, „2x Biotin“.

Chip mit frisch immobilisiertem *tetO* wurde vor der ersten Messreihe vorkonditioniert, um den TetR-Anstieg zu minimieren. Für die folgenden Messreihen blieb der positive Effekt der Konditionierung erhalten, sofern diese zeitlich unmittelbar aufeinander folgten. Nach einem Standby-Betrieb (0,5  $\mu\text{l}/\text{min}$  Laufpuffer statt 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  bei Messreihen) zeigte sich wieder der Anstieg der TetR-Bindung, so dass nach einer Unterbrechung wieder neu vorkonditioniert werden musste. (siehe hierzu auch Diskussion in Abschnitt 7.3.5, Seite 134).

## 6.10 Repressor-Varianten

Für den Nachweis von Tetracyclinen musste der Repressors vom Operator durch eine tetracyclininduzierte Konformationsänderung (Induktion) abgelöst werden. Dieser Vorgang führte letztlich zur Änderung der Masse auf dem SPR-Chip, die als Nachweis für den Analyten genutzt wurde. Die Induktion kann durch die Wahl des Repressor-Proteins beeinflusst werden.

Für die Optimierung des Tetracyclin-Assays standen 5 unterschiedliche TetR-Varianten zur Verfügung, wobei der Repressor TetR(BD) als Bezugsprotein verwendet wurde. Die Varianten TetR(BD)S135L und TetR(D)V113A trugen Punkt-Mutationen im Tetracyclin-Bindungs-zentrum und zeigten zu bestimmten Tetracyclin-Derivaten eine im Vergleich zum

TetR(BD) erhöhte Bindungsaktivität [68; 172; 173]. Für die Zuverlässigkeit eines Analysenverfahrens für Tetracycline ist eine gute Stabilität der Repressor-Proteine von Vorteil. Aus diesem Grund wurden auch die beiden TetR-Varianten TetR(B)P184Q und scTetR(BD) getestet, die eine geringere Neigung zum Denaturieren durch Harnstoff aufweisen [174; 175]. Die Erhöhung der Stabilität wurde beim Repressor scTetR(BD) durch kovalente Verknüpfung seiner beiden Untereinheiten durch einen 27 Aminosäuren umfassenden Peptidstrang erreicht. Diese wird Variante auch als single chain bezeichnet, da sie im Gegensatz zu den anderen Varianten nur noch aus einem Aminosäurestrang besteht (Sequenzen siehe Abschnitt 6.2, Seite 64).

Um die Eigenschaften der 5 TetR-Varianten in dem Testsystem zu vergleichen, wurden alle Varianten in einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/L}$  eingesetzt. Die vergleichenden Messreihen wurden in der Matrix Honig am Biacore Q<sup>®</sup> durchgeführt. Zur Beurteilung der TetR-Varianten wurde die Bindung des jeweiligen Repressors an die mit Operator belegte Chipoberfläche und die Repressor-Ablösung durch injiziertes Tetracyclin herangezogen. Zusätzlich wurden die Kreuzreaktivitäten des jeweiligen Repressors für die 4 Tetracycline Oxytetracyclin (OTC), Tetracyclin (TC), Chlortetracyclin (CTC) und Doxycyclin (DC) betrachtet.

### 6.10.1 Kalibrierkurven

Zur Beurteilung des Verhaltens der TetR-Varianten wurden mit jedem TetR Kalibrierkurven in Honig aufgenommen. Durch die Betrachtung der  $\text{IB}_{50}$ -Werte war eine Aussage über die Sensitivität des Testsystems unter Verwendung des jeweiligen Repressors möglich. Abbildung 6-23 zeigt die Kalibrierkurven, Tabelle 6-18 gibt den  $\text{IB}_{50}$ -Wert der Kalibrierkurven und die maximale TetR-Bindung bei Verwendung des jeweiligen Repressor-Proteins wieder.

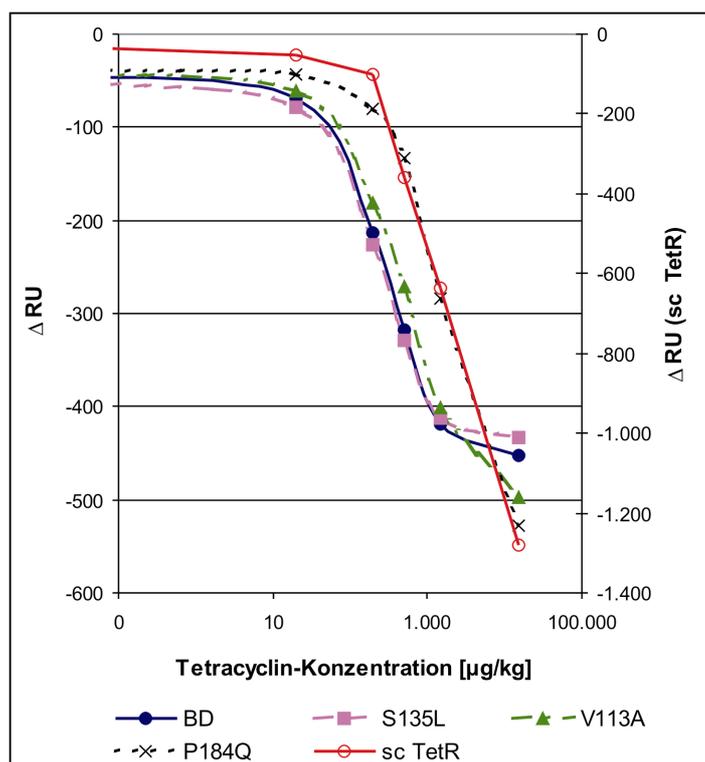


Abbildung 6-23 Tetracyclin-Kalibrierkurven in Honig mit unterschiedlichen Repressor-Proteinen. Die Konzentration der jeweiligen zur Beladung verwendeten Repressor-Lösung betrug 1  $\mu\text{mol/L}$ . Für die single chain-Variante wurde eine zweite Achse (rechte Seite) eingezeichnet. Die *tetO*-Belegung betrug 864,2 RU mit „2x Biotin“. Für die Variante scTetR betrug sie 879 RU („2x Biotin“).

TetR-Variante	IB <sub>50</sub> [ $\mu\text{g/kg}$ ]	TetR-Bindung [RU]
BD	265	469
S135L	228	439
V113A	464	503
P184Q	1501	553
scTetR	1526	2896

Tabelle 6-18 IB<sub>50</sub>-Werte für Tetracyclin und TetR-Bindungen der unterschiedlichen TetR-Varianten. Für die TetR-Bindung wurde der Mittelwert aus jeweils 48 Zyklen gebildet. Die *tetO*-Belegung betrug 864 RU mit „2x Biotin“. Für die Variante scTetR betrug sie 879 RU („2x Biotin“).

Die TetR-Variante scTetR wies eine TetR-Bindung von fast 3.000 RU auf. Die anderen Varianten lagen mit einer Bindung von rund 500 RU um den Faktor 6 niedriger.

Die beiden TetR-Varianten mit erhöhter Stabilität P184Q und scTetR, zeigten beide einen IB<sub>50</sub>-Wert von rund 1.500  $\mu\text{g/kg}$ . Zur Ablösung von 50 % des gebundenen Repressors war bei ihnen eine Tetracyclin-Menge nötig, die bei den anderen TetR-Varianten bereits ausgereicht hätte, um das gebundene TetR vollständig abzulösen.

TetR(BD) und S135L zeigten mit  $IB_{50}$ -Werten von 228 und 265  $\mu\text{g}/\text{kg}$  die höchste Sensitivität im getesteten Assay. Bezüglich ihrer TetR-Bindung und der Kalibrierkurve konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen diesen beiden Varianten festgestellt werden.

## 6.11 Selektivität und Kreuzreaktivität

Die 5 TetR-Varianten sollten auch hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität zu den verschiedenen Tetracyclinen untersucht werden. Um die Anzahl der Messungen in einem praktikablen Rahmen zu halten, beschränkte sich die Untersuchung der Kreuzreaktivität auf die für die Rückstandskontrolle relevanten Tetracycline. Für die Verwendung bei lebensmittelliefernden Tieren sind lediglich die 4 Tetracycline Tetracyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin und Doxycyclin zugelassen. Weitere Tetracycline und Antibiotika anderer Klassen wurden ausschließlich mit dem Repressor TetR(BD) betrachtet.

für jedes der 4 Tetracycline wurde eine Kalibrierkurve mit jeder TetR-Variante aufgenommen. Die Kreuzreaktivität wurde in Anlehnung an die von Märtlbauer beschriebene Bestimmung bei Enzymimmunoassays [93] berechnet. Dabei wurden die  $IB_{50}$ -Konzentrationen für Oxy-, Chlor- und Doxycyclin bestimmt und zur  $IB_{50}$ -Konzentration von Tetracyclin in Relation gesetzt. Die Kreuzreaktivität wird als relative Kreuzreaktivität bezogen auf Tetracyclin in Prozent angegeben<sup>4</sup>.

Der geeignetste Repressor sollte mit möglichst allen Tetracyclinen eine vergleichbare Kreuzreaktivität zeigen, da der Biosensor-Assay in diesem Fall auf alle Tetracycline in gleichem Maße ansprechen würde. Damit wäre bereits ohne eine weitere Analyse zur Identifizierung des Tetracyclins eine quantitative Aussage möglich.

Tabelle 6-19 zeigt die Kreuzreaktivitäten bezogen auf Tetracyclin, die für die unterschiedlichen TetR-Varianten bestimmt wurden.

---

<sup>4</sup> Die hier bestimmte Kreuzreaktivität entspricht der Induzierbarkeit des Repressor-Proteins durch das jeweilige Tetracyclin in dem verwendeten Assay-Format – also der Fähigkeit des Tetracyclins, durch Bindung an den Repressor diesen vom Operator zu lösen.

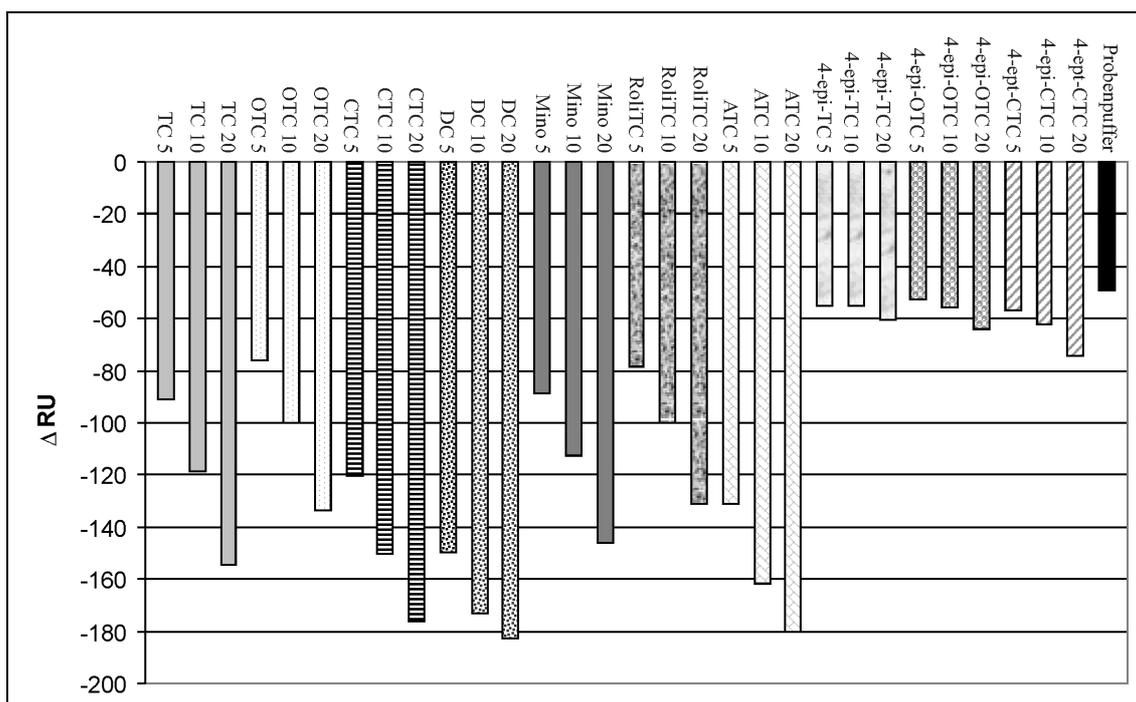
	Kreuzreaktivitäten [%]			
	TC	OTC	CTC	DC
BD	100	80	177	186
S135L	100	78	158	177
V113A	100	95	131	139
P184Q	100	47	273	607
scTetR	100	89	106	187

**Tabelle 6-19 Kreuzreaktivitäten der TetR-Varianten für verschiedene Tetracycline. Die Kreuzreaktivitäten wurden auf Tetracyclin als Referenz bezogen. Sie wurden in einem 1:10 in Puffer verdünnten Honig bestimmt. Die TetR-Konzentration betrug jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$ , die *tetO*-Belegung 864 RU mit „2x Biotin“, für die Variante scTetR betrug sie 879 RU („2x Biotin“).**

Oxytetracyclin zeigte bei allen 5 TetR-Varianten die geringste Kreuzreaktivität, wohingegen Chlortetracyclin und Doxycyclin eine hohe Kreuzreaktivität zeigten. Die TetR-Variante P184Q zeigte eine sehr große Spannbreite der Kreuzreaktivitäten mit den unterschiedlichen Tetracyclinen. Sie reichten von 47 % für OTC bis 607 % für DC. Damit ist der  $\Delta$  RU bei Verwendung dieser Variante nicht nur von der Konzentration des als Rückstand enthaltenen Tetracyclins abhängig, sondern auch in nicht unerheblichen Maße von dessen Art. Die Variante V113A hingegen wies die geringste Differenz der Kreuzreaktivitäten unterschiedlicher Tetracycline auf. Sie wäre somit hinsichtlich des Kriteriums einer vergleichbaren Nachweisempfindlichkeit für alle rückstandsanalytisch relevanten Tetracycline die beste Variante. Da sie jedoch einen erhöhten  $\text{IB}_{50}$ -Wert aufwies (Tabelle 6-18, Seite 102), wäre ihre Verwendung mit einem Verlust an Sensitivität des Assays verbunden. In Bezug auf die Kreuzreaktivitäten zwischen den TetR-Varianten BD und S135L lies sich kein maßgeblicher Unterschied erkennen. Da bereits zahlreiche Messreihen mit der Variante BD durchgeführt wurden und sie sich als eine der geeignetsten Varianten erwies, wurde auch mit diesem TetR weitergearbeitet. Auf diese Weise war ein besserer Vergleich der Messreihen vor und nach der Untersuchung unterschiedlicher TetR-Varianten möglich.

Um die Selektivität des Screening-Assays auf Tetracycline zu testen, wurden neben weiteren Tetracyclinen auch die bei der Kontrolle auf Höchstmengenüberschreitung zu berücksichtigenden 4-epi-Tetracycline untersucht. Zusätzlich wurde die Kreuzreaktivität des Assays auf neun Antibiotika aus fünf anderen Antibiotika-Klassen ( $\beta$ -Lactame, Makrolide, Aminoglycoside, Sulfonamide und Chloramphenicol) geprüft. Diese Untersuchungen wurden mit tetracyclinhaltigen Standard-Lösungen durchgeführt. Als Repressor-Protein wurde der

TetR(BD) verwendet. Dabei wurde jedes Tetracyclin in den Konzentrationen 5, 10 und 20  $\mu\text{g/L}$  vermessen, während die Antibiotika der anderen Klassen in den Konzentrationen ihres jeweiligen MRL in Milch verwendet wurden. Chloramphenicol, für das kein MRL festgelegt ist, wurde mit 4  $\mu\text{g/kg}$  vermessen. Aufgrund der hohen Probenzahl konnten keine vollständigen Kalibrierkurven für jedes Antibiotikum aufgenommen werden, daher ließ sich auch die Kreuzreaktivität nicht berechnen. Es werden hier die  $\Delta$  RU-Werte direkt miteinander verglichen (Abbildung 6-24).



**Abbildung 6-24 Kreuzreaktivität des Assay mit weiteren Tetracyclinen.** Die Zahlen hinter den Antibiotika-Namen stellen die jeweilige Konzentration des Antibiotikums in  $\mu\text{g/L}$  dar. (TC = Tetracyclin, OTC = Oxytetracyclin, CTC = Chlortetracyclin, DC = Doxycyclin, Mino = Minocyclin, RoliTC = Rolitetraclin, ATC = Anhydrotetraclin). Die Messung wurde am Biacore 3000<sup>®</sup> mit einem *tetO*-Immobilisierungslevel von 336 RU („2x Biotin“) und einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/L}$  TetR(BD) durchgeführt.

Es zeigte sich, dass der Assay auch andere Tetracycline quantitativ erfassen kann. Dabei konnte für Doxycyclin die höchste Aktivität und für Rolitetraclin die geringste beobachtet werden. Die 4-Epimere der Tetracycline zeigten nur eine sehr geringe Kreuzreaktion.

Die vermessenen Antibiotika der  $\beta$ -Lactame, Makrolide, Aminoglycoside, Sulfonamide und das Chloramphenicol zeigten  $\Delta$  RU-Werte, die innerhalb der Schwankungsbreiten der Puffer-Werte lagen (nicht gezeigt). Für sie konnte bei den jeweiligen MRL-Konzentrationen keine Kreuzreaktivität mit dem Tetracyclin-Assay beobachtet werden, der Assay reagierte spezifisch auf Tetracycline.

## 6.12 Chipstabilität

Zur Betrachtung der Stabilität der Bindung zwischen dem biotinylierten *tetO* und der mit Streptavidin belegten Sensorchip-Oberfläche wurde der absolute Response am Messpunkt  $t_1$  herangezogen. Betrachtet man diesen für jeden neuen Zyklus innerhalb einer Messreihe, so bekommt man einen Eindruck, wie sich die jeweilige Messreihe (Injektion von Probe, Regenerationslösung usw.) auf die Bindung des biotinylierten Operators an die Streptavidin-Oberfläche auswirkt (Basislinie). Es sollte also sowohl ein Ablösen des doppelsträngigen Operators vom Streptavidin bzw. das Ablösen eines DNA-Einzelstranges vom anderen als auch eine kontinuierliche Adsorption von Matrixkomponenten an die Chipoberfläche erkannt werden. Da beide Vorgänge zu einem Verlust an TetR-Bindungsfähigkeit führen würden, wurde auch diese zur Beurteilung der Chipstabilität herangezogen.

Abbildung 6-25 zeigt die Basislinie von zwei mit *tetO* belegte Flusszellen einer Messreihe, in der verschiedene Rohmilchproben vermessen wurden. Die dritte Flusszelle wurde unbelegt als Referenz genutzt. In allen Flusszellen blieb die Basislinie über die gesamte Messreihe (99 Zyklen) betrachtet konstant. Innerhalb der Messreihe konnte keine Ablösung von Operator-DNA beobachtet werden.

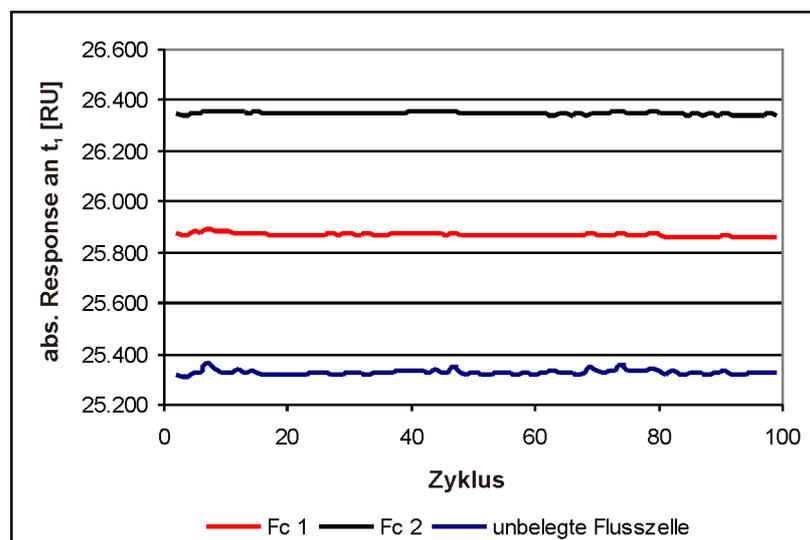
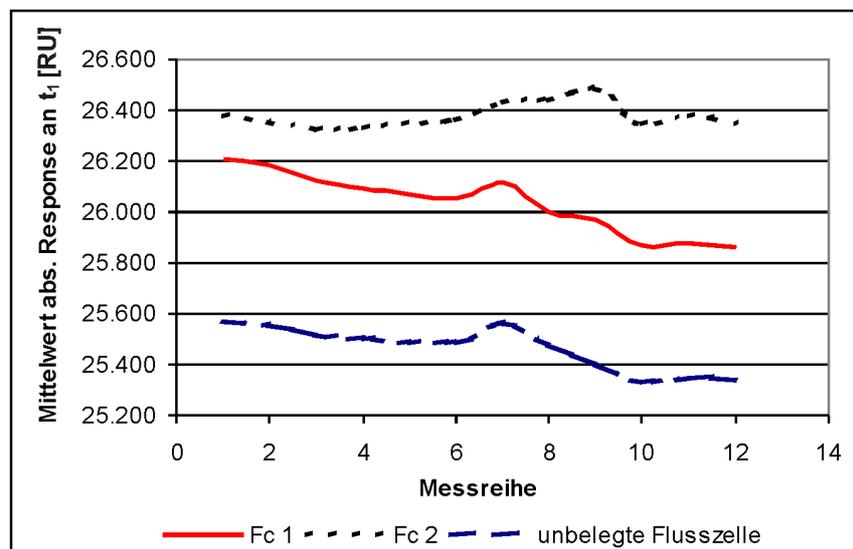


Abbildung 6-25 Stabilität der *tetO*-Bindung an die Streptavidin-Oberfläche des Sensorchips innerhalb einer Messreihe. Gezeigt ist eine Messreihe mit entfetteten, 1:5 verdünnten und erhitzten Rohmilchproben in insgesamt 99 Zyklen auf zwei Flusszellen im Biacore 3000®. Immobilisierungslevel („2x Biotin“): Fc 1 = 328 RU, Fc 2 = 338 RU, Konzentration TetR-Lösung = 1  $\mu\text{mol/L}$ , Regeneration mit 0,3 % SDS in Laufpuffer

Um die Stabilität der Bindung zwischen Streptavidin und biotinyliertem *tetO* über die gestammte Analysendauer eines Chips (= alle auf diesem Chip durchgeführten Messreihen) zu beurteilen, wurde alle Messwerte an  $t_1$  einer Messreihe gemittelt und mit den anderen Messreihen dieses Chips verglichen. Auf diese Weise konnte eine Änderung der Masse auf der Chipoberfläche erkannt werden, die sich aufgrund eines für die gesamte Messreihe geänderten Parameters (Laufpuffer, Regenerationsreagenz, TetR-Konzentration,...) ergab.

Der Chip, auf dem die in Abbildung 6-25 dargestellte Messreihe durchgeführt wurde, wurde für 12 Messreihen mit insgesamt 567 Zyklen verwendet. Dabei wurden sowohl Messreihen mit Standard-Lösungen, mit den Matrices Rohmilch und Honig, als auch Messreihen mit unterschiedlichen TetR-Konzentrationen (0,1 – 10  $\mu\text{mol/L}$ ) durchgeführt. Abbildung 6-26 zeigt die Entwicklung der Basislinie über die gesamte Analysenzeit dieses Chips.

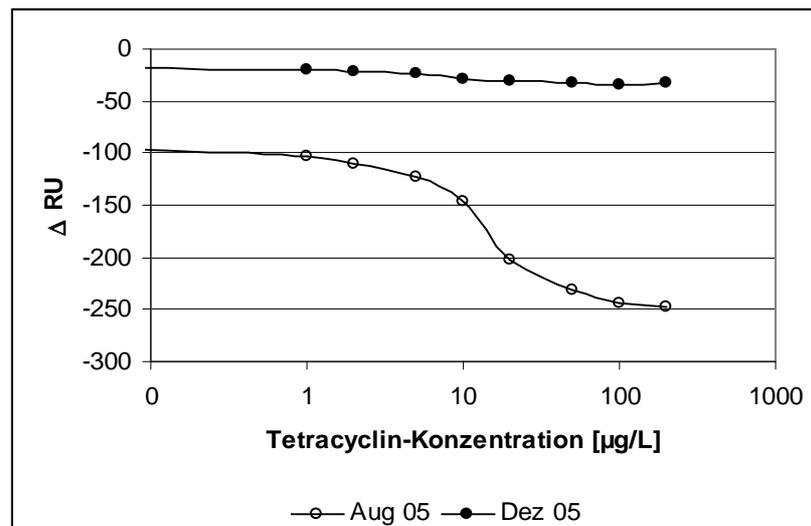


**Abbildung 6-26 Betrachtung der Basislinie über die gesamte Analysenzeit eines Chips bestehend aus 12 Messreihen mit insgesamt 567 Zyklen. Es wurde jeweils der Mittelwert der Basislinie einer Messreihe mit dem anderer Messreihen verglichen. Immobilisierungslevel („2x Biotin“): Fc 1 = 328 RU, Fc 2 = 338 RU, Konzentration TetR-Lösung = 1  $\mu\text{mol/L}$ , Regeneration mit 0,3 % SDS in Laufpuffer. Analyse im Biacore 3000®.**

Die Basislinie von Flusszelle 1 zeigte einen Abfall von 348 RU (erste Messreihe - letzte Messreihe) über alle 12 Messungen betrachtet, während Flusszelle 2 um 248 RU abfiel. Auffällig war, dass die nicht mit *tetO* belegte Flusszelle ebenfalls um 235 RU abfiel. Deshalb konnte nicht davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem Abfall des Response in den Flusszellen 1 und 2 um ein Ablösen des Operators handelte.

Die Bindung zwischen dem biotinylierten *tetO* und dem Streptavidin des Sensorchips wurde in mehr als 500 Zyklen nicht beeinträchtigt.

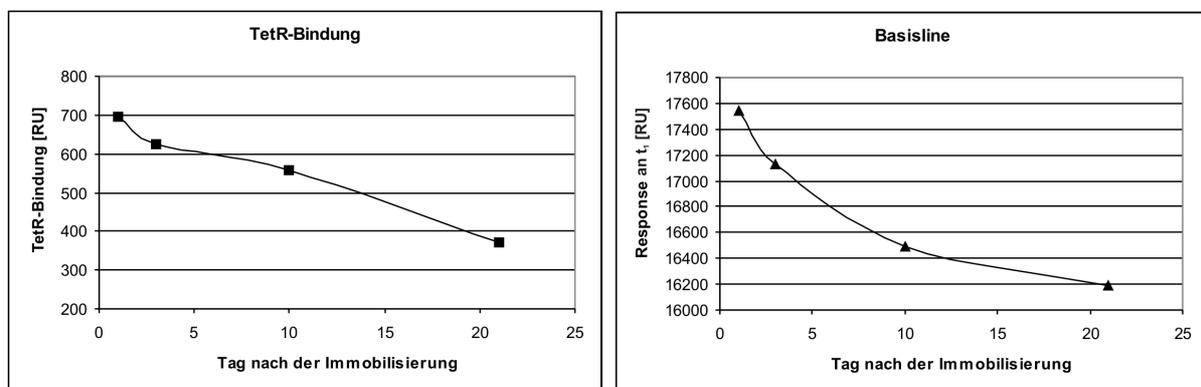
Alle Messreihen mit dem soeben dargestellten Chip wurden unmittelbar hintereinander durchgeführt, ohne ihn aus dem Gerät auszubauen. Nach einer Lagerung des Sensorchips in trockenem Zustand bei 4 °C zeigte sich jedoch starker Verlust der TetR-Bindung, der auf eine Veränderung des chipgebundenen Operators zurückzuführen war. Die Auswirkungen der Lagerung sollen hier an einem Chip gezeigt werden, der über einen Zeitraum von einer Woche kontinuierlich genutzt, 4 Monate trocken bei 4 °C gelagert und anschließend erneut vermessen wurde (Abbildung 6-27).



**Abbildung 6-27** Vergleich von Standard-Kalibrierkurven aufgenommen direkt nach Immobilisierung von *tetO* (Aug 05) und 4 Monate später (Dez 05) im Biacore 3000®. Die Lagerung des Chips erfolgte trocken bei 4 °C. Der *tetO*-Immobilisierungslevel betrug 356 RU („2x Biotin“)

Der frisch belegte Chip zeigte zunächst eine durchschnittliche TetR-Bindung von 291 RU (bei 356 RU *tetO*). Diese zeigte während 10 Messreihen in unterschiedlichen Matrices mit insgesamt 556 Zyklen eine relative Standardabweichung von 9 % und wurde somit als stabil erachtet. Nach Lagerung des Chips von 4 Monate ließ sich TetR nur noch zu 24 % des Ausgangswertes binden. Vermutlich veränderte sich der Operator auf der Chipoberfläche so, dass eine Bindung mit dem Repressor nicht mehr möglich war. Durch die schlechte Repressor-Bindung an den Chip wurde auch die Ablösung durch die Injektion von Tetracyclin stark beeinträchtigt. Nach 4-monatiger Lagerung konnte keine Standard-Kalibrierkurve aufgenommen werden (Abbildung 6-27). Der Unterschied der  $\Delta$  RU-Werte zwischen den Lösungen ohne und mit 200 µg/kg Tetracyclin lag nur noch bei 15 RU, im Gegensatz zu 157 RU vor der Lagerung. Eine Lagerung von 4 Monaten hat den Chip so weit beeinträchtigt, dass keine Quantifizierung von Tetracyclinen mehr möglich war.

Aber auch die Lagerung über einen kürzeren Zeitraum beeinträchtigte den Tetracyclin-Nachweis. Abbildung 6-28 zeigt die Entwicklung der Basislinie und der TetR-Bindung eines Chips, der über die Dauer von 3 Wochen für 4 jeweils gleiche Messreihen (je 34 Zyklen) mit Standard-Lösungen verwendet und zwischen den Messreihen nach Trocknung im Stickstoffstrom bei 4 °C über Trockenmittel gelagert wurde (Messreihen im Biacore Q<sup>®</sup> durchgeführt). Bereits 3 Tage nach Immobilisierung von *tetO* auf der Chipoberfläche war ein deutlicher Abfall der Basislinie und der TetR-Bindung zu erkennen. Dieser Trend setzte sich fort, bis nach 3 Wochen das Messsignal bei  $t_1$  um 1272 RU abgenommen hatte. Da der Immobilisierungslevel des Operators nur bei 918 RU lag, müssen auch andere Vorgänge zu einem Abfall des Response am Messpunkt  $t_1$  geführt haben. Dennoch ist von einer teilweisen Ablösung der Operator-DNA auszugehen, da parallel zur abfallenden Basislinie eine verminderte TetR-Bindung zu beobachten war. An der Ablösung des *tetO* von der Chipoberfläche sind mikrobiologische Abbauprozesse wahrscheinlich nicht beteiligt, da der Chip über Trockenmittel gelagert wurde und eine Restfeuchtigkeit – die für mikrobiologische Prozesse nötig wäre – somit auszuschließen war. Welche Prozesse letztlich zum Verlust der TetR-Bindungsfähigkeit des ausgebauten Sensorchips führten kann ohne weitere Untersuchungen nicht beurteilt werden.



**Abbildung 6-28** Entwicklung der Basislinie und der TetR-Bindung eines Chips über einen Zeitraum von 3 Wochen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aller Zyklen einer Messreihe. Zwischen jeder Messreihe wurde der Chip aus dem Gerät ausgebaut und wie im Text beschrieben gelagert. Die Messung erfolgte am Biacore Q<sup>®</sup> mit einem Immobilisierungslevel von 918 RU *tetO* („1x Biotin“).

Der Abfall der Basislinie und der TetR-Bindungsfähigkeit ließ sich vor allem dann beobachten, wenn der Chip häufig ausgebaut und außerhalb des Gerätes aufbewahrt wurde. Je länger der Chip gelagert wurde, desto größer waren die Verluste in der TetR-Bindung.

## 6.13 Bestimmung von Tetracyclin in Rohmilch und Honig

Die quantitativen Analysen mit dem Tetracyclin-Assay dienten vor allem dazu, festzustellen, mit welcher Sensitivität Tetracyclin mit den bisher optimierten Assay-Bedingungen nachgewiesen werden konnte. Sie stellen keine abschließenden Leistungskriterien des Assays dar, da dieser an mehreren Punkten noch der weiteren Optimierung bedarf (siehe Ausblick, Abschnitt 9, Seite 150).

### 6.13.1 Behandlung der Milchproben vor einer SPR-Analyse und Optimierung des Erhitzungsschrittes

Für die Analyse von Rohmilchproben musste zunächst deren Matrixinterferenzen mit der Chipoberfläche getestet werden. Um den Chip nicht zu stark zu belasten und ein Verstopfen des mikrofluiden Flusssystems des Biacore Gerätes durch in der Milch enthaltene Partikel zu vermeiden, wurde die Rohmilch zentrifugiert und dabei gleichzeitig entfettet. Anschließend erfolgte eine Verdünnung der Milch im Volumenverhältnis 1:5 mit Probenpuffer. Eine so vorbehandelte Rohmilchprobe zeigte so starke Matrixinterferenzen, dass ein Nachweis von Tetracyclin ohne weitere Aufarbeitung nicht möglich war. Cacciatore et al. [141] erhitzen die Rohmilch, um die unspezifischen Bindungen von Matrixkomponenten an die Chipoberfläche in ihrem SPR-Assay zu reduzieren. Dieses Vorgehen sollte auf den entwickelten Tetracyclin-Assay angewendet werden. Dabei sollte der Erhitzungsschritt möglichst schonend durchgeführt werden, um die Tetracycline in der Probe so wenig wie möglich zu verändern. Zur Ermittlung der besten Bedingungen für die Erhitzung, wurden am MRL dotierte (100 µg/kg), entfettete Rohmilchproben nach der Verdünnung mit Probenpuffer unterschiedlich lange auf Temperaturen zwischen 60 und 95 °C erhitzt. Anschließend wurden sie sofort in kaltem Wasser abgekühlt, zentrifugiert und der Überstand im SPR-Spektrometer vermessen (Bedingungen der Aufarbeitung siehe Abschnitt 10.6.4.2, Seite 176). Abbildung 6-29 stellt den  $\Delta$  RU in Abhängigkeit von Erhitzungsdauer und Temperatur dar.

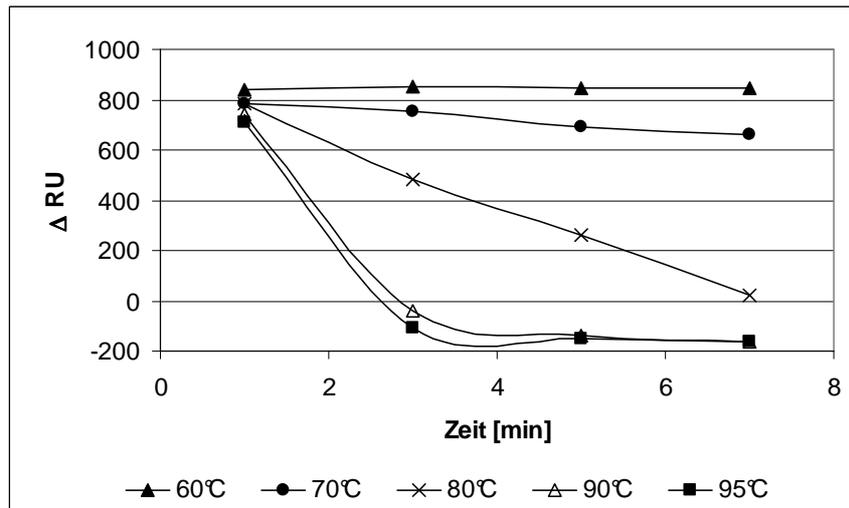


Abbildung 6-29 Optimierung des Erhitzungsschrittes während der Rohmilchaufarbeitung bezogen auf Erhitzungsdauer und Temperatur. Die Rohmilchproben wurden für 1 bis 7 Minuten auf Temperaturen von 60 bis 95 °C erhitzt. Die Messreihe wurde im Biacore 3000<sup>®</sup> mit einer *tetO*-Immobilisierung von 378 RU („2x Biotin“) durchgeführt.

Die meisten der  $\Delta$ RU-Werte waren positiv, was bedeutet, dass sich während der Probeninjektion Matrixkomponenten – vermutlich Milchproteine – unspezifisch an die Chipoberfläche abgeheftet hatten. Erst Temperaturen von mindestens 80 °C für mehr als 3 Minuten zeigen eine deutlichen Reduktion der Matrixinterferenzen. Mit 5 bis 7 Minuten und 90 bis 95 °C konnten die unspezifischen Bindungen der Matrix auf ein Minimum reduziert werden. Um eine möglichst schonende aber dennoch maximale Entfernung störender Matrixbestandteile zu erreichen, wurde für die Aufarbeitung von Rohmilchproben eine Erhitzung für 5 Minuten auf 95 °C gewählt.

Die Stabilität des Tetracyclin gegenüber dem Erhitzungsprozess wurde mit einer Standard-Lösung von 100  $\mu$ g/L Tetracyclin untersucht. Diese wurde in zwei Teile geteilt, wovon einer vor der SPR-Analyse für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt wurde und der andere ohne Erhitzung vermessen wurde. Die Unversehrtheit des Tetracyclins wurde über die abgelöste TetR-Menge während der Injektion der Lösungen beurteilt. Die erhitzte Probe zeigte eine um 5 % geringere TetR-Ablösung als die nicht erhitzte Probe. Dieser Verlust an TetR-Bindungsvermögen könnte durch eine verstärkte Epimerisierungsrate bei höheren Temperaturen verursacht worden sein (siehe Abschnitt 2.2.2.1, Seite 4).

Das Tetracyclin zeigt bei einer Erhitzung in Puffer auf 95 °C für 5 Minuten eine für den Screening-Assay ausreichende Stabilität. Diese Untersuchungsergebnisse können jedoch nicht direkt auf die Stabilität des Tetracyclins in Rohmilch übertragen werden, da gerade die Epimerisierung sehr stark von der Umgebung abhängt. Hier müssten noch genauere

Untersuchungen zur Epimerisierung von unterschiedlichen Tetracyclinen in Rohmilch während des Erhitzungsprozesses gemacht werden.

### 6.13.2 Kalibrierkurven von Tetracyclin in Rohmilch

Nach der Optimierung der Probenaufarbeitung konnten erste Messungen mit der Matrix Rohmilch durchgeführt werden. Dazu wurde eine Tank-Rohmilch mit Tetracyclin im Konzentrationsbereich 0 bis 8.000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dotiert, um eine vollständige Kalibrierkurve zu erhalten. Die Milch wurde wie in Abschnitt 10.6.4.2 (Seite 176) angegeben aufgearbeitet und SPR-spektrometrisch vermessen. Die so aufgenommene Kalibrierkurve in Rohmilch wurde mit einer Standard-Kalibrierkurve, die auf dem selben Sensorchip aufgenommen wurde, verglichen (Abbildung 6-30).

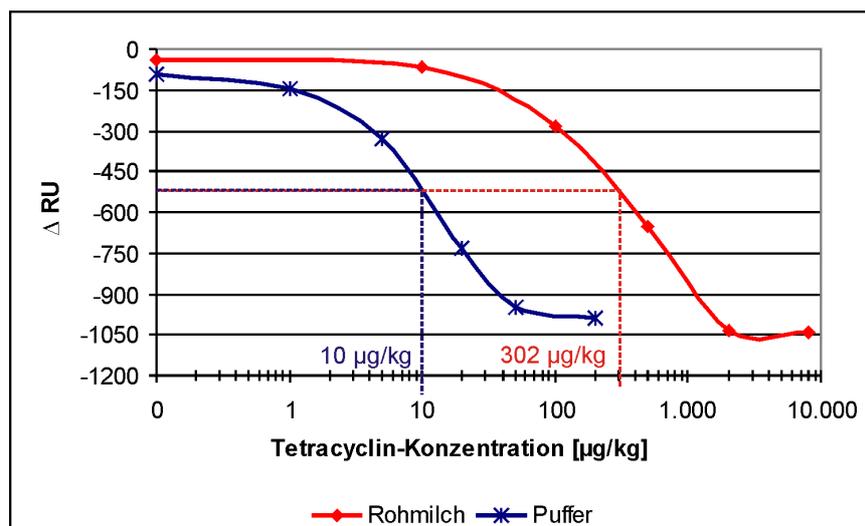


Abbildung 6-30 Vergleich von Rohmilch und Puffer anhand von zwei Kalibrierkurven. Die Messungen wurden im Biacore Q<sup>®</sup> mit einem Immobilisierungslevel von 803 RU („1x Biotin“) aufgenommen. Der berechnete  $\text{IB}_{50}$ -Wert für Rohmilch (rot) und Puffer (blau) ist jeweils angegeben.

Die Rohmilch-Kalibrierkurve wies einen Messbereich von ca. 10 bis 2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  auf. Der  $\text{IB}_{50}$ -Wert der Rohmilch-Kalibrierkurve wurde mit 302  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bestimmt. Dabei ließ sich jedoch ein deutlicher Unterschied von rund 250 RU zwischen dem Messsignal einer undotierten Rohmilch zu einer Rohmilch mit 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Tetracyclin (entspricht dem MRL) erkennen. Es war kein Problem, eine Rohmilch mit diesem Tetracyclin-Gehalt positiv nachzuweisen.

Die Kalibrierkurve mit Standard-Lösungen unterschied sich zu der in Rohmilch aufgenommenen deutlich. Sie zeigte einen wesentlich steileren Verlauf und wies einen

deutlich geringeren  $IB_{50}$ -Wert auf ( $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). Durch die Aufarbeitung der Rohmilchproben konnten nicht alle Matrixinterferenzen mit der Chipoberfläche beseitigt werden. Ein Vergleich der beiden Kalibrierkurven zeigt deutlich, dass eine Quantifizierung nur über eine Matrix-Kalibrierung möglich war. Eine Kalibrierung gegen Puffer-Lösungen würde viel geringere Tetracyclin-Gehalte vortäuschen. Daher wurde für weitere Messungen eine Matrix-Kalibrierkurve mitgeführt.

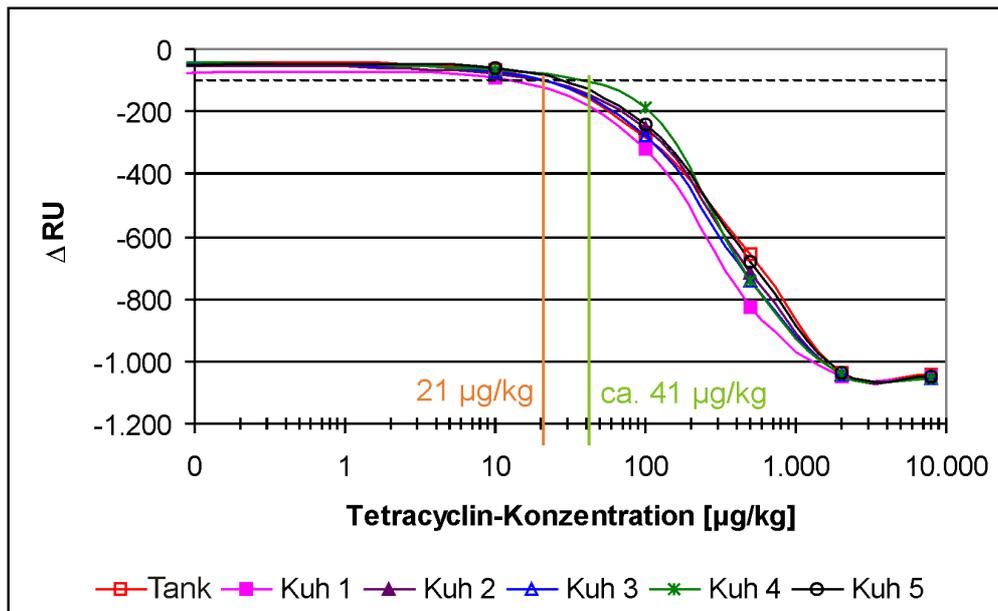
### 6.13.3 Untersuchung von Rohmilchproben unterschiedlicher Kühe

Die Rohmilch von einzelnen Kühen kann in ihrer Zusammensetzung bezüglich Fett- und Proteingehalt und der Anzahl der somatischen Zellen variieren. Dies kann zu einer Beeinflussung der Nachweisgenauigkeit von Antibiotika-Rückständen führen [182]. Um den Einfluss der Matrixinterferenzen auf den hier entwickelten Assay zu prüfen, wurde das Gemelk von 5 Kühen jeweils einzeln untersucht und einer Tank-Rohmilchprobe gegenübergestellt. Dabei wurden Proben der beiden Rassen Rotbraunes Fleckvieh (Kuh 1 und 2) und Schwarzbuntes Fleckvieh (Kuh 3 bis 5) verwendet. Von Kuh 5 wurde eine Kolostralmilch untersucht, also die Milch, die innerhalb der ersten 5 Tage nach dem Abkalben von der Kuh gebildet wird. Diese Milch unterscheidet sich in ihrer Zusammensetzung stark von der Normalmilch. Sie weist einen etwa 5-fach höheren Proteingehalt (vor allem Immunglobuline) und einen erhöhten Fettgehalt auf.

Jede Rohmilchprobe wurde vor der Aufarbeitung mit Tetracyclin in einem Konzentrationsbereich von 0 bis  $8.000 \mu\text{g}/\text{kg}$  dotiert, um eine vollständige Kalibrierkurve aufnehmen zu können (Abbildung 6-31). Zum Vergleich der Rohmilchproben der unterschiedlichen Kühe wurde die  $IB_{50}$ -Konzentration (Tabelle 6-20) herangezogen. Die Untersuchungen wurden im Biacore Q<sup>®</sup> mit einem Immobilisierungslevel von 803 RU („1x Biotin“) und  $1 \mu\text{mol}/\text{L}$  TetR(BD) durchgeführt.

	Tank	Kuh 1	Kuh 2	Kuh 3	Kuh 4	Kuh 5
$IB_{50}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	302	217	290	264	306	318

Tabelle 6-20  $IB_{50}$ -Konzentrationen der Rohmilchproben unterschiedlicher Kühe



**Abbildung 6-31** Kalibrierkurven von 5 Rohmilchproben unterschiedlicher Kühe und der Tank-Rohmilch. Die gestrichelte Linie stellt den Mittelwert aller Blindwerte minus der dreifachen Standardabweichung dar. In orange eingezeichnet ist die daraus berechnete Nachweisgrenze, in hellgrün eingezeichnet ist die Grenze, ab die Kalibrierkurven aller Kühe einen Response zeigen, der unterhalb der gestrichelten Linie liegt. Die Messreihe wurde im Biacore Q<sup>®</sup> mit einer *tetO*-Immobilisierung von 803 RU („1x Biotin“) durchgeführt.

Alle untersuchten Rohmilchproben zeigten undotiert ein ähnliches Messsignal. Im Kurvenverlauf jedoch unterschieden sie sich voneinander. Vor allem die Milch von Kuh 1 zeigte bei niedrigeren Tetracyclin-Konzentrationen ein größeres Messsignal als die Milch der anderen Kühe. Dies spiegelte sich auch in ihrem niedrigen  $IB_{50}$ -Wert (217  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) wieder. Die anderen Milchproben wiesen alle  $IB_{50}$ -Werte zwischen 290 und 318  $\mu\text{g}/\text{kg}$  auf. Auffällig war, dass die Kolostral-Milch von Kuh 5 keine Abweichung von den anderen Milchproben aufwies. Die von einer Normalmilch abweichende Zusammensetzung hat nicht zu unterschiedlichen Matrixinterferenzen mit der Chipoberfläche geführt.

Um Aussagen bezüglich rassenspezifischer Unterschiede der Milchproben treffen zu können, wurden zu wenig Milchproben unterschiedlicher Kühe untersucht. Die bisherigen Daten geben jedoch keinen Hinweis auf solche Unterschiede.

Zur Abschätzung der Nachweisgrenze von Tetracyclin in Rohmilch mit dem bisher optimierten Assay wurde der Mittelwert der undotierten Kuhmilchproben abzüglich der dreifachen Standardabweichung berechnet. Dieser Wert ist in Abbildung 6-31 als gestrichelte Linie dargestellt und entsprach über alle Proben gemittelt einem Wert von 21  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (orange Linie in Abbildung 6-31). Die so bestimmte Nachweisgrenze würde bedeuten dass alle Rohmilchproben mit einem Tetracyclin-Gehalt von 21  $\mu\text{g}/\text{kg}$  als positiv bestimmt werden

könnten. Betrachtet man die aufgenommenen Kalibrierkurven in Abbildung 6-31, so gilt dies nicht für die Proben der Kühe 4 und 5. Das Verfahren der 3-fachen Standardabweichung führt in diesem Fall zu einer zu geringen Nachweisgrenze. Die Kalibrierkurven der Milchproben der Kühe 4 und 5 fallen erst ab einer Tetracyclin-Konzentration von ca. 41 µg/kg unter den Response-Wert der 3-fache Standardabweichung der Blindwerte (hellgrüne Linie in Abbildung 6-31). Die reale Nachweisgrenze des Tetracyclin-Assays bestimmt über diese Rohmilchproben liegt also bei ca. 41 µg/kg. Zur korrekten Bestimmung der Nachweisgrenze sollte hier ein Verfahren angewendet werden, dass nicht nur auf die Betrachtung von undotierten Proben beruht. Dazu sollten auch deutlich mehr Proben unterschiedlicher Kühe genutzt werden.

Auch wenn die korrekte Nachweisgrenze hier nicht bestimmt werden konnte, ist doch zu erkennen, dass alle Milchproben mit einer Tetracyclin-Konzentration, die dem MRL in Milch entspricht (100 µg/kg) als deutlich positiv bestimmt werden konnten. Bei einem mittleren Messsignal für die undotierten Milchproben von -52 RU, weist selbst die Milchprobe mit dem geringsten  $\Delta$  RU (Probe von Kuh 4) ein mehr als 3-fach höheres Messsignal bei einer Tetracyclin-Konzentration am MRL-Wert auf (-187 RU).

### **Untersuchung von lyophilisierten Milchproben**

Die Eignung des Analysenverfahrens zur Untersuchung von lyophilisierten Milchprodukten wurde anhand der Milchproben von unterschiedlichen Kühen und der Tank-Rohmilch untersucht. Jede Milchprobe wurde ohne Antibiotikum und mit 50 bzw. 200 µg/kg Tetracyclin dotiert und wie unter Abschnitt 10.6.4.2 (Seite 176) beschrieben lyophilisiert. Die rekonstituierten Rohmilchproben wurden über eine Kalibrierkurve mit nicht-lyophilisierter Tank-Rohmilch im Bereich von 0 bis 8.000 µg/kg Tetracyclin (Abbildung 6-32) quantifiziert.

Abbildung 6-33 stellt die Quantifizierung der unterschiedlich dotierten Proben dar. Dabei wurden die Rohmilchproben unterschiedlicher Kühe einzeln analysiert, für die graphische Darstellung zusammengefasst und die Streubreite der einzelnen Rohmilchproben als Fehlerbalken dargestellt. Die lyophilisierten und nicht-lyophilisierten Blindproben der Tank-Milch sind in der Graphik nicht zu sehen, da sie jeweils genau mit 0 µg/kg quantifiziert wurden.

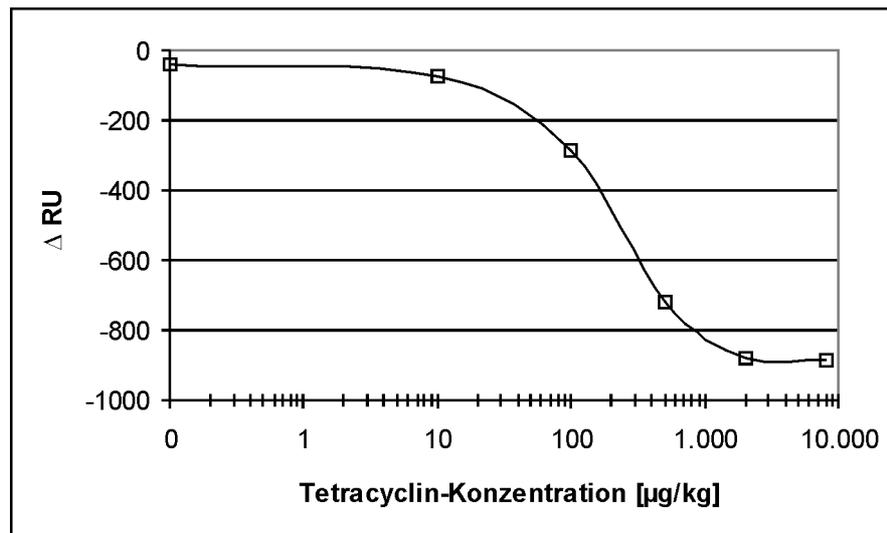


Abbildung 6-32 Kalibrierkurve der Tank-Milch zur Quantifizierung der lyophilisierten Milchproben. Die Messreihe wurde im Biacore Q<sup>®</sup> mit einer *tetO*-Immobilisierung von 803 RU („1x Biotin“) durchgeführt.

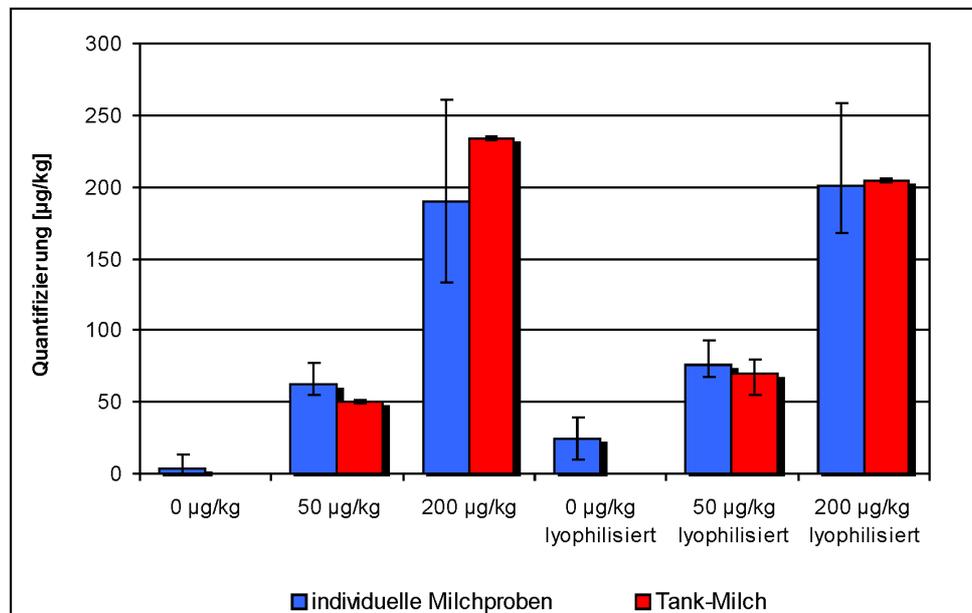


Abbildung 6-33 Quantifizierung von lyophilisierten im Vergleich zu nicht lyophilisierten Rohmilchproben. Alle Proben wurden über eine Kalibrierkurve in nicht lyophilisierter Tank-Rohmilch quantifiziert. Die Proben der Kühe 1-5 wurden rechnerisch zusammengefasst und die Streubreite der Proben als Fehlerbalken eingezeichnet. Die Fehlerbalken der Tank-Milchproben stellen die Streubreite einer Dreifachbestimmung dar. Die Messreihe wurde im Biacore Q<sup>®</sup> mit einem Immobilisierungslevel von 803 RU („1x Biotin“) durchgeführt.

Die lyophilisierten Rohmilchproben zeigten ebenso wie die nicht lyophilisierten eine Korrelation zwischen Tetracyclin-Gehalt und dem gemessenen Signal. Mit Ausnahme der lyophilisierten Blindprobe konnten die Milchproben der 5 unterschiedlichen Kühe in ähnlicher Höhe quantifiziert werden wie die Tank-Milch.

Die Quantifizierung von Proben von unterschiedlichen Kühen zeigt eine große Streubreite, unabhängig davon, ob sie lyophilisiert wurden. Wie bereits aus Abbildung 6-31 zu ersehen

war, zeigten die Rohmilchproben der 5 unterschiedlichen Kühe bei einer Tetracyclin-Konzentration von 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  eine starke Abweichung voneinander. Dieser Unterschied spiegelt sich auch hier bei den lyophilisierten Proben wider. Daher ist die Quantifizierung der Proben sehr ungenau. Nicht-lyophilisierte Proben mit einer Dotierung von 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  wurden mit 133  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Kuh 4) bis 261  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Kuh 1) Tetracyclin quantifiziert.

#### 6.13.4 Kalibrierkurven von Tetracyclin in Honig

Honigproben wurden vor der SPR-Analyse im Volumen-Verhältnis 1:10 verdünnt, um ein Verkleben des mikrofluiden Systems des Spektrometers durch den dickflüssigen Honig zu vermeiden. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation, um Pollen und andere Partikel zu entfernen. Die so vorbereiteten Proben wurden mit dem SPR-Biosensor vermessen.

Da für Tetracyclin in Honig kein MRL festgelegt wurde, muss ein möglichst sensitiver Nachweis erreicht werden. Eine Steigerung der Signalantwort auf Proben gleichen Tetracyclin-Gehaltes lässt sich bei dem SPR-Biosensor durch eine Verlängerung der Proben-Injektionszeit und damit der Kontaktzeit der tetracyclinhaltigen Lösung mit dem TetR auf dem Sensorchip erreichen. Aus diesem Grund wurde die Injektionszeit für Honigproben auf 240 Sekunden gegenüber 120 Sekunden für Standard-Lösungen und Milchproben erhöht.

Abbildung 6-34 zeigt Kalibrierkurven von Tetracyclin in Honig und in Puffer.

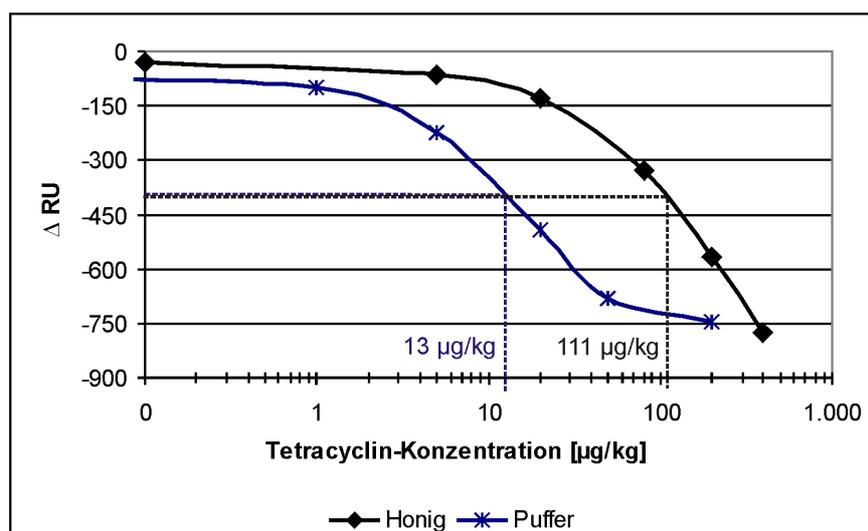


Abbildung 6-34 Vergleich von Honig und Puffer anhand von zwei Kalibrierkurven. Die Messungen wurden im Biacore Q<sup>®</sup> mit Immobilisierungsleveln von 1396 RU (Honig) bzw. 1045 RU (Puffer) „1x Biotin“ durchgeführt. Der berechnete  $\text{IB}_{50}$ -Wert für Honig (schwarz) und Puffer (blau) ist jeweils angegeben.

Die Sensitivität des Tetracyclin-Assays in Honig ist gegenüber der in Puffer etwa um den Faktor 10 schlechter ( $IB_{50}$ -Wert für Puffer = 13  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , für Honig = 111  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Auch für Quantifizierungen von Tetracyclin in Honig ist eine Matrix-Kalibrierkurve notwendig.

### **6.13.5 Bestimmung von Entscheidungsgrenze und Nachweisvermögen von Tetracyclin in Honig**

In der Entscheidung 2002/657EG der Kommission zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen [76] wird die Entscheidungsgrenze ( $CC_{\alpha}$ ) als Grenzwert beschrieben, ab dem eine Probe mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von maximal 5 % als positiv bestimmt werden kann. Das Nachweisvermögen ( $CC_{\beta}$ ) ist der Grenzwert, ab dem eine Probe mit einem Fehler von maximal 5 % nachgewiesen, identifiziert und/oder quantifiziert werden kann. Gemäß dieser Richtlinie kann die Entscheidungsgrenze bei Stoffen ohne zulässigen Höchstwert durch die Analyse von 20 Leerwertproben und die Bestimmung des dreifachen Signal-Rauschverhältnisses bestimmt werden. Dabei sollten die Proben möglichst unterschiedlicher Art sein. Das Nachweisvermögen lässt sich ebenfalls aus der Messung von 20 Leerwertproben berechnen. Es ergibt sich als das 1,64-fache der Entscheidungsgrenze.

Bei den für die Bestimmung von Entscheidungsgrenze und Nachweisvermögens verwendeten Honigen handelt es sich Proben vom Imker (Honig 9, 19 und 20), einen Honig ohne jegliche Behandlung wie Filtration, Hitzebehandlung oder Mischung mit anderen Honigen (Honig 4; vom Imker bezogen) und um Proben aus dem Einzel- bzw. Internethandel (restliche Honige). Um möglichst unterschiedliche Honigmatrizes zu verwenden, wurden sowohl Blüten- als auch Honigtauhonige (Honig 3, 10 und 15) untersucht. Von den Blütenhonigen wurden laut Etikettierung sortenreine und Honigmischungen vermessen (zur Herkunft der Honige siehe Tabelle 10-6, Seite 177).

In Tabelle 6-21 sind 21 Honige, die für die Bestimmung von  $CC_{\alpha}$  und  $CC_{\beta}$  verwendet wurden, aufgeführt. Die Bestimmung der Entscheidungsgrenze erfolgte mittels der Honige 2 bis 21. Honig 1 wurde zur Erstellung einer Kalibrierkurve verwendet. Er wies einen Messwert auf, der sehr nahe an dem berechneten Mittelwert lag und eignete sich deshalb gut zur Erstellung einer Matrix-Kalibrierkurve.

Tabelle 6-21 gibt die die bestimmten Messwerte der undotierten und gemäß Abschnitt 10.6.4.3, Seite 176 aufgearbeiteten Honigproben wieder.

Kalibrierung		Probe	Honigart	Messwert [RU]
Konzentration TC [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	Messwert [RU]	Honig 1	Honig, klar	-54,5
0	-32,1	Honig 2	Orangenblütenhonig	-43,0
5	-62,7	Honig 3	Waldhonig	-49,1
20	-130,1	Honig 4	unverarbeiteter Blütenhonig	-51,3
80	-326,0	Honig 5	Imker Auslese	-36,8
200	-566,5	Honig 6	Blütenhonig naturrein	-44,3
400	-775,6	Honig 7	Thymianhonig	-42,2
		Honig 8	Eukalyptushonig	-81,2
		Honig 9	Rapshonig	-76,4
		Honig 10	Waldhonig	-48,7
		Honig 11	ausländischer Bienenhonig	-50,8
		Honig 12	Frühlingsblütenhonig	-72,2
		Honig 13	Sommerblüten- mit Akazienhonig	-84,0
		Honig 14	Gebirgsblütenhonig	-49,2
		Honig 15	Waldhonig	-41,6
		Honig 16	Imker Honig	-47,2
		Honig 17	Sonnenblumenhonig	-43,5
		Honig 18	Akazienhonig	-82,7
		Honig 19	Sommerblütenhonig	-53,1
		Honig 20	Frühlingsblütenhonig	-43,9
		Honig 21	Zitronenhonig	-74,8
		Mittelwert	-	-55,8
		Standardabweichung	-	15,9

**Tabelle 6-21** Messwerte zur Berechnung von Entscheidungsgrenze und Nachweisvermögen. Honig 1 wurde zur Erstellung der Kalibrierkurve dotiert. Die Messung wurde im Biacore Q<sup>®</sup> mit einem Immobilisierungslevel von 1396 RU („1x Biotin“) durchgeführt.

Die ermittelten  $\Delta$  RU-Werte für die Honigproben reichten von  $-36,8$  RU für Honig 5 bis  $-84,0$  RU für Honig 13. Dabei konnte keine Korrelation zwischen Art und Höhe des Messsignals der Honige erkannt werden. So unterschieden sich beispielsweise die Werte für

die beiden Frühlingsblütenhonige (Honig 12 mit  $-72,2$  RU und Honig 20 mit  $-43,9$  RU) stark voneinander. Zwischen Blüten- und Honigtau-Honig konnte kein Unterschied gefunden werden. Der unverarbeitete Honig 4 zeigt einen  $\Delta$  RU-Wert von  $-51,3$  RU und lag damit sehr nahe am berechneten Mittelwert. Es konnte kein Unterschied des unverarbeiteten Honig zu herkömmlichen Handelsproben festgestellt werden.

Es konnte keine Beeinflussung des bestimmten  $\Delta$  RU-Wertes von Art und Herkunft der Honige festgestellt werden. Dennoch zeigten die einzelnen Proben voneinander abweichende Werte. Wie bereits bei den Rohmilchproben festgestellt, scheint auch hier die individuelle Zusammensetzung der Matrix ausschlaggebend für die beobachteten Interferenzen.

Anhand des Mittelwertes zuzüglich der 3-fachen Standardabweichung ( $-103,6$  RU) konnte eine Entscheidungsgrenze von  $14,0$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  Tetracyclin bestimmt werden. Das Nachweisvermögen wurde mit  $-129,7$  RU auf einen Gehalt von  $20,0$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  Tetracyclin berechnet.

Das berechnete Nachweisvermögen sollte in einem weiteren Lauf überprüft werden, da es bei der Bestimmung von sehr geringen Analyt-Konzentrationen häufig zu niedrig berechnet wird. Es weist in Realität eine höhere Irrtumswahrscheinlichkeit als  $5\%$  auf [183]. Aus diesem Grund wurden die Honige für die Überprüfung des realen  $\text{CC}_\beta$  nicht mit  $20,0$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  Tetracyclin (= berechneter  $\text{CC}_\beta$ ), sondern mit  $40$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  dotiert (siehe Tabelle 6-22). Die Quantifizierung erfolgte über eine Kalibrierkurve, die im Konzentrationsbereich von  $0$  bis  $400$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  Tetracyclin in Honig 1 aufgenommen wurde. Für das Nachweisvermögen wird gefordert, dass mindestens 19 der 20 Honigproben (entspricht  $95\%$ ) als positiv erkannt werden können, also oberhalb der Entscheidungsgrenze (=  $14$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  Tetracyclin) liegen. Von allen dotierten Proben wurde nur Honig 15 mit einem  $\Delta$  RU unterhalb der Kalibrierkurve gemessen und damit als falsch-negativ bestimmt. Damit war bei einer Dotierung von  $40$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  Tetracyclin die Forderung des Nachweisvermögens von einem maximalen Fehler von  $5\%$  erfüllt.

Die Dotierung für die  $\text{CC}_\beta$ -Messreihe lag jedoch so hoch, dass die anderen 19 Honige deutlich als positiv erkannt wurden. Honig 17 lag mit einem Messwert von  $-160,6$  RU entsprechend  $22,3$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  Tetracyclin noch rund  $40\%$  oberhalb der Entscheidungsgrenze. Dies bedeutet, dass die 19 Honige auch mit einer geringeren Dotierung als positiv bestimmt worden wären. Das reale Nachweisvermögen lag also unterhalb von  $40$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  Tetracyclin.

Kalibrierung		Honigproben		
Konzentration TC [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	Messwert [RU]	Probe	Messwert [RU]	Quantifizierung [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
0	-59,6	Honig 2	-253,9	50,3
5	-84,6	Honig 3	-201,2	33,8
20	-152,3	Honig 4	-275,0	57,5
80	-334,1	Honig 5	-219,4	39,3
200	-556,7	Honig 6	-235,8	44,4
400	-758,0	Honig 7	-165,2	23,7
		Honig 8	-226,2	41,4
		Honig 9	-378,4	98,6
		Honig 10	-207,6	35,7
		Honig 11	-202,8	34,3
		Honig 12	-352,5	87,3
		Honig 13	-314,2	71,9
		Honig 14	-217,7	38,7
		Honig 15	-58,0	n.b.*
		Honig 16	-208,9	36,1
		Honig 17	-160,6	22,3
		Honig 18	-343,0	83,4
		Honig 19	-199,6	33,3
		Honig 20	-282,2	60,0
		Honig 21	-302,1	67,3

Tabelle 6-22 Messwerte und Quantifizierung der mit 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Tetracyclin dotierten Honigproben zur Bestimmung von  $\text{CC}_\beta$ . Die Kalibrierung wurde in Honig 1 durchgeführt. Die Messung wurde im Biacore Q<sup>®</sup> mit einem Immobilisierungslevel von 1396 RU („1x Biotin“) durchgeführt.

\* Diese Probe konnte nicht quantifiziert werden, da ihr Messwert außerhalb der Kalibrierkurve lag.

## 6.14 Zusammenfassung der Optimierungsschritte des indirekten Assays mit *tetO* und TetR

An dieser Stelle sollen die Ergebnisse der durchgeführten Optimierungsversuche kurz zusammengefasst werden.

- Zur Regeneration der Chipoberfläche wurde SDS verwendet, da dies neben einer Lösung mit hohem Ionen-Gehalt die einzige war, die eine Regeneration der Chipoberfläche ermöglichte. Wurde mit der hochionischen Lösung regeneriert, konnte eine schlechte Wiederholbarkeit von Mehrfachinjektionen beobachtet werden. SDS wurde als eine 0,3 %ige Lösung in Laufpuffer (für 20 Sekunden) eingesetzt. Dieser wurde eine Injektion von Probenpuffer für 60 Sekunden nachgeschaltet, um eine vollständige Entfernung des SDS aus der Chipmatrix zu erreichen. Beide Lösungen wurden mit einer Flussgeschwindigkeit von 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  injiziert (Abschnitt 6.7, Seite 78).
- Für die Belegung des Sensorchips mit Operator wurde die Varianten „1x Biotin“ verwendet, da sie die höchste Belegung mit TetR ermöglichte (Abschnitt 6.8.3, Seite 87)
- Die Immobilisierung des Operators wurde durch eine Injektion einer *tetO*-Lösung mit einer Konzentration von 20 nmol/L für 10 Minuten mit einer Flussgeschwindigkeit von 4  $\mu\text{l}/\text{min}$  erreicht. Damit ließ sich ein Immobilisierungslevel von rund 1100 RU erhalten (Abschnitt 6.8.4, Seite 92).
- Als Repressor-Protein wurde die Varianten TetR(BD) gewählt, da sie eine hohe Sensitivität für den Tetracyclin-Nachweis ermöglichte (Abschnitt 6.10, Seite 100). Für die Belegung des *tetO* mit Repressor wurde sie mit einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  in Laufpuffer für 120 Sekunden injiziert.
- Rohmilchproben wurden vor der SPR-Analyse entfettet, 1:5 mit Probenpuffer verdünnt und im Wasserbad für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt, um die Matrixinterferenzen zu reduzieren. Nach Zentrifugation wurden die Proben für 120 Sekunden mit einer Flussgeschwindigkeit von 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  injiziert (Abschnitt 6.13.1, Seite 110).
- Honigproben wurden vor der SPR-Analyse 1: 10 mit Probenpuffer verdünnt, zentrifugiert und für 240 Sekunden mit einer Flussgeschwindigkeit von 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  injiziert (Abschnitt 6.13.5, Seite 118). Die Verlängerung der Probeninjektion führte zu einer verbesserten Sensitivität.

## 7 Diskussion

### 7.1 Ribosome als Bindungspartner für einen tetracyclinspezifischen SPR-Assay

Für die Isolierung von Ribosomen wurden zwei Tetracyclin-sensitive Bakterienstämme verwendet. Begonnen wurde mit *Bacillus stearothermophilus*. Es handelt sich dabei um ein grampositives, stäbchenförmiges Bakterium, das Endosporen bilden kann. Es zeigt ein Wachstumsoptimum bei 55-60 °C. Wachstumskurven ließen erkennen, dass das Bakterium bereits relativ früh von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase überging. Dies geht bei *B. stearothermophilus* mit der Bildung der von Sporen einher, die als Überlebensform des Bakteriums nur eine minimale Anzahl von Ribosomen tragen. Zudem sind sie so stabil aufgebaut, dass sie mit der French Press nicht oder nur unvollständig aufgeschlossen werden können.

Die Zellwand grampositiver Bakterien ist durch eine dicke Mureinschicht verstärkt. Gegenüber gramnegativen Bakterien ist hier deshalb davon auszugehen, dass nach dem Zellaufschluss ein hoher Anteil an nicht-aufgeschlossenen (intakten) Zellen vorlagen. Diese wurden ebenso wie die nicht aufgeschlossenen Sporen mit dem sich an den Zellaufschluss anschließenden Zentrifugationsschritt entfernt. Dies könnte eine Erklärung für die geringe Ribosomenausbeute bei der Isolierung aus *B. stearothermophilus* sein. Nach dem Wechsel auf ein gramnegatives Bakterium (*Escherichia coli*), welches nicht in der Lage ist Sporen zu bilden und eine weniger stabile Zellwand besitzt, wurden höhere Zellausbeuten und dadurch bedingt auch größere Mengen an isolierten Ribosomen erreicht.

Zur Untersuchung der Bindungsaktivität der isolierten Ribosome wurden 3 unterschiedliche Methoden verwendet. Zunächst sollten die Ribosome mit Tetracyclin-Antikörper um ein oberflächengebundenes Tetracyclin in Konkurrenz gesetzt werden (Abschnitt 6.1.2.1, Seite 55). Dazu wurde ein kommerzieller Tetracyclin-ELISA modifiziert. Eine Verdrängung der Tetracyclin-Antikörper durch die zugegebenen Ribosome hätte sich in einer Verringerung der gemessenen Farbintensität zeigen müssen. Es konnte jedoch keine Verdrängung der TC-Antikörper beobachtet werden. Als Ursache hierfür kommt neben Veränderungen der Tetracyclin-Bindungsstellen am Ribosom während der Aufarbeitung auch eine sterische Hinderung in Frage. Die Kopplung des Tetracyclins an die Oberfläche in der Mikrotiterplatte erfolgte über ein Protein-Derivat [94]. Das Ribosom könnte durch das Protein oder sogar

durch die Oberfläche selbst sterisch daran gehindert werden, mit dem Tetracyclin in Wechselwirkung zu treten. In diesem Fall wäre auch bei aktiven Ribosomen keine Bindung nachweisbar.

Deshalb wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die Bindung zwischen Ribosom und Tetracyclin ohne Kopplung eines der von einem der beiden Bindungspartner an eine Oberfläche zu beobachten. Hierzu ist die Affinitäts-Kapillarelektrophorese gut geeignet. Dabei wird die Wanderungsgeschwindigkeit eines freien Rezeptors oder Liganden im elektrischen Feld mit der Wanderungsgeschwindigkeit des gebildeten Komplexes unter gleichen Bedingungen verglichen. Diese verändert sich bei Änderung der Masse und / oder der Ladungsverhältnisse des Komplexes im Vergleich zum reinen Rezeptor.

Um einen deutlichen Unterschied der Migrationszeiten (Zeit zwischen Injektion und Detektion des Bindungspartners) zu erkennen, wurde zur Bestimmung der Bindung von Tetracyclin an die isolierten Ribosome die Wanderungsgeschwindigkeit des reinen Tetracyclins mit der von Tetracyclin unter Zugabe von Ribosomen verglichen (Abschnitt 6.1.2.2, Seite 58). Dabei sollte es alleine schon aufgrund der starken Massenänderung durch die Bildung des Tetracyclin-Ribosomen-Komplexes zu einem deutlichen Unterschied der Migrationszeiten kommen. Der tatsächlich beobachtete Unterschied, bei Verwendung der Ribosome sowohl aus *B. stearothermophilus*, als auch aus *E. coli* war jedoch gering. Die Ribosome zeigten nur eine geringe Bindungsaktivität.

Um die Vermutung der sehr geringen Bindung von Tetracyclin an die isolierten Ribosome zu bestätigen, wurde eine weitere Messmethode angewendet. Dazu wurden die Ribosome zusammen mit dem Tetracyclin inkubiert (Abschnitt 6.1.2.3, Seite 60). Anschließend erfolgte die Trennung der freien Tetracycline von den am Ribosom gebundenen entweder durch einen Ultrazentrifugationsschritt oder durch Filtration durch eine semipermeable Membran mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa. Die Konzentration der freien Tetracycline wurde mittels HPLC bestimmt. Bei Versuchen mit Ribosomen aus *E. coli* verblieben 100 % des eingesetzten Tetracyclins in freier Form, was bedeutet, dass keine Bindung an die Ribosome stattgefunden hat. Die Ribosome aus *B. stearothermophilus* zeigten bei einem molaren Verhältnis von Tetracyclin zu Ribosom von 1:3 eine Bindung von ca. 20 % des eingesetzten Tetracyclins. Bedenkt man jedoch, dass das Ribosom alleine auf der 30S-Untereinheit bereits 6 Bindungsstellen aufweist [44], so ist eine Bindung von nur 20 % sehr gering.

Da die zur Isolierung verwendeten Bakterien tetracyclinsensitiv waren, lassen die hier festgestellten schlechten Bindungen zwischen Tetracyclin und Ribosom nur den Schluss zu,

dass die Ribosome während der Aufarbeitung beschädigt wurden. Da jedoch kein Hinweis auf grobe Fehler bei der Isolierung gefunden werden konnte, und die Entwicklung eines tetracyclinspezifischen Assays auf der Basis der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) mit Ribosomen einer so geringen Aktivität nicht durchführbar ist, wurden die Versuche hierzu eingestellt.

## **7.2 Versuche zur Derivatisierung des Tetracyclins für einen indirekten SPR-Assay**

Für die Entwicklung eines indirekten SPR-Assays muss ein Tetracyclin oder ein Tetracyclin-Derivat an die Oberfläche eines Sensorchips gekoppelt werden (Abschnitt 5.1, Seite 47). Eine zu analysierende Probe wird mit einem tetracyclinspezifischen Bindungspartner gemischt und über den Sensorchip gegeben. Das immobilisierte Tetracyclin konkurriert mit dem in der Probe enthaltenen Tetracyclin um die Bindungsstellen am Bindungspartner, so dass weniger Bindungspartner an der Chipoberfläche binden kann, je mehr Tetracyclin in der Probe enthalten ist. Das immobilisierte Tetracyclin muss so stabil an die Chipoberfläche immobilisiert werden, dass es auch nach mehreren Messzyklen mit anschließender Regeneration kein Ablösen oder eine Veränderung zeigt.

Die in Abschnitt 6.1.3 (Seite 61) dargestellten Ergebnisse zeigen, dass kein stabiles Tetracyclin-Derivat durch die Kopplung an 12-Methylamino-Laurinsäure oder Pyrrolidin hergestellt werden konnte. Diese Beobachtung deckt sich mit den Untersuchungen von Bernadelli et al. [170]. Sie beschreiben die Löslichkeit und die Stabilität von Tetracyclin-Derivaten mit unterschiedlichen Aminosäuren in Wasser. Dabei waren die Derivate spätestens innerhalb von 24 Stunden zersetzt. Da bei einer SPR-Analyse wässrige Lösungen verwendet werden, kann ein in Wasser nicht stabiles Derivat nicht eingesetzt werden.

Märtlbauer [93] und Lang et al. [92] beschreiben die eingesetzte Reaktion von Tetracyclin zur Kopplung des Antibiotikums an Proteine. Dieses Derivat koppeln sie für einen tetracyclinspezifischen ELISA an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte. In einem indirekten SPR-Assay hat die Verwendung eines Protein-Derivats jedoch den Nachteil, dass das Tetracyclin für einen Bindungspartner sterisch nur schwer zugänglich ist. Die Tetracyclin-Bindungsstelle sowohl am Ribosom [48], als auch am Tetracyclin-Repressor [57] (den beiden in dieser Arbeit verwendeten Tetracyclin-Bindungspartnern) liegt jeweils relativ weit innerhalb des Moleküls. Für eine Bindung zu einem oberflächengebundenen Tetracyclin

sollte dieses möglichst exponiert sein. Bei der Bindung eines über ein Protein an eine Oberfläche gebundenen Tetracyclins ist von einer sterischen Behinderung auszugehen. Aufgrund dieser Überlegung wurde für Derivatisierungsversuche ein langkettiges Molekül gewählt, wodurch ein Abstand von der Oberfläche erreicht werden sollte. Damit sollte eine Bindung des Tetracyclins auch an eine schwer zugängliche Bindungsstelle des Bindungspartner möglich sein. Da die Derivatisierungs-Versuche jedoch kein verwendbares Tetracyclin-Derivat erbrachten, konnte kein indirekter SPR-Assay entwickelt werden.

### 7.3 SPR-Biosensor mit dem Tetracyclin Operator-Repressor-System

Für die Entwicklung eines tetracyclinspezifischen Screening-Assays wurde die Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie verwendet. Diese Art Biosensor besitzt den Vorteil, dass Rezeptor/Ligand-Wechselwirkungen in Echtzeit beobachtet werden können. Dadurch ließ sich beispielsweise die Immobilisierung der Operator-DNA auf der Chipoberfläche beobachten, so dass die Injektion der *tetO*-Lösung bei dem gewünschten Immobilisierungslevel abgebrochen werden konnte.

Die Analysen mit einem SPR-Biosensor können vollautomatisiert durchgeführt werden. Dies ermöglicht die Bewältigung hoher Probenzahlen. Daher sind SPR-Biosensoren für Screening-Assays sehr gut geeignet.

#### 7.3.1 Vergleich der untersuchten Assay-Formate

Ziel dieser Arbeit war der Vergleich unterschiedlicher Assay-Formate, die sich mit dem Tetracyclin-Operator-Repressor-System entwickeln lassen. Um diese Fragestellung zu klären, wurden drei mögliche Assay-Varianten getestet. Dabei stellte sich das direkte Format (Abschnitt 6.5, Seite 70) als das mit der schlechtesten Nachweisempfindlichkeit heraus. Hier konnte Tetracyclin nur im Konzentrationsbereich von mehreren mg/L in Puffer-Lösungen nachgewiesen werden. Der MRL von Tetracyclin in Milch liegt jedoch bei 100 µg/kg.

Es ist bekannt, dass das SPR-Signal neben einer Änderung der Masse auf dem Sensorchip auch durch die Veränderung der Konformation eines immobilisierten Proteins beeinflusst werden kann, sofern sich dessen Dichte und damit die dielektrischen Eigenschaften verändern [184; 185; 186; 187]. Gestwicki et al. [184] nutzten dies für den Nachweis von Molekülen mit geringer Masse wie z.B. Maltose oder sogar Calcium-Ionen aus. Die durch die Bindung des positiv geladenen Tetracyclin-Magnesium-Komplexes im TetR ausgelöste Konformations-

änderung könnte ein Absinken des Messsignals bewirken, was der Änderung des Signals aufgrund der Massenerhöhung entgegenwirkt. Als Folge davon würde der gemessene  $\Delta RU$  kleiner ausfallen als aufgrund der gebundenen Tetracyclin-Moleküle zu erwarten wäre. Dies könnte zusätzlich zum geringen Molekulargewicht von Tetracyclin ein Grund für die schlechte Nachweisempfindlichkeit im direkten Assay-Formates sein.

Die Verwendung des Tet-Repressors zur Signalverstärkung in den beiden anderen Assay-Formaten brachte eine wesentlich bessere Nachweisempfindlichkeit. Hier wurde das Tetracyclin nicht mehr direkt nachgewiesen, sondern dazu verwendet, ein Molekül mit wesentlich höherer Masse vom Chip abzulösen (indirekter Assay mit *tetO* und TetR) bzw. die Bindung dieses Moleküls an die Chipoberfläche zu verhindern (indirekter Gleichgewichts-Assay). Die Signaländerung wird also durch den rund 100-fach schwereren TetR verursacht. Die Änderung der Konformation des Repressor-Proteins durch die Bindung von Tetracyclin spielt in diesen Assay-Formaten keine Rolle, da TetR mit veränderter Konformation vom Chip abgewaschen bzw. dessen Bindung an den Chip verhindert wird. Die Signaländerung in beiden Fällen wird ausschließlich durch das Protein mit der ursprünglichen Konformation hervorgerufen.

Für den indirekten Assay mit *tetO* und TetR, welcher zur Entwicklung des tetracyclinspezifischen Screening-Assays verwendet wurde, muss für jeden Zyklus zu Beginn das Repressor-Protein injiziert werden. TetR ist kein käufliches Reagenz, sondern muss aus Bakterien isoliert werden. Daher stellt die Tatsache, dass der Repressor im Zuge des Tetracyclin-Nachweises verbraucht wird, einen Nachteil dar. Jedoch wird durch die Injektion des frischen Repressor-Proteins für jeden Zyklus eine immer unveränderte Oberfläche zur Bindung des Analyten gewährleistet. Die Bindungsaktivität des Biomolekularen Erkennungspartners kann nicht durch die Beanspruchung des Sensorchips (wie z.B. durch Regenerationsschritte) verringert werden. Dies stellt einen Vorteil dar, der den Nachteil des Verbrauches von TetR aufwiegt.

### **7.3.2 Charakteristika des indirekten Assays mit *tetO* und TetR**

Bei der Interpretation der Ergebnisse mit dem hier vorgestellten Assay-Format sollte bedacht werden, dass die Vorgänge auf der Chipoberfläche sehr komplex sind. Beobachtungen bzw. Ergebnisse bezüglich des Operator-Repressor-Systems, die unter *in vivo* oder unter *in vivo*-

ähnlichen Bedingungen erhalten wurden, können nicht ohne Weiteres auf das unter anderen Bedingungen ablaufende Testsystem übertragen werden. Daher sind einfache Denkmodelle zur Interpretation der beobachteten Phänomene nicht geeignet. Im Folgenden soll die Komplexität des Assays erläutert werden.

Bei der Bildung des [*tetO*\*TetR]-Komplexes kann nur während der Injektion von TetR ein Gleichgewicht erreicht werden. Sobald diese Injektion beendet ist und Laufpuffer über den Chip fließt, setzt eine langsame Dissoziation ein. Freigesetztes TetR wird permanent aus der Flusszelle entfernt. Auch bei der Reaktion  $[\text{TC-Mg}]^+ + [\textit{tetO}^*\text{TetR}] \rightarrow [\text{TetR}^*\text{TC-Mg}] + [\textit{tetO}]$  wird kein Gleichgewicht erreicht, da die Komponente [*TetR*\*TC-Mg] aus der Flusszelle entfernt wird, so dass eine Rückreaktion kaum stattfinden kann.

Für den indirekten Assay mit *tetO* und TetR wurde ein Chip mit einer sehr komplex aufgebauten Oberfläche verwendet. An der Goldschicht wurde zunächst über einen Linker (chemische Struktur ist Betriebsgeheimnis der Firma Biacore) Carboxymethyldextran (CM) gebunden. An dieses wiederum ist Streptavidin gebunden (= SA-Chip), das im Weiteren mit dem biotinylierten *tetO* immobilisiert wurde. Erst hieran wurde der biomolekulare Bindungspartner des Analyten Tetracyclin gebunden. Bei diesem Aufbau der Chipoberfläche ist davon auszugehen, dass nicht alle Bindungsstellen eines Moleküls zur Komplexierung mit dem jeweiligen Bindungspartner zur Verfügung stehen. Einige Moleküle sind wahrscheinlich durch Einbettung in die Chipmatrix sterisch an einer Bindung mit dem jeweiligen Bindungspartner gehindert.

Es ist möglich, dass beim Annealing der Oligonukleotide zur Herstellung der Operator-Varianten nicht die statistisch berechneten Verhältnisse entstanden sind. Möglicherweise sind auch noch biotinylierte Einzelstränge in der Lösung enthalten, die zwar den im Sensorgramm beobachteten Immobilisierungslevel beeinflussen, jedoch zur Bindung eines Repressor-Moleküls nicht in der Lage sind. Es bestand keine Möglichkeit, das korrekte oder vollständige Annealing der Oligonukleotide zu überprüfen. Es können zwar Berechnungen bezüglich der Bindungsverhältnisse auf der Chipoberfläche durchgeführt werden, diese sind jedoch ungenau, da ihnen eine 100 %ige Verfügbarkeit und Bindungsfähigkeit beider beteiligter Bindungspartner zugrunde liegt, die nicht gewährleistet werden kann.

Myszka et al. [188] beschreiben die Chipmatrix selbst als vernachlässigbar für die Bindung des Analyten zum Rezeptor, wenn sie sehr dünn ist (z. B. eine Carboxymethyldextran-Oberfläche). Der hier verwendete Chip besitzt eine Carboxymethyldextran-Schicht, an die

Streptavidin kovalent immobilisiert wurde (SA-Chip), worauf wiederum der *tet*-Operator und daran der Tet-Repressor gebunden wurden. Bei einer Chipoberfläche dieses Aufbaus muss von einer Beeinträchtigung der Bindungskinetik ausgegangen werden [189; 190], da das Tetracyclin-Molekül auf seinem Weg hin zur Bindungsstelle an TetR von den anderen Moleküle beeinflusst / behindert werden kann.

Innerhalb der Flusszelle muss laut Myszka et al. [188] bereits bei Flussgeschwindigkeiten von  $\leq 100 \mu\text{l}/\text{min}$  von einem laminaren Flussprofil ausgegangen werden, so dass an der Chipoberfläche eine geringere Flussgeschwindigkeit vorherrscht als in der Mitte der Flusszelle (siehe Abbildung 7-1, A). Die Analyten in der langsam fließenden Schicht binden an den Bindungspartner. Da in dieser Schicht die Lösung mit dem Analyten jedoch nur sehr langsam ausgetaucht wird, gelangt kein zusätzlicher Analyt in die Nähe des Bindungspartner. Die Konzentration des für eine Bindung zur Verfügung stehenden Analyten an der Chipoberfläche verringert sich. Neuer Analyt gelangt nun hauptsächlich durch Diffusionsvorgänge aus der Schicht mit einer höheren Flussgeschwindigkeit in die Nähe des Bindungspartners (siehe Abbildung 7-1, B). Letztlich wird dadurch bedingt die Diffusionsgeschwindigkeit des Analyten zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion mit dem Bindungspartner.

Bei einer Flussgeschwindigkeit von nur  $5 \mu\text{l}/\text{min}$  – wie sie für den hier entwickelten Assay verwendet wurde – muss von einer ausgedehnteren Schicht mit einer noch geringeren Flussgeschwindigkeit an der Chipoberfläche ausgegangen werden. Möglicherweise bildet sich am Rand der Flusszelle eine Schicht aus, in der die Lösung praktisch nicht mehr fließt [191]. Hier würde sich reiner Laufpuffer (ohne Tetracyclin) befinden, da das Gerät zwischen den einzelnen Zyklen mit sehr hohen Flussgeschwindigkeiten Puffer durch die Flusszellen spült. In diesem Fall würden die Wechselwirkungen innerhalb dieser Schicht ausschließlich aufgrund von Diffusionsvorgängen zustande kommen. Dass es auf der Chipoberfläche trotzdem zu einer Bindung von TetR an *tetO* und daran anschließend auch zu einer Bindung von Tetracyclin an den Repressor kommt ist grundlegend für den Nachweis von Tetracyclin im entwickelten Assay. Es stellt sich jedoch die Frage, ob eine Erhöhung der Flussgeschwindigkeit der Probeninjektion bei gleich bleibenden Kontaktzeit eine verbesserte Nachweisempfindlichkeit bewirken würde.

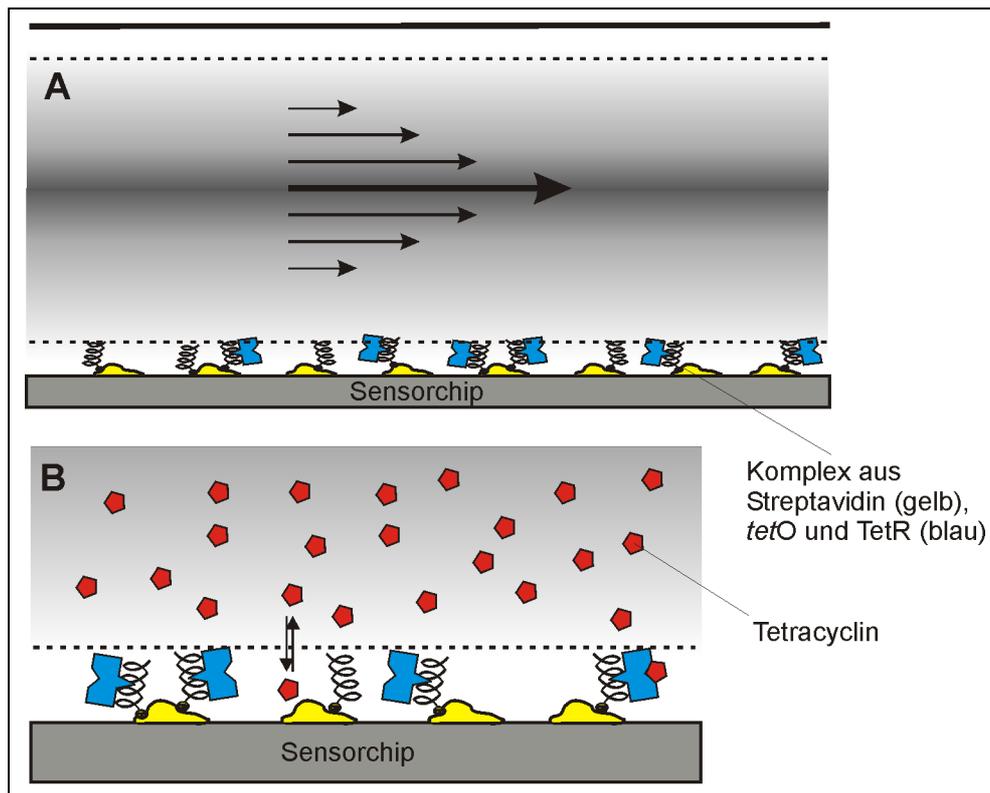


Abbildung 7-1 Schematische Darstellung des von Myszka [188] beschriebenen laminaren Flussprofils innerhalb einer Flusszelle auf den entwickelten Tetracyclin-Assay adaptiert. A: Durch das laminare Flussprofil bildet sich an den Rändern der Flusszelle eine Schicht aus, in der nur eine sehr geringe Flussgeschwindigkeit herrscht (durch gestrichelte Linien angedeutet). B: Durch den nur sehr langsamen Austausch der Lösung in dieser Schicht kann der Analyt nur durch Diffusionsvorgänge (durch einen Doppelpfeil dargestellt) zum Bindungspartner gelangen.

Aufgrund der hier dargestellten Komplexität der während der Messung ablaufenden Prozesse, können die in dieser Arbeit diskutierten Erklärungsansätze nur als Möglichkeiten gesehen werden.

### 7.3.3 Repressor-Bindung an Operator-DNA bei unterschiedlichen Belegungsdichten

Für die Bindung des Repressor-Proteins auf der Sensorchipoberfläche konnte eine starke Abhängigkeit von der Immobilisierungshöhe mit Operator beobachtet werden (Abschnitt 6.8.1, Seite 82). Mit steigender *tetO*-Belegungsdichte befanden sich auf dem Chip mehr Bindungsstellen für den Repressor, so dass von diesem auch mehr gebunden werden konnte. Bei Sättigung der Streptavidin-Oberfläche mit biotinyliertem *tetO* zeigte sich jedoch, trotz der höchsten Anzahl an Bindungsstellen für TetR, eine geringste prozentuale Belegungsdichte als bei niedriger belegten Flusszellen (siehe Abbildung 7-2). Die Ursache hierfür sind sterischen Hinderungen der TetR-Moleküle untereinander. Bei dieser Flusszelle lagen die möglichen Bindungsstellen für TetR so dicht beieinander, dass sie nicht alle mit TetR abgesättigt werden

konnten. Bei geringeren Belegungsdichten kam es nicht zu sterischen Hinderungen, so dass hier die Beladung des chipgebundenen Operators mit Repressor eine lineare Abhängigkeit zeigte.

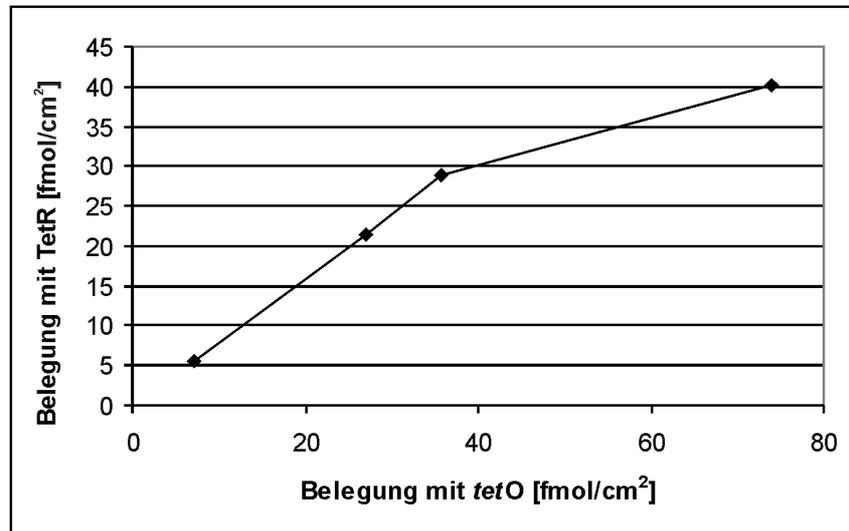


Abbildung 7-2 Belegung des Operators mit Repressor bei unterschiedlichen *tetO*-Immobilisierungsleveln

Die mit ca. 80 % unvollständige Belegung von *tetO* mit TetR (Tabelle 6-9, Seite 84) kann verschiedene Ursachen haben. Essentiell für die Bindung des Repressors an den Operator ist ein Doppelstrang, da die Basen 2, 3 und 4 des einen Stranges und die Base 5 des Gegenstranges [57] benötigt werden. Unvollständig annealate oder einzelsträngige DNA kann kein TetR binden. Sollte ein DNA-Strang in der palindromen Sequenz gebrochen sein, kann er den Repressor nicht mehr binden.

Bei einer Chipoberfläche mit dem hier vorliegenden Aufbau (Carboxymethyldextran mit daran gebundenem Streptavidin, welches die biotinylierte DNA trägt) ist auch von einer teilweisen sterischen Behinderung der TetR-Bindungsstellen durch andere Moleküle der Oberfläche auszugehen.

#### 7.3.4 $\Delta$ RU bei unterschiedlicher Repressor-Belegung

Die Bindung von TetR auf der Chipoberfläche war von mehreren Faktoren abhängig. Sie wurde stark durch die Immobilisierungshöhe der Operator-DNA beeinflusst. In Tabelle 6-9 (Seite 84) wurde der Zusammenhang von TetR-Belegung und unterschiedlichen Immobilisierungsleveln von *tetO* betrachtet. Es konnte eine annähernd lineare Abhängigkeit zwischen *tetO*-Belegung und TetR-Bindung festgestellt werden (siehe Abbildung 6-15, Seite 90). Bei

einer Verzehnfachung der *tetO*-Konzentration auf der Chipoberfläche wurde auch die TetR-Bindung verzehnfacht.

Eine weitere Möglichkeit, die vom Chip gebundene TetR-Menge zu beeinflussen, bot die Konzentration der injizierten TetR-Lösung. Bei vorgegebener *tetO*-Immobilisierung war die verursachte Änderung der TetR-Beladung jedoch gering. Durch die Erhöhung der Konzentration um den Faktor 100 konnte eine nur um den Faktor 0,8 höhere TetR-Bindung erreicht werden (siehe Tabelle 6-17, Seite 96).

Die für die Messung von Tetracyclin-Rückständen genutzte Ablösung von TetR von der Chipoberfläche ( $\Delta$  RU) ließ sich durch die auf den Chip aufgebrauchte TetR-Menge beeinflussen. So war der  $\Delta$  RU für die Injektion von z.B. 20  $\mu\text{g/L}$  Tetracyclin bei höherer *tetO*-Immobilisierung und damit verbunden erhöhter TetR-Bindung deutlich höher. Wurde jedoch die TetR-Menge auf dem Chip bei konstanter *tetO*-Belegung durch die Konzentration der injizierten TetR-Lösung beeinflusst, zeigte sich ein Abfall der Signalintensität mit steigender TetR-Menge (Tabelle 7-1).

Beide Phänomene konnten bei unterschiedlichen *tetO*-Immobilisierungsleveln in beiden SPR-Spektrometern (Biacore 3000<sup>®</sup> und Biacore Q<sup>®</sup>) reproduziert werden.

<i>tetO</i> gebunden [RU]	injizierter TetR [ $\mu\text{mol/L}$ ]	TetR gebunden [ $\text{fmol/cm}^2$ ]	$\Delta$ RU bei 20 $\mu\text{g/L}$ Tetracyclin [ $\text{fmol/cm}^2$ ]	Beeinflussung der TetR-Menge durch
208,6	1	5,5	4,3	
802,5	1	21,3	15,7	unterschiedliche <i>tetO</i> -Level
1059,5	1	28,9	20,8	
2190,9	1	40,3	30,2	
327,8	0,1	5,2	4,4	
327,8	1	5,5	4,2	unterschiedliche TetR- Konzentration
327,8	5	5,9	4,0	
327,8	10	6,1	3,7	

**Tabelle 7-1** Effekt der TetR-Bindung auf den resultierenden  $\Delta$  RU durch Injektion von 20  $\mu\text{g/L}$  Tetracyclin. Bei der oberen Messreihe erfolgte die Variation der TetR-Bindung durch Erhöhung der Operatormenge auf dem Chip (Biacore Q<sup>®</sup>), bei der unteren Messreihe durch unterschiedliche Konzentrationen der injizierten TetR-Lösung (Biacore 3000<sup>®</sup>).

Im Folgenden wird diskutiert, wie man die Erhöhung des  $\Delta$  RU bei steigendem *tetO*-Immobilisierungslevel und das Absinken des  $\Delta$  RU bei Verwendung höher konzentrierter TetR-Lösungen erklären könnte.

### **Höherer $\Delta$ RU bei steigender *tetO*-Immobilisierung**

Bei der Flusszelle handelt es sich um einen 3-dimensionalen Raum, der an einer „Wandung“, nämlich an der Chipoberfläche, die Möglichkeit zur spezifischen Bindung der Moleküle bietet. Nur für die Moleküle der über den Chip fließenden Lösung, die in die Nähe der Chipoberfläche gelangen, besteht die Möglichkeit zur Bindung. Dieser Anteil liegt bei ca. 3 % des sich in der Lösung befindlichen Analyten [192].

Theoretisch ergeben sich nun mehrere Möglichkeiten, die Anzahl der miteinander wechselwirkenden Moleküle und damit den resultierenden  $\Delta$  RU zu erhöhen. Eine Lösung mit erhöhter Tetracyclin-Konzentration weist eine höhere Oberflächen-Dichte dieser Moleküle auf. Daher können mehr Tetracyclin-Moleküle mit TetR auf der Chipoberfläche wechselwirken und diesen verstärkt ablösen. Dieser Vorgang ist grundlegend für die Quantifizierung des Tetracyclins mit dem entwickelten Assay. Die Anzahl der wechselwirkenden Moleküle kann aber auch erhöht werden, indem die Konzentration des Reaktionspartners des Tetracyclins, nämlich von TetR erhöht wird. Die Folge ist ein stärker ausgeprägtes  $\Delta$  RU mit steigender TetR-Menge auf dem Chip, wie es in Tabelle 7-1 dargestellt ist.

### **Geringeres $\Delta$ RU bei Verwendung höher konzentrierter TetR-Lösungen**

Der Tet-Repressor ist aus zwei identischen Untereinheiten aufgebaut, von denen jede eine Bindungsstelle für Tetracyclin aufweist. Das Ablösen des Repressors vom Operator verläuft vermutlich in zwei Schritten. Die Anbindung des ersten Tetracyclin-Moleküls verringert die Bindungsaffinität zum Operator um den Faktor 100-1.000, und die Bindung des zweiten Tetracyclins verringert die Affinität noch einmal um das  $10^4 - 10^7$ -fache [57]. Nach der Bindung nur eines Tetracyclin-Moleküls verbleibt rechnerisch eine Bindungsaffinität von  $10^6$  bis  $10^7$  L/mol. Diese ist möglicherweise ausreichend, um ein Ablösen des Repressors vom Operator zu verhindern. Dann wäre die Bindung eines zweiten Tetracyclins nötig, um eine sichtbare Signaländerung hervorzurufen. Die Anzahl der TetR-Moleküle auf der Chipoberfläche mit einem gebundenen Tetracyclin würde mit steigender TetR-Menge auf dem Chip größer werden. Also wäre bei einer höheren TetR-Belegung mehr Tetracyclin nötig, um die gleiche Menge TetR abzulösen. Als Folge davon würden sich bei steigender

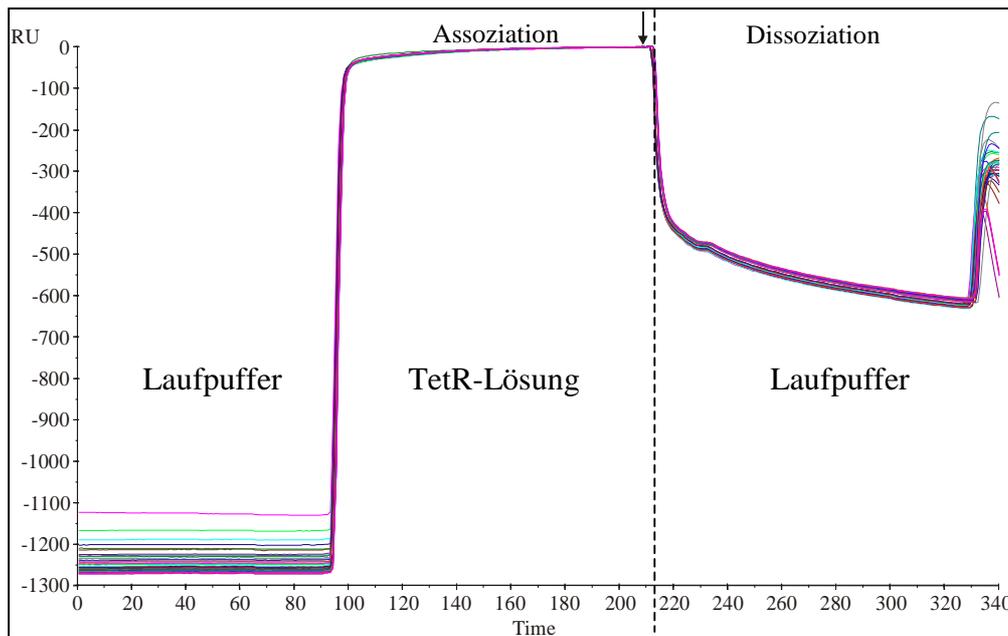
Konzentration der injizierten TetR-Lösung geringere  $\Delta$  RU-Werte beobachten lassen (siehe Tabelle 7-1).

In Tabelle 7-1 sind zwei gegenläufige Effekte zu erkennen. Der  $\Delta$  RU-Wert steigt mit steigenden TetR-Bindung aufgrund der höheren *tetO*-Belegung, fällt jedoch ab, wenn die TetR-Bindung durch Injektion von höher konzentrierten TetR-Lösungen verursacht wurde. Dieser Widerspruch könnte durch eine Überlagerung der beiden beschriebenen Effekte verursacht werden. Die Steigerung des  $\Delta$  RU mit steigender Operator-Belegung tritt sehr deutlich hervor. Sie könnte die Verringerung des  $\Delta$  RU-Wertes durch die nicht vollständige Ablösung des Repressors bei Bindung eines einzigen Tetracyclin-Moleküls überdecken. Bei Überlagerung beider Effekte wäre nur die Erhöhung des  $\Delta$  RU-Wertes mit steigender TetR-Menge auf dem Chip zu beobachten, unabhängig davon, wie diese erreicht wurde.

### **7.3.5 Zunahme der Repressor-Bindung während einer Messreihe**

In Abschnitt 6.9.4 (Seite 98) wurde beschrieben, dass sich die Repressor-Bindung innerhalb einer Messreihe erhöht und sie sich asymptotisch einer maximalen Bindung annähert (siehe Abbildung 6-21, Seite 99 und Abbildung 6-22, Seite 100).

Ein direkter Vergleich aller Sensorgramme einer Messreihe, die so übereinander gelegt wurden, dass sie Am Ende der TetR-Injektion „normiert“ wurden ist Abbildung 7-3 dargestellt. Es zeigt sich, dass sich die Sensorgramme am stärksten in der Assoziation des Repressors an den Operator unterscheiden. Dies wird dadurch deutlich, dass bei „normiertem“ Assoziationslevel ein stark unterschiedlicher RU-Wert zum Zeitpunkt vor der Injektion der TetR-Lösung resultiert. Die Änderung des Brechungsindex nach der TetR-Injektion und Dissoziation verhält sich bei allen Injektionen der Messung sehr ähnlich.



**Abbildung 7-3** TetR Injektionen einer Messreihe mit stark ansteigender TetR-Bindung (gezeigt ist ein Ausschnitt aus den Sensorgrammen, der den Schritten 1-3 der Abbildung 6-10, Seite 76 entspricht). Alle Sensorgramme wurden am Ende der TetR-Injektion übereinander gelegt („normiert“), was durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet ist.

Das Phänomen der ansteigenden TetR-Bindung wurde in beiden verwendeten SPR-Geräten beobachtet und war besonders stark bei frisch mit *tetO* belegten Chips und bei Chips nach einer kurzen Lagerung außerhalb des Gerätes ausgeprägt. Im Folgenden sollen mögliche Ursachen diskutiert werden:

- a) *Es kommt zu einer Bindung von Anteilen des injizierten Tet-Repressors an den Wandungen der zur Flusszelle führenden Kapillaren oder der Injektionsnadel.*

Da mit jeder weiteren Injektion von TetR immer mehr Bindungsstellen in den Kapillaren besetzt werden, steigt die Konzentration der am Sensorchip ankommenden TetR-Lösung mit jeder Injektion, was zu einem Anstieg der TetR-Bindung führen würde. Es gibt jedoch zwei Argumente, die gegen diese Überlegung sprechen. Zum einen wird am Ende jedes Zyklus zur Regeneration 0,3 % SDS in Laufpuffer (w/v) injiziert. Wenn diese Injektion ausreicht, um den Komplex [*tetO*\*TetR] zu lösen, sollte dadurch auch das an die Wandungen gebundene Protein abgelöst werden. Damit wären die Bindungsstellen wieder frei und die Konzentration der TetR-Lösung, die auf dem Sensorchip ankommt, reproduzierbar. Als zweites Argument gegen diese Theorie steht die schnelle Absättigung der Chipoberfläche mit TetR (siehe Abschnitt 6.9.2, Seite 94). Es ist unlogisch, dass eine Erhöhung der Konzentration der injizierten TetR-Lösung von 0,1 auf 10  $\mu\text{mol/L}$  nur 67 RU Unterschied macht, wohingegen die

langsame Bindung von TetR an Wandungen im System eine Änderung von mehr als 100 RU (siehe Abbildung 6-21, Seite 99) ausmachen soll, wie sie bei manchen Messreihen als Anstieg der TetR-Bindung beobachtet werden konnte.

- b) *Die Moleküle an der Chipoberfläche müssen sich in dem erhöhten Fluss (0,5 µl/min während der Standby-Phase gegenüber 5 µl/min während der Messreihe) neu ausrichten. Dabei werden mehr tetO-Moleküle für die Bindung mit dem Repressor freigelegt.*

Bei dem verwendeten Sensorchip SA befindet sich auf der Goldschicht eine Schicht aus Carboxymethyl-dextran (CM). An den linearen CM-Molekülen wurde Streptavidin kovalent immobilisiert, an welchem für diese Arbeit der biotinylierte Operator angebunden wurde. Diese Oberfläche ist vor allem durch den „bürstenförmigen“ Aufbau der linearen CM-Moleküle sehr flexibel. Die Erhöhung der Flussgeschwindigkeit führt möglicherweise zu einem Ausrichten der CM-„Fäden“ - und damit letztlich auch des Operators - in der fließenden Pufferlösung. Dabei könnten zuvor verdeckte tetO-Moleküle freigelegt werden. Dies würde zu einer höheren TetR-Bindung führen. Es ist allerdings wenig plausibel, dass der Vorgang des Ausrichtens über mehr als 40 Zyklen – was rund 10 Stunden entspricht – andauern soll.

- c) *Die Chipoberfläche quillt auf und stellt somit mehr tetO-Moleküle für die Bindung mit dem Repressor zur Verfügung.*

Auch durch einen Quell-Vorgang würden im Laufe einer Messreihe mehr Bindungsstellen für TetR zu Verfügung gestellt. Aber auch für diese Überlegung existieren Gegenargumente. Das Phänomen der ansteigenden TetR-Bindung trat nicht nur bei neu belegten Chips oder nach Wiedereinbau nach trockener Lagerung auf, sondern auch dann, wenn eine Messreihe am Tag zuvor beendet wurde, und der Chip sich über Nacht im Gerät bei einem Fluss von 0,5 µl/min befand. Der Chip hätte also über Nacht seinen gequollenen Zustand wieder verlieren müssen trotz der Tatsache, dass er sich weiterhin in Puffer befand.

Sas Phänomen scheint abhängig von der Flussrate unmittelbar vor einer Messreihe zu sein. Wurde der Chip unmittelbar vor der Messreihe durch Erhöhung der Flussrate des Laufpuffers von dem Standby-Fluss von 0,5 µl/min auf 5 µl/min für mindestens 2 Stunden konditioniert, war ein deutlich geringerer Anstieg der TetR-Bindung zu beobachten (siehe Abbildung 6-22,

Seite 100). Durch eine Steigerung der Flussrate zur Konditionierung von 5 auf 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  zeigte sich keine weitere Verbesserung.

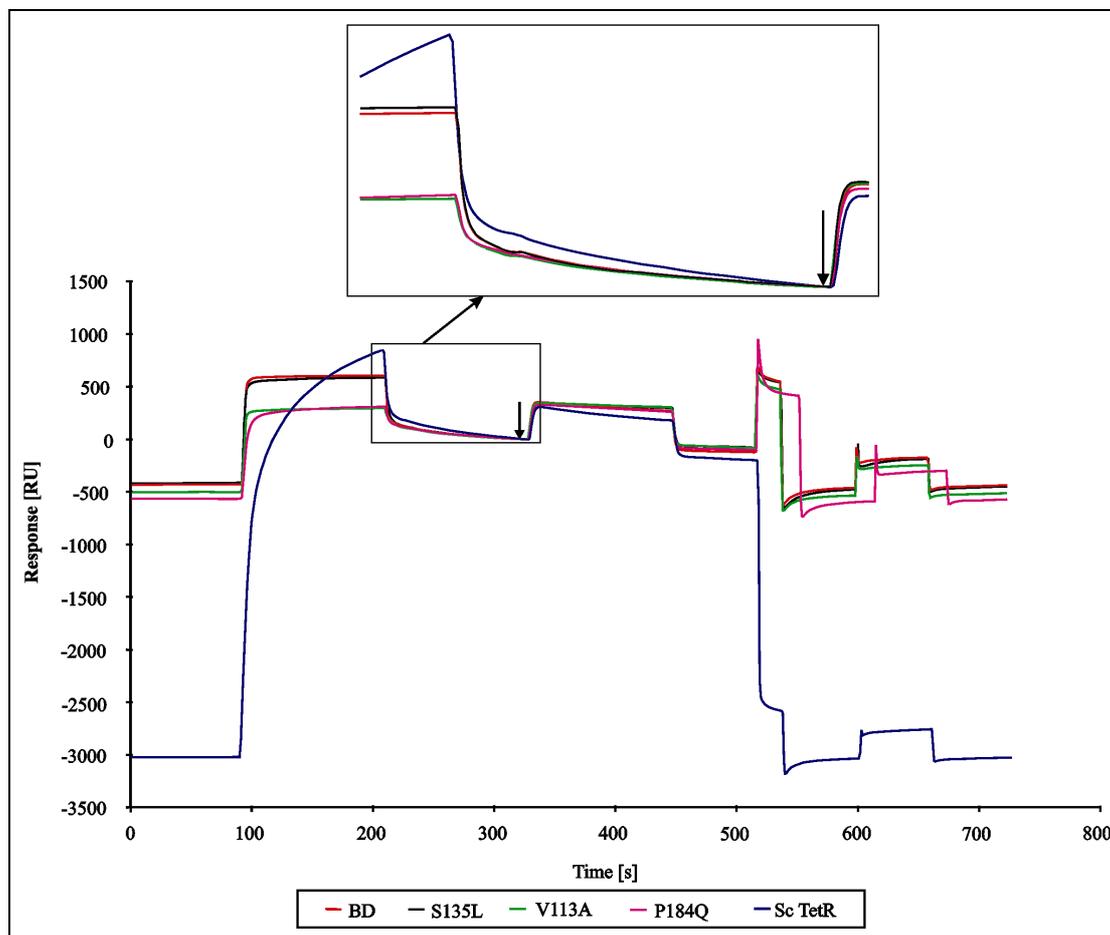
Welcher Vorgang zum Anstieg der TetR-Bindung während einer Messreihe führte, konnte nicht geklärt werden. Hier sollten weitere Untersuchungen folgen.

### 7.3.6 TetR-Varianten

In dieser Arbeit wurden 5 unterschiedliche Tetracyclin-Repressor-Proteine untersucht. Dabei wurden mit dem TetR(BD) zwei Varianten mit verbesserter Stabilität (P184Q und scTetR) und zwei mit verbesserten Bindungseigenschaften zu Tetracyclin (S135L und V113A) verglichen. Alle Proteine wurden als Lösungen von 1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  verwendet. Dabei zeigte der single chain Repressor (scTetR) bereits bei der Bindung an den Operator ein von den anderen TetR-Varianten stark abweichendes Verhalten (siehe Abschnitt 6.10, Seite 100 und Abbildung 7-4, Seite 138). Bei dieser Variante handelt es sich um den einzigen Repressor, der nicht mehr als Dimer vorliegt. Hier wurden die beiden Untereinheiten des ursprünglichen Repressor-Proteins durch Einfügen eines 27 Aminosäuren umfassenden Peptids kovalent miteinander verknüpft. Dadurch erhöht sich das Molekulargewicht des Repressors um die Masse der 27 Aminosäuren. Jedoch war die Bindung von scTetR im Vergleich zu den anderen Varianten sehr viel stärker erhöht (Bindung von 2900 RU statt rund 500 RU der anderen Varianten), als dies durch die zusätzliche Masse der 27 Aminosäuren verursacht werden könnte. Bei Berechnung der molaren Bindungsverhältnisse von TetR an *tetO* ergab sich eine Belegung des Operators mit scTetR von über 200 %. scTetR kann also nicht ausschließlich an spezifische Bindungsstellen des Operators gebunden haben, sondern scheint sich unspezifisch an der Chipmatrix oder an sich selbst assoziiert zu haben. Interessant in diesem Zusammenhang ist jedoch, dass auch scTetR konzentrationsabhängig mit Tetracyclin wieder abgelöst werden konnte. Auch hierbei zeigte dieser Repressor ein viel größeres  $\Delta$  RU als alle anderen TetR-Varianten (siehe Abschnitt 6.10.1, Seite 101).

Der single chain Repressor wies ein stark von den anderen TetR-Varianten abweichendes Bindungsverhalten auf. Er zeigt in dem hier entwickelten Assay eine langsamere Assoziation zum *tetO* (Abbildung 7-4). Nach einer Injektionsdauer von 120 Sekunden hatte er seine maximale Bindung an den Operator noch nicht erreicht. Die anderen Varianten hingegen erreichten bereits wenige Sekunden nach Beginn der Injektion ein Plateau und damit auch ihre maximal mögliche Bindung. Die Dissoziation von scTetR war mit den anderen Varianten vergleichbar. Es ließ sich zwar ein minimal schnelleres Abdiffundieren vom Operator nach

Beendigung der Injektion erkennen, dies ist aber wahrscheinlich auf die viel höhere Belegung mit scTetR zurückzuführen.



**Abbildung 7-4** Sensorgramme, aufgenommen mit den 5 TetR-Varianten (jeweils mit einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/L}$ ) und einer Tetracyclin-Injektion von 200  $\mu\text{g/kg}$  in einem 1:10 mit Puffer verdünnten, zentrifugierten Honig im Biacore Q<sup>®</sup>. Die Stelle, an der die Sensorgramme auf gleiche Höhe gebracht wurden, ist mit einem schwarzen Pfeil markiert.

Die Induktion des Repressors durch die Anbindung von Tetracyclin ist die zentrale Reaktion für den Nachweis von Tetracyclin in dem hier vorgestellten Assay. Beim Vergleich der unterschiedlichen Repressor-Varianten wurde für die beiden Proteine mit erhöhter Stabilität P184Q und scTetR ein höherer  $\text{IB}_{50}$ -Wert bestimmt, was eine schlechtere Nachweisempfindlichkeit bedeutet (siehe Abschnitt 6.10.1, Seite 101, Tabelle 6-18, Seite 102 bzw. Tabelle 7-2). Vergleicht man die  $\text{IB}_{50}$ -Werte mit den in der Literatur beschriebenen Induzierbarkeiten der einzelnen TetR-Varianten durch Tetracyclin, so wird nur für die single chain-Variante, nicht aber für TetR P184Q eine geringere Induktionskraft angegeben (Tabelle 7-2).

TetR-Variante	$K_A$ [TC-Mg] <sup>+</sup> * [TetR] [* 10 <sup>9</sup> L/mol]	Induktionskraft [%] <sup>a)</sup>	Literatur	IB <sub>50</sub> -Wert [µg/kg]
BD	5,3	65,8	Scholz [68]	265
S135L	33,0	82,4	Scholz [68]	227
V113A	39	-	Scholz [172]	464
P184Q	-	62	Schubert [174]	1501
scTetR	-	35	Kamionka [193]	1526

**Tabelle 7-2 Bindungsaffinität  $K_A$  und Induktionskraft von Tetracyclin für unterschiedliche TetR-Varianten. In der rechten Spalte sind die in dieser Arbeit bestimmten IB<sub>50</sub>-Werte als Maß für die Induzierbarkeit der TetR-Varianten in diesem Assay angegeben. <sup>a)</sup> Die Induktionskraft wurde bestimmt, indem ein  $\beta$ -Galactosidase-Gen unter die Kontrolle des *tetO*-TetR-Systems gestellt wurde und die nach Expression bei Anwesenheit eines Tetracyclins bestimmte  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität mit der Aktivität eines nicht unter Expressionskontrolle stehenden Gens verglichen wurde.**

Die Induzierbarkeiten zeigen eine geringere Streubreite als die hier bestimmten IB<sub>50</sub>-Werte. Zwischen der höchsten und der niedrigsten Induzierbarkeit liegt ein Faktor zwei, wohingegen die bestimmten IB<sub>50</sub>-Werte um mehr als das 5-fache voneinander abweichen. Dies lässt den Schluss zu, dass die Ablösung von TetR durch den Induktor Tetracyclin in diesem Assay durch Vorgänge wie Stofftransport und Diffusion innerhalb der Flusszelle und/oder der Chipmatrix beeinflusst wird.

### 7.3.7 Kreuzreaktivitäten der Tetracycline

Die in Abschnitt 6.11 (Seite 103) dargestellten Reaktionen des Repressors TetR(BD) mit den einzelnen Tetracyclinen zeigten nur eine relativ geringe Abweichung voneinander. So konnte eine minimale Kreuzreaktivität für Oxytetracyclin mit 80 % und eine maximale für Doxycyclin mit 186 % bestimmt werden. Tabelle 7-3 Vergleicht die in der Literatur angegebenen Bindungsaktivitäten für unterschiedliche Tetracycline an den Repressor TetR(BD). Es wird deutlich, dass der Unterschied in den Bindungskonstanten zwischen den einzelnen Tetracyclinen nicht der Grund für die unterschiedlichen Kreuzreaktivitäten sein kann. Die Kreuzreaktivitäten in diesem Assay weichen nur wenig voneinander ab (siehe Tabelle 6-19, Seite 104 und Abbildung 6-24, Seite 105) wohingegen zwischen den Bindungskonstanten von Tetracyclin und Doxycyclin in der Literatur ein Faktor 30 liegt. Die Bindung von Anhydrotetracyclin zum TetR(BD) ist sogar rund 200 mal höher als die des Tetracyclins.

Tetracyclin	$K_A$ [TC-Mg] <sup>+</sup> * [TetR] [* 10 <sup>9</sup> L/mol]	Induktionskraft [%] <sup>a)</sup>	Literatur
Tetracyclin	5,3	65,8	Scholz [68]
Doxycyclin	-	97,5	Scholz [68]
Tetracyclin	-	45 <sup>b)</sup>	Henssler [194]
Doxycyclin	167,0	90 <sup>b)</sup>	Henssler [194]
Anhydrotetracyclin	1196,0	80 <sup>b)</sup>	Henssler [194]

**Tabelle 7-3 Bindungskonstanten von [TC-Mg]<sup>+</sup> an TetR(BD) und Induktionskraft unterschiedlicher Tetracycline aus der Literatur.**

<sup>a)</sup> Die Induktionskraft wurde bestimmt, indem ein  $\beta$ -Galactosidase-Gen unter die Kontrolle des *tetO*-TetR-Systems gestellt wurde und die nach Expression bei Anwesenheit eines Tetracyclins bestimmte  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität mit der Aktivität eines nicht unter Expressionskontrolle stehenden Gens verglichen wurde.

<sup>b)</sup> Die Werte wurden aus Abbildung 4 [194] abgelesen.

Die ebenfalls in der Literatur angegebene Induktionskraft der einzelnen Tetracycline – also die Fähigkeit der Tetracycline, TetR durch die verursachte Konformationsänderung vom Operator abzulösen – liegt bei den einzelnen Tetracyclinen weitaus näher beieinander (Tabelle 7-3). Diese Beobachtung stimmt mit der Überlegung überein, dass eine Bindung des Tetracyclins an TetR in dem SPR-Assay aufgrund der kleinen Masse des Tetracyclins nicht detektiert werden kann. Erst die Ablösung des schweren Repressor-Moleküls kann im Sensorgramm nachvollzogen werden. Der Nachweis des Tetracyclins in dem entwickelten Assay beruht nur auf der Induktion des Repressors durch das Antibiotikum. Die Bindungsaffinität des Tetracyclins zum Repressor ist für den Assay nebensächlich.

### 7.3.8 Nachweis und Quantifizierung von Tetracyclin in Milch und Honig

#### 7.3.8.1 Notwendigkeit der Matrixkalibrierung

Vergleiche von Kalibrierkurven in Puffer oder in der Matrix Rohmilch bzw. Honig zeigten deutliche Matrixinterferenzen (siehe auch Abbildung 7-5, Seite 142). Es wurde deutlich, dass die Quantifizierung von Matrixproben gegen eine Kalibrierkurve in Puffer zu geringeren Tetracyclin-Gehalten führen würde. Daher war für eine genaue Quantifizierung mit dem entwickelten Tetracyclin-Assay Aufnahme der Kalibrierkurve in einer rückstandsfreien Matrix möglichst gleicher Zusammensetzung notwendig.

Bei Quantifizierungen von Proben (sowohl Milch- als auch Honigproben) mit der selben Tetracyclin-Konzentration aber unterschiedlicher Herkunft gegen eine Matrixkalibrierkurve wurden unterschiedliche Gehalte festgestellt (siehe Tabelle 6-22, Seite 121 bzw. Abbildung 6-33, Seite 116). Die individuelle Zusammensetzung der Matrix jeder einzelnen Probe hat den Assay so stark beeinflusst, dass eine Quantifizierung nur eingeschränkt möglich war. Für eine zuverlässige quantitative Aussage müsste die Aufarbeitung der Proben so modifiziert werden, dass die Matrixinterferenzen mit der Chipoberfläche reduziert werden. Möglicherweise ist bei ausreichender Reduktion auch eine Kalibrierung gegen Puffer-Lösungen möglich.

### **7.3.8.2 Nachweisvermögen für Tetracyclin in Rohmilch und Honig**

Bei sigmoiden Kalibrierkurven liegt der Bereich, in dem am genauesten quantifiziert werden kann, in der Mitte der Kurve (IB<sub>50</sub>-Wert). Hier zeigt sie den steilsten Verlauf, was bedeutet, dass die geringste Änderung der Tetracyclin-Konzentration die größte Signaländerung hervorruft. Der hier vorgestellte Screening-Assay ergibt für den Nachweis von Tetracyclinen in Rohmilch einen IB<sub>50</sub>-Wert von rund 300 µg/kg (siehe Abbildung 7-5). Gemäß den Verordnungen (EG) Nr. 281/96 [4] und Nr. 1000/98 [5] ist für alle Tetracycline in Milch ein MRL von je 100 µg/kg vorgeschrieben. Demnach liegt der Bereich, in dem der Assay die höchste Genauigkeit für Quantifizierungen von Tetracyclin in Rohmilch zeigt, dreimal höher als der MRL. Quantifizierungen am oberen oder unteren Ende der Kalibrierkurve ergeben größere Ungenauigkeiten. So wurden Milchproben von unterschiedlichen Kühen mit einem dotierten Gehalt von 200 µg/kg mit durchschnittlich 95 %iger Wiederfindung und Proben mit 50 µg/kg Tetracyclin mit durchschnittlich 136 %iger Wiederfindung quantifiziert (siehe Tabelle 7-4). Dabei zeigte eine Quantifizierung der Proben von unterschiedlichen Kühen über eine mit Tank-Milch angefertigte Kalibrierkurve ähnliche Gehalte wie eine Kalibrierung jeder Probe über eine in der selben Milch angefertigte Kalibrierkurve. Hier zeigte sogar die Kalibrierung mit Tank-Rohmilch eine etwas bessere Übereinstimmung von Ist- und Soll-Wert.

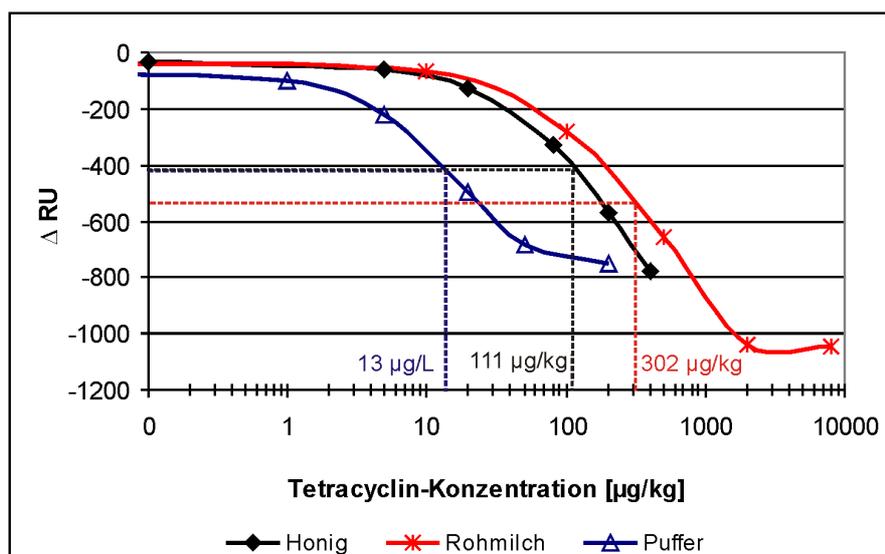


Abbildung 7-5 Kalibrierkurven von Tetracyclin in Honig, Rohmilch (Tank) und Puffer. Für jede Matrix ist der bestimmte  $IB_{50}$ -Wert mit gestrichelter Linie markiert. Die Messungen wurden im Biacore Q durchgeführt.

Bestimmung über eine Kalibrierkurve mit der jeweiligen Kuhmilch							
Dotierung	Tank	Kuh 1	Kuh 2	Kuh 3	Kuh 4	Kuh 5	Durchschnitt
50 [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	101	126	140	130	186	135	<b>136</b>
200 [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	117	91	110	83	86	86	<b>95</b>

Bestimmung über eine Kalibrierkurve mit Tank-Milch							
Dotierung	Tank	Kuh 1	Kuh 2	Kuh 3	Kuh 4	Kuh 5	Durchschnitt
50 [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	101	155	122	131	112	110	<b>122</b>
200 [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	117	131	111	91	67	76	<b>99</b>

Tabelle 7-4 Wiederfindungen [%] der mit jeweils 50 und 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dotierten Rohmilchproben von 5 Kühen und einer Tank-Rohmilch.

Der Assay kann problemlos zwischen einer Milch mit 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Tetracyclin und einer Milch ohne Tetracyclin unterscheiden. Das Messsignal einer mit 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Tetracyclin dotieren Rohmilchprobe liegt mehr als 200 RU niedriger als das Signal einer undotierten Rohmilch (siehe Abbildung 7-5). Auch bei Kalibrierkurven von Rohmilchproben unterschiedlicher Kühe zeigten sich deutliche Signalunterschiede zwischen der jeweils undotierten und der mit 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Tetracyclin dotierten Probe (siehe Abbildung 6-31, Seite 114). Jede dieser Proben wäre problemlos positiv bestimmt worden.

Honigproben konnten mit einem  $IB_{50}$ -Wert von etwas mehr als 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  sensitiver vermessen werden als Rohmilchproben. Da zur Behandlung von Bienen, deren Honig in den Handel gelangt, Tetracycline nicht zugelassen sind, muss ein Screening-Assay sehr kleine Mengen an Tetracyclin nachweisen können.

Für die industrielle Produktionskontrolle sollte ein Screening-Test auf Tetracyclin in der Lage sein, mindestens 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  nachzuweisen [183]. Die Entscheidungsgrenze ( $CC_{\alpha}$ ) wurde mit dem entwickelten Assay zu 14  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bestimmt (siehe Abschnitt 6.13.4, Seite 117). Bei Betrachtung der Messwerte dotierter Honigproben (Abbildung 7-5) stellt man fest, dass zwischen rückstandsfreiem und Honig mit 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Tetracyclin rund 30 RU, zwischen einem Honig mit 0 und 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Tetracyclin sogar bereits 100 RU liegen. Der Grund für die dennoch relativ hohe Entscheidungsgrenze ist die Streubreite der Messwerte bei Honigen unterschiedlicher Art und Herkunft. Die Blindwerte der gemessenen Honigproben variierten von -37 bis -84 RU (Tabelle 6-21, Seite 119). Dadurch ergab sich eine Standardabweichung von 15,9 RU und demzufolge gemäß der Formel zur Berechnung der Entscheidungsgrenze ein recht hoher  $CC_{\alpha}$ -Wert.

Bei der Beurteilung von Nachweisgrenzen und Genauigkeit der Quantifizierung dieses Screening-Assays muss beachtet werden, dass der Assay nicht in der Lage ist, die Epimere der Tetracycline zu erfassen (siehe Abschnitt 6.11, Seite 103). Der MRL von 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Tetracyclin in Rohmilch beinhaltet sowohl die Muttersubstanz als auch das jeweilige 4-Epimer. Bei der Untersuchung von Proben, deren Rückstände von einer Arzneimittelbehandlung des lebensmittelliefernden Tieres stammen, ist von der Anwesenheit der Epimere auszugehen. Über den Umfang, in dem diese vorliegen, kann aufgrund der vielen Parameter, die das Gleichgewicht zwischen Muttersubstanz und Epimer beeinflussen, keine Aussage gemacht werden. Remmers et al. [15] bestimmten 1963 eine maximale Gleichgewichtskonzentration von 55 % des Epimers bei einem pH-Wert von 3,2. Mit steigendem pH-Wert nahm der Anteil des Epimers ab. Die Proben für den SPR-Assay werden in Puffer mit pH 7,4 verdünnt, so dass von einer geringeren Epimerisierungsrate während der Dauer der Analyse ausgegangen werden kann. Wird von einem Screening-Assay für Tetracycline also eine Entscheidungsgrenze von 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in Honig, oder ein MRL von 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in Milch verlangt, so sollte – um ein Sicherheitspolster zu haben – die reale Entscheidungsgrenze des Assays um mind. 30 % niedriger liegen. Dies würde für den Nachweis von Tetracyclin in Honig eine erforderliche Verbesserung der Nachweisgrenze um den Faktor 2 bedeuten. Die Nachweisgrenze von Tetracyclin in Rohmilch wurde mit ca. 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bestimmt und liegt

damit bereits so weit unterhalb des MRL, dass auch bei einer maximalen Epimerisierung eine Probe am MRL als positiv bestimmt werden kann.

Dennoch ist die Quantifizierung von Proben mit dem hier dargestellten Tetracyclin-Assay problematisch. Abbildung 6-33, Seite 116 und Tabelle 6-22, Seite 121 zeigen Quantifizierungen von Rohmilch- und Honigproben. Dabei zeigte sich eine sehr starke Abhängigkeit von der Zusammensetzung der jeweiligen Matrix. Mit 200 µg/kg dotierte Rohmilchproben wurden mit Gehalten quantifiziert, die zwischen 133 µg/kg (Kuh 4) und 261 µg/kg (Kuh 1) lagen. Es wird deutlich, dass der Assay für quantitative Aussagen weiterer Entwicklungsarbeit bedarf.

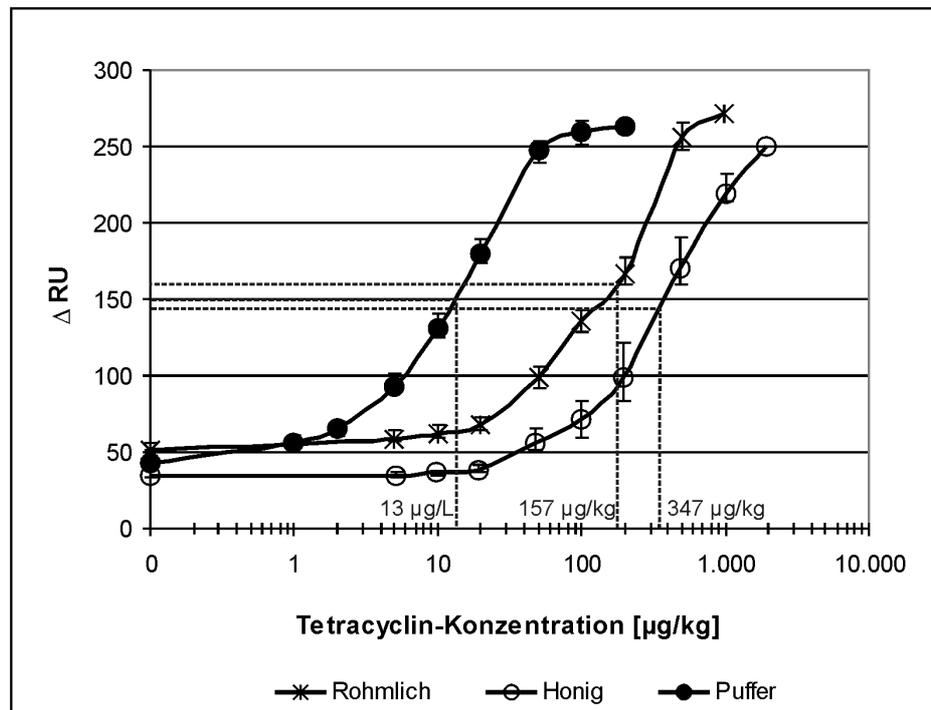
### 7.3.8.3 Vergleich mit veröffentlichten Daten

In der Zeitschrift *European Food Research and Technology* wurden 2007 bereits Ergebnisse, die mit diesem Assay erhalten wurden veröffentlicht [195]. In dieser Veröffentlichung wurden die in Abbildung 7-6 dargestellten Kalibrierkurven gezeigt. Für einen besseren Vergleich mit den Daten in dieser Arbeit, wurden die berechneten  $IB_{50}$ -Werte der Kalibrierkurven in die Zeichnung mit aufgenommen. Diese weichen von denen in Abbildung 7-5 gezeigten  $IB_{50}$ -Werte für Rohmilch und Honig ab.

Die in [195] gezeigten Kalibrierkurven wurden zu einem Zeitpunkt in der Assay-Entwicklung aufgenommen, in dem erste Messungen mit Matrix-Proben durchgeführt wurden. Die Messungen wurden an der Universität Utrecht mit dem Biacore 3000<sup>®</sup> durchgeführt.

Für die Rohmilch-Messungen wurde eine Tank-Milch von Kühen verwendet, die auf Forschungsfarm der Universität Utrecht gehalten wurden. Für Messungen, die in Wuppertal durchgeführt wurden, stand diese Milch nicht mehr zur Verfügung und es wurde eine andere Tank-Milch verwendet. Wie bei den Untersuchungen mit Rohmilchproben unterschiedlicher Kühe festgestellt wurde, weichen die  $IB_{50}$ -Werte stark in Abhängigkeit der Zusammensetzung der einzelnen Proben ab (siehe Tabelle 6-20, Seite 113). Hier wurde bereits zwischen Milchproben von Kühen, die zum gleichen Zeitpunkt gemolken (Winter) wurden und alle im gleichen Stall mit dem gleichen Futter gefüttert wurden ein Unterschied von rund 100 µg/kg bestimmt. Zwischen der Haltung der Kühe auf der Forschungsfarm und denen für die später verwendete Tank-Milch sind Unterschiede zu erwarten, so dass eine Verschiebung des  $IB_{50}$ -Wertes von rund 150 µg/kg erklärbar ist. Da sich der bestimmte  $IB_{50}$ -Wert für beide Kalibrierkurven in Puffer-Lösungen nicht verändert hat, kann nicht von einer Beeinflussung

durch Parameter wie Gerätetyp, Labor, Chargen der Sensorchips oder ähnlichem ausgegangen werden.



**Abbildung 7-6** Kalibrierkurven von Tetracyclin in Honig, Rohmilch (Tank) und Puffer, wie sie im August 2005 mit dem Biacore 3000<sup>®</sup> gemessen wurden (veröffentlicht in [195]). Für jede Matrix ist der bestimmte IB<sub>50</sub>-Wert mit gestrichelter Linie markiert.

Da die Nachweisgrenze für Tetracyclin in Honig möglichst gering sein muss, wurde der Assay nach der Aufnahme der Kalibrierkurven in Utrecht weiter entwickelt. Für die später aufgenommenen Kalibrierkurven (Abbildung 7-5) wurde die Probe für 240 Sekunden anstelle von 120 Sekunden (Abbildung 7-6) injiziert. Dadurch konnte die Sensitivität (IB<sub>50</sub>-Wert) gesteigert werden.

## 8 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden verschiedene Assay-Formate eines tetracyclinspezifischen Biosensor-Assays auf der Basis der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) unter Verwendung bakterieller Rezeptor-Moleküle untersucht.

Das Ribosom, an das Tetracyclin bindet und so die Proteinbiosynthese in Bakterien behindert, erschien als geeignetes Rezeptor-Molekül. Versuche diese aus grampositiven (*Bacillus stearothermophilus*) bzw. aus gramnegativen Bakterien (*Escherichia coli*) zu isolieren erbrachten jedoch keine zur Bindung von Tetracyclin fähigen Moleküle.

Daher wurde als biomolekularer Erkennungspartner der Tetracyclin-Repressor TetR verwendet, einem Protein, das bei tetracyclinresistenten Bakterien die Expression des eigentlichen Resistenzgens steuert. Bei Abwesenheit von Tetracyclin sitzt der Repressor vor dem Resistenzgen auf einem kurzen DNA-Abschnitt – dem Tetracyclin-Operator *tetO* – und blockiert so die Genexpression. Dringt das Antibiotikum in die Zelle ein, bindet es an den Repressor, der sich aufgrund einer tetracyclininduzierten Konformationsänderung vom Operator ablöst und so das Gen zur Expression freigibt. Tetracyclin-Repressor und –Operator bilden zusammen ein wirksames Instrument zum Nachweis von Tetracyclin-Rückständen in Lebensmitteln mittels Biosensor-Technologie.

Mit TetR und *tetO* ließen sich mehrere Assay-Formate entwickeln. Für ein indirektes Format muss zunächst ein Tetracyclin-Derivat an die Chipoberfläche gebunden werden. Der Probe wird vor der SPR-Analyse TetR zugesetzt, und in positiven Proben konkurrieren das freie Tetracyclin und das chipgebundene Tetracyclin um die Bindungsstellen am TetR. Dieses Format konnte nicht getestet werden, da Versuche zur Derivatisierung von Tetracyclin an der Amidfunktion nicht zu stabilen Produkten führten.

Deshalb wurde zunächst ein direktes Assay-Format untersucht, bei dem das Repressor-Protein auf dem Sensorchip immobilisiert und die Anbindung von Tetracyclin aus einer injizierten Standard-Lösung massenabhängig detektiert wurde. Dieses Verfahren stellte sich jedoch als zu unempfindlich für die Rückstandsanalytik heraus, da Tetracyclin mit einem Molekulargewicht von 444 g/mol keine ausreichende Massenänderung auf der Chipoberfläche verursachte. Deshalb wurden zwei weitere Assay-Formate untersucht, bei denen der Repressor mit einer molaren Masse von 46.600 g/mol zur Signalverstärkung verwendet wurde. Für beide Formate wurde der Tetracyclin-Operator als biomolekularer Bindungs-

partner für den Repressor permanent auf dem Chip immobilisiert. Für eine Assay-Variante wurden Tetracyclin-Standard-Lösungen mit dem Repressor inkubiert, bevor sie mit dem SPR-Biosensor analysiert wurde. Während der Inkubation konnte der Repressor die in der Lösung enthaltenen Tetracycline binden und wurde dadurch im zweiten Schritt an der Bindung auf den chipgebundenen Operator gehindert. Das SPR-Signal verhielt sich umgekehrt proportional der Tetracyclin-Konzentration in der Lösung. Für die letzte Assay-Variante wurde der Operator auf dem Sensorchip zunächst mit Repressor belegt. Anschließend wurde die tetracyclinhaltige Standard-Lösung injiziert, und es kam aufgrund der Bindung des Tetracyclins an den Repressor zu dessen Ablösung. Dabei verhielt sich das Messsignal direkt proportional zur Tetracyclin-Konzentration im Standard. Beide indirekten Assay-Formate zeigten eine deutlich gesteigerte Sensitivität im Vergleich zum direkten Format. Aufgrund der höchsten Sensitivität wurde das letzte Verfahren für einen tetracyclinspezifischen Rückstandsnachweis weiter entwickelt.

Die durch eine Tetracyclin-Injektion erhaltene Signalintensität zeigte eine starke Abhängigkeit von der Immobilisierungshöhe des Operators auf der Chipoberfläche. Durch eine Änderung dieses Parameters konnte jedoch keine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit festgestellt werden. Der Assay zeigte bei Einsatz höher konzentrierter TetR-Lösungen eine leicht verringerte Sensitivität, so dass mit TetR-Konzentrationen von 1  $\mu\text{mol/L}$  gearbeitet werden konnte. So wurde auch nur wenig von dem nicht kommerziell zugänglichen Reagenz verbraucht. Durch das für jeden Cyclus frisch injizierte TetR wurde der molekulare Erkennungspartner des Analyten nicht durch z.B. die Regeneration beeinflusst und zeigte immer eine gleich bleibende Bindungsaktivität.

Zur Optimierung des Tetracyclin-Assays wurden unterschiedliche Operator-Varianten genutzt, die sich in der Anzahl der Biotin-Moleküle und der Anzahl der zu einem Doppelstrang zusammengelagerten Basen unterschieden. Es konnten nur geringe Auswirkungen der *tetO*-Varianten auf das Testsystem beobachtet werden. Eine Varianten mit einem Biotin, bei der 18 der 46 Basen als Doppelstrang vorlagen, zeigte die höchste TetR-Bindung und wurde daher für den Assay ausgewählt.

Es standen 5 Repressor-Varianten zur Optimierung des Assays zur Verfügung, wobei zwei im Vergleich zum TetR(BD) eine gesteigerte Stabilität aufwiesen (P184Q und scTetR) und zwei weitere verbesserte Bindungseigenschaften zu den unterschiedlichen Tetracyclinen zeigten

(S135L und V113A). Bei der Beurteilung der TetR-Varianten wurde neben der Sensitivität des Assays auch die Kreuzreaktivität zwischen den als Tierarzneimittel zugelassenen Tetracyclinen Oxytetracyclin, Chlortetracyclin, Tetracyclin und Doxycyclin betrachtet. Da der Assay nicht zwischen den einzelnen Tetracyclinen unterscheiden kann, ist eine möglichst einheitliche Kreuzreaktivität des Repressors bei allen Tetracyclinen von Vorteil. Die beiden Varianten mit erhöhter Stabilität zeigten eine deutlich schlechtere Sensitivität als alle anderen TetR-Varianten, so dass sie für die Entwicklung eines Rückstandsnachweises nicht geeignet waren. Der Repressor V113A zeigte eine weitgehend einheitliche Kreuzreaktivität zu den Tetracyclinen, jedoch war die Sensitivität der Repressoren TetR(BD) und S135L besser. Diese Varianten waren hinsichtlich Sensitivität und Kreuzreaktivität vergleichbar. Für die weitere Entwicklung des Biosensors wurde mit der Variante TetR(BD) gearbeitet. Für diese riefen Doxycyclin, Chlortetracyclin und Anhydrotetracyclin unter den getesteten Tetracyclinen die stärkste Signalantwort hervor. Die 4-Epimere der Tetracycline konnten hingegen nur schlecht detektiert werden.

Der Assay zeigt eine hohe Selektivität auf Tetracycline. Keines der 9 Antibiotika aus 5 anderen Antibiotika-Klassen zeigte eine Signalantwort, die sich von der von reinen Pufferlösungen unterschied.

Tetracycline sind für die Behandlung von Honigbienen innerhalb der Europäischen Union nicht zugelassen. In vielen Drittländern hingegen, aus denen Honig importiert wird, dürfen Tetracycline bei der Herstellung von Honig eingesetzt werden. Eine Kontrolle vor allem importierter, aber auch heimischer Honige in sehr geringen Konzentrationsbereichen ist daher nötig. Die Applikation des Assays auf die Matrix Honig konnte problemlos durchgeführt werden. Der Honig konnte nach Verdünnung mit Probenpuffer und anschließender Zentrifugation bereits zur Analyse eingesetzt werden. Allerdings zeigte sich eine starke Varianz des Messsignals von Blindproben 20 unterschiedlicher Honige, so dass eine Nachweisgrenze von 14 µg/kg Tetracyclin bestimmt wurde. Diese reicht zur Kontrolle eines nicht zugelassenen Antibiotikums jedoch nicht aus.

Die Matrixinterferenzen in dem beschriebenen Assay bei Rohmilchproben konnten durch Entfettung, Verdünnung und Erhitzung der Proben für 5 Minuten auf 95 °C reduziert werden. Die Nachweisgrenze für Tetracyclin in Rohmilch lag mit 41 µg/kg höher als bei Honig, jedoch noch unterhalb der Höchstmenge von 100 µg/kg für Tetracycline in Milch.

Dennoch zeigten Quantifizierungen von Tetracyclin sowohl in Rohmilch als auch in Honig starke Schwankungen in Abhängigkeit der Zusammensetzung der jeweiligen Matrix. Ohne eine weitere Verringerung der Matrixinterferenzen ist eine Quantifizierung nur eingeschränkt möglich. Somit zeigt der Assay für den Nachweis von Tetracyclinen noch keine ausreichende Robustheit.

Für die Analytik von Tetracyclinen in Lebensmitteln existieren viele kommerziell erhältliche Screening-Tests, die zumeist sehr einfach in der Handhabung sind. Diese Testverfahren sind jedoch mit Ausnahme des Tetracyclin-ELISA durch die Anzahl der parallel analysierbaren Proben limitiert. Die SPR-Biosensor-Technologie eignet sich aufgrund der hohen Automatisierbarkeit der Analytik hervorragend für die Bewältigung großer Probenzahlen. Mit dem hier vorgestellten Assay ist die Analytik von rund 100 Proben pro Tag möglich. Damit wurde mit dem in dieser Arbeit vorgestellten SPR-Biosensor der Grundstein für einen Screening-Assay auf Tetracyclin-Rückstände in Lebensmitteln gelegt.

## 9 Ausblick

Mit dieser Arbeit wurde der Grundstein zur Entwicklung eines Biosensorverfahrens auf der Basis der Oberflächen-Plasmon-Resonanz zum Screening auf Tetracyclin-Rückstände für den kommerziellen Markt geschaffen. Dieser Assay erlaubt einen hohen Probendurchsatz (rund 100 Proben pro Tag) mit nur geringer Probenvorbereitung.

Der Assay ist in der Lage, Tetracycline bis deutlich unterhalb der Höchstmengenkonzentration in Rohmilchproben nachzuweisen. Auch für Honigproben lässt er sich verwenden. Allerdings sollte, da für die Herstellung von Honig die Verwendung von Tetracyclinen europaweit nicht zugelassen ist, die Sensitivität des Testsystems gesteigert werden. Prinzipiell bestehen zur Steigerung der Nachweisempfindlichkeit mehrere Möglichkeiten. So führt beispielsweise die Verlängerung der Injektionsdauer der Probe zu einer Verlängerung der Kontaktzeit mit dem auf der Chipoberfläche befindlichen Repressor, der somit in stärkerem Maße abgelöst werden kann. So können auch mit geringen Tetracyclin-Konzentrationen messbare  $\Delta$  RU-Werte erreicht werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in Änderung der Verdünnung des Honig vor der Messung. Durch eine stärkere Verdünnung würde auch die Matrix des Honigs verdünnt, was dazu führen könnte, dass sich die einzelnen Honige in ihren Blindwerten nicht mehr so stark unterscheiden. Dies könnte dazu führen, dass geringere Tetracyclin-Konzentrationen bereits als positiv erkannt werden. Aber auch eine geringere Probenverdünnung könnte die Sensitivität erhöhen, da hierdurch mehr Analyt auf die Chipoberfläche gelangt. Eventuell ist eine Erhöhung der Flussgeschwindigkeit bei der Probeninjektion von Vorteil. Hierbei könnten die unspezifischen Wechselwirkungen der Matrix mit der Chipoberfläche stärker unterdrückt werden, als die spezifische Wechselwirkung zwischen Tetracyclin und TetR. Zudem sollte geprüft werden, ob durch eine Erhöhung der Flussgeschwindigkeit die am Rand der Flusszelle vorhandene langsam bis gar nicht fließende Schicht verkleinert werden kann. Dadurch könnte eine nicht durch Diffusion limitierte Bindung von Tetracyclin an den chipgebundenen Repressor erreicht werden, was eine schnellere Ablösung von TetR und damit evtl. eine verkürzte Analysendauer ermöglichen könnte.

Für den Nachweis von Tetracyclin in Rohmilch wurde eine Nachweisgrenze rund 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  abgeschätzt, indem die dreifache Standardabweichung vom Mittelwert der Blindwerte von 5 Proben unterschiedlicher Kühe und einer Tank-Rohmilch bestimmt wurde. Gemäß der

---

Entscheidung der Kommission 2002/657/EG [76] müssen hierfür mindestens 20 unterschiedliche Proben untersucht werden.

Zur Reduktion der Matrixinterferenzen wäre es interessant zu wissen, welche Matrixbestandteile die Interferenzen verursachen. Danach könnte eine gezielte Probenaufarbeitung zur Reduktion dieser Bestandteile entwickelt werden. Dazu könnten Untersuchungen mit selbst hergestellten, den echten Lebensmitteln nachempfundenen Matrices dienen.

Für den kommerziellen Vertrieb eines Tetracyclin-Assays ist die Applikation auf weitere Lebensmittelmatrices sicherlich von Bedeutung. Dabei ist der Nachweis von Tetracyclin in Leber, Niere oder Muskelfleisch von Schwein und Rind sicherlich von besonderem Interesse. Aber auch die Untersuchung von Geflügel und damit auch Eiern ist im Bereich der Tetracyclin-Rückstandskontrolle nicht unerheblich.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Nachweis von Tetracyclin mit Sensorchips, die außerhalb des SPR-Gerätes gelagert wurden, nur noch eingeschränkt möglich ist. Die besten Ergebnisse wurden mit Chips erzielt, die nach der Immobilisierung mit *tetO* im Gerät verblieben. In Laboratorien, die Rückstandsnachweise durchführen, müssen die Sensorchips voraussichtlich ausgebaut über einen längeren Zeitraum vergleichbare Ergebnisse liefern können. Dazu muss die Lagerstabilität der Sensorchips erhöht werden. Dies könnte durch Variation der Lagerbedingungen (z.B. Temperatur, Lagerung in Puffer) erfolgen.

## 10 Material und Methoden

### 10.1 Isolierung von Ribosomen

#### Materialien und Geräte

Brutschrank (Memmert GmbH & CoKG, Schwabach)

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

Großvolumige Zentrifuge, (Beckman Coulter CH-22-21 mit Rotor JA-10, Beckman Coulter GmbH, Krefeld)

Schikanekolben (Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe)

Ultrazentrifuge (L7-55 mit Rotor Ti 70, Beckman Coulter GmbH, Krefeld)

#### Reagenzien

NH<sub>4</sub>Cl, wasserfrei (Merck KGaA, Darmstadt)

DNase, RNase-frei (Fluka, Seelze)

Glucose, wasserfrei (Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe)

Hefeextrakt (Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe)

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, wasserfrei (Fluka, Seelze)

KCl (Merck KGaA, Darmstadt)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, wasserfrei (Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe)

MgCl<sub>2</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O (Merck KGaA, Darmstadt)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, wasserfrei (Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe)

NaCl (Fluka, Seelze)

Saccharose, wasserfrei (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & CoKG, Karlsruhe)

Tris-HCl, RNase-frei (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & CoKG, Karlsruhe)

Trypton (Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe)

#### Bakterienstämme

Zur Isolierung der Ribosome wurden *Bacillus Stearothermophilus* (ATCC 15952, LGC Promochem GmbH, Wesel) und *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) verwendet.

Extraktionspuffer

50 mmol/L Tris-HCl  
10 mmol/L MgCl<sub>2</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O  
10 mmol/L NH<sub>4</sub>Cl, wasserfrei  
100 mmol/L KCl  
250 mmol/L Saccharose  
pH 7,4

Medium zur Anzucht von *E. coli*

2 % Trypton  
1 % Hefeextrakt  
2 % NaCl  
50 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, wasserfrei  
1 % Glucose, wasserfrei  
pH 7,5

Medium zur Anzucht von *B. stearothermophilus*

1 % Pepton  
0,6 % Fleischextrakt  
50 mg/L MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O  
100 mg/l CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
500 mg/L MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
pH 7,0

Die Nährmedien wurden 16 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Die Glucose-Lösung wurde separat autoklaviert und anschließend dem Medium zugesetzt.

Stammhaltung

Zur Stammhaltung von *B. stearothermophilus* wurde eine Sporensuspension in sterilem Wasser verwendet. Zur Herstellung dieser Sporensuspension wurden 10 ml Medium mit *B. stearothermophilus* angeimpft und 3 Tage bei 60 °C inkubiert, um die Sporenbildung zu fördern. Die Sporen wurden sedimentiert (6400 g, 10 min, RT) und 2 Mal mit sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurden sie in insgesamt 40 ml sterilem Wasser resuspendiert und bei 4 °C in je 10 ml Aliquots gelagert.

Die Lagerung von *E. coli* erfolgte auf Agarplatten bei 4 °C, wobei der Keim im Abstand von 14 Tagen auf frische Platten überimpft wurde. Nach dem Überimpfen wurde die Platte über Nacht bei 37°C bebrütet, bevor sie wieder bei 4 °C gelagert wurde.

### **Anzucht der Zellen**

Die Anzucht des Bakteriums *B. stearothermophilus* erfolgte aus der Sporensuspension. Dazu wurde 1 ml der Suspension für 10 Minuten im Wasserbad auf 100 °C erhitzt, um die Sporen zu aktivieren und eventuelle vegetative Keime abzutöten. Ca. 50 µl der reaktivierten Sporensuspension wurden in 10 ml Medium gegeben und über Nacht bei 60 °C und 200 rpm im Schüttelwasserbad in einem 100 ml Schikanekolben inkubiert. Die Übernachtskultur wurde im Verhältnis 1:30 mit frischem Medium verdünnt zur Isolierung der Ribosome bei 60 °C inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0.

Für die Isolierung der Ribosome aus *E. coli* wurden 10 ml Medium mit einer Kolonie von einer Agarplatte angeimpft und bei 37 °C im Brutschrank auf einem Rundschüttler bei 200 rpm für 4 Stunden inkubiert. Diese Kultur wurde im Verhältnis 1:50 mit frischem Medium verdünnt und über Nacht inkubiert. Diese wurde erneut im Verhältnis 1:30 mit frischem Medium verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 4 in Schikanekolben angezogen.

### **Isolierung der Ribosome**

Die Isolierung der Ribosome aus den beiden Bakterienstämmen wurde in Anlehnung an Madjar [162] und Doucet-Populaire et al. [163] durchgeführt.

Die Ernte der Zellen erfolgte nach zweimaligem Waschen mit kaltem (4 °C) Extraktionspuffer durch Sedimentation (10 min, 11.000 g, 4 °C). Nach Resuspension der Zellen in 20 ml kaltem Extraktionspuffer wurden wenige Milligramm RNase-freie DNase zugegeben und die Zellen durch zweimalige Passage durch eine French-Press bei 18.000 psi (entspricht 1240 bar) aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde noch 30 Minuten auf Eis inkubiert, um der DNase genügend Zeit zum Verdau der vorhandenen DNA zu geben. Anschließend erfolgte die Abtrennung grober Zellbestandteile durch Zentrifugation (30.000 g, 20 min, 4 °C). Der Überstand mit den Ribosomen wurde nun einer Ultrazentrifugation (100.000 g, 60 min, 4 °C) unterworfen. Dadurch konnten die Ribosome sedimentiert werden. Zur weiteren Aufreinigung wurden diese in 1ml kaltem Extraktionspuffer aufgenommen, vorsichtig auf ein Bett aus 20 ml Saccharose (1 mol/L in Extraktionspuffer) aufgetragen und erneut zentrifugiert (100.000 g, über Nacht, 4 °C). Das Ribosomenpellet wurde vorsichtig gewaschen, indem

zweimal ca. 1,5 ml kaltes Wasser über das Pellet gegeben wurde, ohne dies jedoch aufzubrechen. Zur Quantifizierung und Lagerung wurden die Ribosome in kaltem Extraktionspuffer aufgenommen und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Bestimmung der Ribosomen-Konzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemäß der Berechnungsformel [162]

$$c[\text{mg/ml}] = \frac{A_{260}}{14} . \quad [1]$$

## 10.2 Bestimmung der Bindung von Tetracyclin an Ribosome

### Materialien und Geräte

Kapillarelektrophorese-Gerät: Beckmann Coulter P/ACE MDQ Molecular Characterisation System mit DAD (280 nm)

Centriprep<sup>®</sup> YM-50 MW (Millipore GmbH, Schwalbach)

Mikrotiterplatten-Reader (Model 680, Bio-rad Laboratories GmbH, München)

Ridascreen<sup>®</sup> Tetracyclin-ELISA-Testkit (Art. Nr. R3501, r-biopharm, Darmstadt)

Ultrazentrifuge (L7-55 mit Rotor Ti 60, Beckman Coulter GmbH, Krefeld)

### Reagenzien

Acetonitril, HPLC grade (Fisher Scientific GmbH, Schwerte)

KCl (Merck KGaA, Darmstadt)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, wasserfrei (Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe)

MgCl \* 6 H<sub>2</sub>O (Merck KGaA, Darmstadt)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, wasserfrei (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & CoKG, Karlsruhe)

NaCl (Fluka, Seelze)

Oxalsäure \* 2 H<sub>2</sub>O (Fluka, Taufkirchen)

Tetracyclin-HCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & CoKG, Karlsruhe)

Tris-HCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & CoKG, Karlsruhe)

Tween 20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & CoKG, Karlsruhe)

Waschpuffer für den ELISA (gemäß Kit-Vorschrift)

2,53 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, wasserfrei

0,54 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, wasserfrei

9,00 g/L NaCl

0,1 % Tween 20

wurde ohne pH-Korrektur verwendet

Puffer für die Kapillarelektrophorese

10 mmol/L Tris-HCl

5 mmol/L MgCl \* 6 H<sub>2</sub>O

50 mmol/L KCl

pH 7,4

Bedingungen der HPLC

Trennsäule RP-8, LiChroCart 250-3, 25 mm, Merck KGaA, Karlsruhe

Fließmittel 0,01 mol/L Oxalsäure / Acetonitril (75/25, v/v), isokratisch

Fluss 0,35 ml/min

Online-Aufreinigung Chelating Sepharose-Säule (Volumen 4 ml) mit Kupferkomplexierung, GE Healthcare Europe GmbH, München, Elution durch EDTA

Online-Anreicherung Polymerphase PLRP-S 100 Å, 50-70 µm der Firma Polymer Laboratories GmbH, Darmstadt

Detektor UV-VIS, 360 nm

Standard-Lösungen Tetracyclin in 0,01 mol/L Oxalsäure (60, 100, 200 und 400 µg/L)

**10.2.1 ELISA mit Konkurrenz zwischen Ribosom und Primär-Antikörper**

Die Bindung von Tetracyclin an die isolierten Ribosome wurde mit einem Tetracyclin-ELISA-Kit der Firma r-biopharm<sup>®</sup>, Darmstadt getestet. Als Positiv-Kontrolle dienten Standard 2 (0,05 µg/L Tetracyclin) und Standard 6 (4050 µg/L Tetracyclin) aus dem Testkit. Puffer ohne Tetracyclin (Standard 1) wurde zur Ermittlung der maximalen Extinktion eingesetzt. Um die Bindung der isolierten *E. coli*-Ribosome an das an der Mikrotiterplatte gebundene Tetracyclin zu testen, wurden diese in Konzentrationen von 1 bis 10.000 µg/L (verdünnt im Probenpuffer des Testkits) hergestellt. Diese Lösungen wurden ohne weiteren Tetracyclin-Zusatz verwendet. Die Inkubation mit Ribosomen- bzw. Primärantikörper-Lösung

wurde entgegen den Angaben des Herstellers auf 2 Stunden erhöht, um eine Gleichgewichtseinstellung zwischen einer eventuellen Bindung der Ribosome und der Bindung des Primärantikörpers zu gewährleisten. Alle anderen Arbeitsschritte wurden gemäß den Angaben der Kit-Beschreibung durchgeführt, so dass sich ein Arbeitsablauf wie folgt ergab:

1. 50 µl der Standard-Lösungen oder der Ribosomen-Lösungen in die jeweilige Kavität pipettieren
2. 50 µl der Primärantikörper-Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig mischen.
3. 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren
4. Platte ausschlagen und dreimal mit Waschpuffer waschen
5. 100 µl Sekundärantikörper in jede Kavität pipettieren
6. 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
7. Platte ausschlagen und dreimal mit Waschpuffer waschen
8. je 50 µl der Chromogen- und der Substrat-Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig mischen
9. 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
10. 100 µl der Stopplösung in jede Kavität pipettieren und bei 450 nm gegen Luft messen

### 10.2.2 Affinitäts-Kapillarelektrophorese

Die Bindung des Tetracyclins an ein Ribosom wurde über die Differenz der Migrationszeit des reinen Tetracyclins zur Migrationszeit des Tetracyclins in Komplex mit Ribosom bestimmt. Es wurden sowohl Ribosome aus *E. coli* als auch Ribosome aus *B. stearothermophilus* untersucht. Dazu wurden die Ribosome in den in Tabelle 10-1 angegebenen Konzentrationen mit dem Elektrophoresepuffer vorgelegt. Das Tetracyclin wurde mittels des automatischen Probengebers für jede Messung injiziert. Die Detektion erfolgte bei 280 nm.

Ribosome ( <i>E. coli</i> / <i>B. stearothermophilus</i> ) [ $\mu\text{mol/L}$ ]	Tetracyclin-Gehalt [ $\mu\text{mol/L}$ ] ( <i>E. coli</i> )	Tetracyclin-Gehalt [ $\mu\text{mol/L}$ ] ( <i>B. stearothermophilus</i> )
0,0		
18,5	450	45
37,0		
74,0		

**Tabelle 10-1** Eingesetzte Mengen Tetracyclin und Ribosomen bei der Affinitäts-Kapillarelektrophorese

Die Migrationszeiten wurden jeweils in einer Dreifachbestimmung ermittelt.

### 10.2.3 Gleichgewichtsanalysen

Die Ribosome wurden mit Tetracyclin in molaren Verhältnissen von 1:10 bis 10:1 in Extraktionspuffer (siehe Abschnitt 10.1, Seite 152) gemischt und bei 37 °C inkubiert. Die Bindungsaktivität der Ribosome wurde in Anlehnung an Degand et al. [158] nach Abtrennung der gebildeten [TC\*Rib]-Komplexe als Konzentration des nicht gebundenen Tetracyclins bestimmt. Die Trennung zwischen gebundenem und nicht gebundenem Tetracyclin wurde auf zwei Wegen erreicht. Zum einen wurde eine Zentrifugationsfiltereinheit mit einer Ausschlussgrenze von 50 kDa verwendet, die die Ribosome und mit ihnen das gebundene Tetracyclin zurückhielt, wohingegen das freie Tetracyclin durch die Membran gelangen konnte. Als Alternative zu dieser Methode wurden die Ribosome in einem 2-stündigen Ultrazentrifugationsschritt (100.000 g, 4 °C) sedimentiert und in der überstehenden Lösung die freien Tetracycline quantifiziert.

Die Quantifizierung des freien Tetracyclins erfolgte in beiden Fällen mittels HPLC.

## 10.3 Herstellung eines Tetracyclin-Derivates

### Materialien und Geräte

HPTLC-Platte Kieselgel 60 auf Glas (Merck KGaA, Darmstadt)

### Reagenzien

12-N-Methylamino-Laurinsäure (Fluka, Seelze)

Dichlormethan (Fisher Scientific GmbH, Schwerte)

Essigsäure (Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe)

Dinatriummethylenediamintetraessigsäure \* 2 H<sub>2</sub>O (Na<sub>2</sub>EDTA) (Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe)

Formaldehyd (Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe)

Methanol (Acros Organics, Geel, Belgien)

n-Butanol (Merck KGaA, Darmstadt)

Ninhydrin (Fluka, Seelze)

Pyrrolidin (Fluka, Seelze)

Salzsäure, 37 %ig (Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe)

t-Butanol (Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn)

Tetracyclin-Base (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & CoKG, Karlsruhe)

Es wurde geprüft, ob sich über die beiden nachfolgenden Vorschriften Tetracyclin an der Amidfunktion mit Methylamino-Laurinsäure so umsetzen lässt, dass deren Carboxylfunktion für eine anschließende Immobilisierung zur Verfügung steht.

#### Bernadelli et al. [170]:

0,5 g Tetracyclin-Base wurden in 20 ml Methanol gelöst und mit 0,2 g Formaldehyd (37 %ig) versetzt. Anschließend wurden 0,25 g 12-N-Methylamino-Laurinsäure in 6 ml Methanol gelöst und unter Rühren zur Tetracyclin-Lösung getropft. Die Mischung wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln gerührt und anschließend unter Vakuum abfiltriert. Nach Waschen mit wenig Methanol und Diethylether wurde das Produkt im Exsikkator getrocknet.

#### Pezeshk et al. [169]:

0,6 g Tetracyclin wurden in 50 ml t-Butanol gelöst und mit 0,5 g 12-N-Methylamino-Laurinsäure und 0,2 g Formaldehyd (37 %ig) versetzt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 mol/L HCl auf 5,7 eingestellt. Die Mischung wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend für 15 Minuten unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde die Lösung sofort in einem Eisbad auf 15 °C abgekühlt. Die entstandenen Kristalle wurden unter Vakuum abfiltriert, mit t-Butanol gewaschen und im Exsikkator getrocknet.

### 10.3.1 Bedingungen der Dünnschichtchromatographie

Für die dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle der Derivatisierung von Tetracyclin wurden folgende Bedingungen gewählt:

- Stationäre Phase: HPTLC-Platte Kieselgel 60 auf Glas, Merck KGaA, Darmstadt  
Die Platte wurde vor der Verwendung für 15 Minuten in gesättigter EDTA-Lösung konditioniert und nach dem Trocknen bei 130 °C für 2 Stunden aktiviert und im Exsikkator auf RT abgekühlt.
- Mobile Phase: Dichlormethan / Methanol / 5 % EDTA in Wasser (50 / 30 / 30, v/v/v), verwendet wurde die untere Phase; Kammersättigung
- Detektion:
1. Betrachtung unter UV-Licht bei 366 nm
  2. Detektion der Methylamino-Laurinsäure in einer Iodkammer
  3. Detektion durch Tauchen in 0,2 g Ninhydrin in 95 ml n-Butanol und 5 ml 10 %ige Essigsäure und Entwicklung bei 105 °C für wenige Minuten

## 10.4 Isolierung und Reinigung der Repressor-Proteine TetR(BD) und TetR(BD)S135L

### Materialien und Geräte

Gelfiltrationsanlage (Äkta FPLC mit Kontrolleinheit UPC-900 und Pumpe P-920, Trennsäule:

High Load superdex G75, alles Amersham Biosciences, Freiburg)

Großvolumige Zentrifuge, (Beckman Coulter CH-22-21 mit Rotor JA-10, Beckman Coulter GmbH, Krefeld)

HPLC-Anlage für die Ionenaustauschchromatographie (BioCAD Vision, Biacore International AB, Uppsala / Schweden)

Kationenaustauschersäule, Volumen 120 ml, gefüllt mit Poros<sup>®</sup> 20 HS-M (Merck KGaA, Darmstadt)

Peristaltikpumpe (Minipuls 2, Gilson Inc, Middleton, WI, USA)

Säulenmaterial für Gelfiltration (High Load Superdex G75, Amersham Biosciences, Freiburg)

Ultraschall Zellhomogenisator (Labsonic U, Braun, Melsungen)

Ultrazentrifuge (L7-55 mit Rotor Ti 60, Beckman Coulter GmbH, Krefeld)

Zentrifugationsfiltereinheiten, MWCO 30 kDa (Microsep 30K Omega, Pall Life Sciences, Dreieich)

Zentrifuge (Heraeus Biofuge Primo R, Thermo Elektron Corporation, Langenselbold)

### Reagenzien

Ammoniumperoxodisulfat (APS) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & CoKG, Karlsruhe)

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, wasserfrei (Merck KGaA, Darmstadt)

Ampicillin-Natriumsalz (Fluka, Seelze)

Anhydrotetracyclin-HCl (Acros Organics, Geel, Belgien)

Bromphenolblau-Natrium (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, wasserfrei (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & CoKG, Karlsruhe)

Glycerin (Fluka, Seelze)

Glycin (Fluka, Seelze)

Hefeextrakt (Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe)

Isopropylgalactopyranosid (IPTG) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & CoKG, Karlsruhe)

NaCl (Fluka, Seelze)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, wasserfrei (Merck KGaA, Darmstadt)

Natriumdodecylsulfat (SDS) (Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe)

PhastGel Blue R Tabletten (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & CoKG, Karlsruhe)

Protein-Marker (peqGOLD, peqLab, Erlangen)

Tetramethylethyldiamin (TEMED) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & CoKG, Karlsruhe)

Tris-Borsäure (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & CoKG, Karlsruhe)

Tris-HCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & CoKG, Karlsruhe)

Trypton (Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe)

β-Mercaptoethanol (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)

### Medium zur Anzucht von *E. coli* BR 791

1 % Trypton

0,5 % Hefeextrakt

1 % NaCl

100 mg/L Ampicillin

pH 7,0

Sterilfiltriertes Ampicillin wurde nach dem Autoklavieren (20 Minuten bei 120 °C) des Mediums in einer Konzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

Auftragungspuffer

140 mmol/L Tris-HCl, pH 7,0

16 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol

4 % (w/v) SDS

0,1 % (w/v) Bromphenolblau

30 % (w/v) Glycerin

Elektrophoresepuffer

500 mmol/L Tris

1,92 mol/L Glycin

1 % (w/v) SDS

Lagerungspuffer für die isolierten Proteine

16,7 mmol/L Tris

333,3 mmol/L NaCl

86 % Glycerin

pH 8,0

Sammelgel (10 %ig)

40 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1) 3,7 ml

1 mol/L Tris-HCl, pH 8,8 1,3 ml

1 mol/L Tris-Borsäure, pH 8,8 1,5 ml

bidest. Wasser 7,4 ml

2 % SDS 800  $\mu$ l

10 % APS (frisch) 400  $\mu$ l

TEMED 5  $\mu$ l

Trenngel (10 %ig)

40 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1) 750  $\mu$ l

1 mol/L Tris-HCl, pH 6,8 650  $\mu$ l

bidest. Wasser 5,35 ml

2 % SDS 375  $\mu$ l

10 % APS (frisch) 375  $\mu$ l

TEMED 9  $\mu$ l

### Proteinfärbelösung (Coomassie-Färbung)

1 Tablette PhastGel Blue R in 80 ml bidest. Wasser lösen mit 120 ml Methanol und 100 ml Essigsäure (20 %ig) versetzen.

Für die nachfolgend beschriebene Isolierung und Reinigung der Repressor-Proteine TetR(BD) und TetR(BD)S135L waren folgende Schritte nötig:

1. Transformation des TetR-codierenden Plasmids in *E. coli* RB 791 (Plasmid und Bakterium wurden mir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hillen, Universität Erlangen-Nürnberg zur Verfügung gestellt)
2. Anzucht des Bakteriums und Expression des Proteins
3. Isolierung und Aufreinigung des jeweiligen Repressors durch eine kombinierte Ionenaustausch- und Gelfiltrationschromatographie in Anlehnung an die von Ettner et al. beschriebene Methode [196]. Zwischen den beiden chromatographischen Schritten wurde das Probenvolumen durch eine Ammoniumsulfatpräzipitation verringert. Die Aufreinigung wurde über SDS-PAGE verfolgt.
4. Photometrische Quantifizierung des isolierten Proteins
5. Fluorimetrische Aktivitätsbestimmung durch Anbinden von Anhydrotetracyclin

#### **10.4.1 Transformation des TetR-codierenden Plasmids**

Das jeweilige TetR-Protein war auf dem Plasmid pWH610<sup>5</sup> codiert und stand unter Transkriptionskontrolle des synthetischen durch Isopropylgalactopyranosid (IPTG) induzierbaren Promotors P<sub>tac</sub> [197]. Zudem trug das Plasmid eine Ampicillin-Resistenz-Kassette, wodurch die Zellen unter Selektionsdruck kultiviert werden konnten und das Risiko einer Kontamination mit anderen Bakterien minimiert wurde.

Die Transformation des Plasmids erfolgte über Hitzeschock. Dazu wurden 2 µl der Plasmid-Lösung mit 50 µl einer Suspension kompetenter Zelle versetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend für 90 Sekunden in einem 42 °C warmen Wasserbad aufgewärmt, wonach sie wieder für 10 Minuten auf Eis gestellt wurden (= Hitzeschock). Die Zellen wurden anschließend mit 1 ml auf 37 °C temperiertem Medium versetzt und für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (3500 g, 2 min, RT)

---

<sup>5</sup> pWH610: p = Plasmid; WH = Wolfgang Hillen (Leiter der Arbeitsgruppe, in der das Plasmid hergestellt wurde), 610 = laborinterne Nummerierung

wurde das Zellpellet in 100 µl Medium gelöst, vollständig auf eine Agarplatte mit ampicillinhaltigem Medium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Dadurch wurde das Wachstum der Zellen, die kein Plasmid aufgenommen hatten, unterdrückt.

#### **10.4.2 Expression der Repressor-Proteine und Aufschluss der Zellen**

Eine Kultur der frisch transformierten Zellen wurde zur Herstellung einer Übernachtskultur in 50 ml Medium suspendiert und bei 37 °C und 200 rpm auf einem Rundschtüttler inkubiert.

Die Anzucht der Zellen zur Expression des Proteins erfolgte in 3 x 1 Liter Medium in Schikanekolben bei 37°C und 200 rpm. Jeder Liter Medium wurde mit 10 ml der Übernachtskultur angeimpft und bei einer optischen Dichte von  $OD_{600} = 0,6$  mit IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mmol/L versetzt, um die Expression von TetR zu induzieren. Nach weiteren 3,5 Stunden Inkubation erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation (7500 g, 10 min, 4 °C). Nach einem Waschschrift mit 40 ml 4 °C kaltem Puffer (50 mmol/L NaCl in 20 mmol/L Phosphatpuffer, pH 6,6) und Resuspension in 40 ml Puffer konnten die Zellen durch eine Ultraschallbehandlung (5 x 30 s, 150 W) aufgeschlossen werden. Anschließend wurde die TetR-haltige Lösung durch eine Ultrazentrifugation (144.000 g, 1 h, 4 °C) von groben Zellbestandteilen getrennt. Der Überstand wurde mittels Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration weiter aufgereinigt.

#### **10.4.3 Isolierung und Aufreinigung der Repressor-Proteine**

Der erste Reinigungsschritt erfolgte mittels des starken Kationenaustauscher-Materials POROS<sup>®</sup> 20 HS-M. Der Zellextrakt wurde vollständig auf die Säule gegeben und mit einem NaCl-Gradienten von 0,05 mol/L bis 0,62 mol/L in Gegenwart eines 20 mmol/L Phosphatpuffers, pH 6,6 eluiert. Dabei wurden die eluierten Proteine in Fraktionen von je 6 ml aufgefangen. Der Verlauf der Chromatographie wurde über UV-Absorption bei 280 nm verfolgt.

Die TetR enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt, vereinigt und einer Ammoniumsulfat-Präzipitation unterworfen. Dabei wurde die Proteinlösung tropfenweise mit dem 1,5-fachen Volumen einer bei Raumtemperatur gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 versetzt, welches unter ständigem Rühren über eine peristaltische Pumpe zugegeben wurde. Das so präzipitierte Protein wurde abzentrifugiert (3500 g, 10 min, RT) und in insgesamt 10 ml Tris-Puffer (10 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, pH 8,0) gelöst.

Die anschließende Gelfiltration erfolgte an einer High Load superdex G 75-Säule. Die Säule besitzt ein maximales Ladevolumen von 5 ml, deshalb wurden zwei Säulen zur Trennung verwendet. Als Elutionspuffer diente ebenfalls der 10 mmol/L Tris-Puffer. Es wurde für jede Säule eine Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min verwendet und Fraktionen zu je 2 bzw. 3 ml gesammelt. Auch hier wurde der Verlauf der Chromatographie über eine UV-Detektion bei 280 nm beobachtet.

Die Fraktionen, welche das gesuchte Protein enthielten, wurden gesammelt und mittels Zentrifugationsfiltereinheiten mit einem Größenausschluss von 30 kDa auf ca. 2 ml eingengt (3500 g unterschiedliche Zeiten, 4 °C). Das Protein wurde im Verhältnis 2:3 mit glycerinhaltigem Lagerungspuffer verdünnt und bei -20 °C gelagert.

#### **10.4.4 SDS-Gelelektrophorese**

Die Proteinaufreinigung wurde mittels SDS-Gelelektrophorese verfolgt. Es wurden die Fraktionen untersucht, die nach den chromatographischen Schritten eine hohe UV-Absorption in den für TetR zu erwartenden Fraktionen zeigten. Dazu wurden Proben mit Auftragungspuffer im Verhältnis 4:6 (v/v) verdünnt. Jeweils 5 µl wurden auf das Gel aufgetragen und bei 150 V (entsprach ca. 200 A) getrennt. Als Größenstandard für den Bereich 10 – 150 kDa diente der Protein-Marker peqGOLD. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel mit 10 % Essigsäure und 45 % Methanol in Wasser für 10 Minuten gewaschen, 15 Minuten mit einer Coomassie-Färbelösung gefärbt und für 1 Stunde mit 10 %iger Essigsäure entfärbt.

#### **10.4.5 Photometrische Quantifizierung der Repressor-Proteine**

Die Quantifizierung erfolgte über UV-Absorption bei 280 nm. Da die Aminosäuresequenz des Proteins bekannt ist, können als Berechnungsgrundlage die Extinktionskoeffizienten nach Wetlauber [198] für Tryptophan von 5.700 und für Tyrosin von 1.300 dienen. In jedem Monomer des Repressor-Proteins sind 2x Tryptophan und 5x Tyrosin enthalten, wodurch sich ein Extinktionskoeffizient von 17.900 L/(mol\*cm) für jedes Monomer ergibt. Die Berechnung erfolgte also nach folgenden Formeln

$$c = \frac{A * VF * 1000}{\epsilon} [\text{mmol/l}] \quad [2]$$

$$\rho = \frac{A * VF * M_R}{\epsilon} [\text{mg/ml}] \quad [3]$$

c = Konzentration [mmol/L]

$\rho$  = Massenkonzentration [mg/ml]

A = Absorption (280 nm)

VF = Verdünnungsfaktor

$M_R$  = Molekulargewicht TetR (46.600 g/mol)

$\epsilon$  = Extinktionskoeffizient, Monomer (17.900) [L/(mol\*cm)]

Die Proteinlösungen wurden zur Bestimmung der UV-Absorption jeweils 1:25 und 1:50 in Lagerungspuffer (im Verhältnis 2:3 mit Puffer ohne Glycerin gemischt) verdünnt. Die Konzentration der Proteine wurde als Mittelwert beider Verdünnungen angegeben.

#### 10.4.6 Aktivitätstest

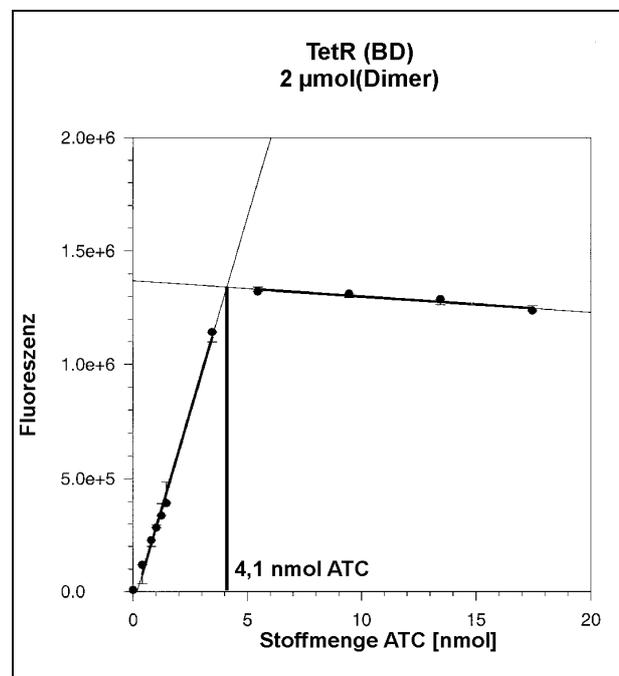
Die Aktivität der Repressor-Proteine wurde durch einen fluorimetrischen Test bestimmt. Grundlage dieses Testes bildet die Tatsache, dass an TetR gebundene Tetracycline stärker fluoreszieren als freie [18].

Dazu wurde eine Stoffmenge von 2  $\mu\text{mol}$  Protein in 1 ml Tris-Puffer (500 mmol/L Tris-HCl mit 25 mmol/L Magnesium, pH 7,4) in einer Küvette vorgelegt. Anschließend wurden die in Tabelle 10-2 angegebene Volumina einer 20 bzw. 200  $\mu\text{mol/L}$  Anhydrotetracyclin-Lösung (ATC) nacheinander zugegeben und nach jeweils dreiminütiger Inkubation die Fluoreszenz gemessen.

	Volumen ATC-Lösung [ $\mu\text{l}$ ]	Stoffmenge ATC in Küvette [nmol]
ATC (20 $\mu\text{mol/L}$ )	20	0,4
	20	0,8
	10	1,0
	10	1,2
	10	1,4
ATC (200 $\mu\text{mol/L}$ )	10	3,4
	10	5,4
	20	9,4
	20	13,4
	20	17,4

**Tabelle 10-2** Volumen der zum TetR pipettierten ATC-Lösung und Stoffmenge ATC in der Küvette zur Aktivitätsbestimmung der Repressor-Proteine

Die Messung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 455 nm und einer Emissionswellenlänge von 545 nm. Zur Auswertung wurde die gemessene Fluoreszenz gegen die Stoffmenge des Anhydrotetracyclins aufgetragen.



**Abbildung 10-1** Aktivitätstest am Beispiel des Repressor-Proteins TetR(BD)

Es ergeben sich zwei Geraden. Die ansteigende repräsentiert das noch nicht mit Anhydrotetracyclin abgesättigte Protein, die rechte, leicht abfallende Gerade zeigt an, dass hier alle Bindungsstellen des Proteins abgesättigt sind. Der Schnittpunkt beider Geraden entspricht demnach der Menge an Anhydrotetracyclin, welche nötig war, um alle Bindungsstellen im aktiven Protein abzusättigen. Da das TetR-Protein aus zwei Monomeren besteht, wovon jedes in der Lage ist, ein Tetracyclin-Molekül zu binden, entspricht die molare Konzentration an aktivem Dimer der Hälfte der ermittelten Monomer-Konzentration.

## 10.5 Herstellung der *tet*-Operatoren

Für die Entwicklung des Tetracyclin-Assays wurden unterschiedliche Varianten des *tetO1* ausprobiert. Diese wurden jeweils aus Einzelsträngen hergestellt, die von der Firma MWG-Biotech synthetisiert wurden. Dabei wurde die folgende 48 Basen umfassende Sequenz des *tetO1* und ein dazu komplementärer Strang, wie sie bei Kamionka [73] beschrieben sind, für die Herstellung der Operatoren verwendet:

5'-biotin-CCTAATTTTTGTTGAC **ACTCTATCA T TGATAGAGT** TATTTTACCATCT-3'

Die fettgedruckten Bereiche beschreiben den palindromen Bereich mit einem T in der Symmetrieachse des *tetO1*. Über die palindromen Bereiche (insgesamt 18 Basen) ist der Operator in der Lage, mit sich selbst einen Doppelstrang (annealen) und damit einen funktionsfähigen Operator zu bilden.

Das Annealing der in lyophilisierter Form gelieferten Oligonukleotide erfolgte in Anlehnung an Kamionka [73]. Zunächst wurden die einzelsträngigen DNA-Stränge jeweils mit Tris-Puffer (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mol/L NaCl, 0,1 mmol/L EDTA; pH 7,4) auf 100 µmol/L verdünnt. Diese wurden wie in Tabelle 10-3 angegeben miteinander gemischt.

<i>tetO</i> -Variante	Oligonukleotide	Volumen [ $\mu$ l]
„2x Biotin“	Oligo a	10
	Oligo a	10
„1x Biotin“	Oligo a	5
	Oligo b	45
„komplementär“	Oligo a	10
	Oligo c	10
„mixed“	Oligo a	10
	Oligo b	10

**Tabelle 10-3** Mischungsverhältnisse der zur Herstellung der *tetO*-Varianten benötigten Oligonukleotide

Anschließend erfolgte das Annealing in einem Thermocycler mit folgendem Temperaturprogramm:

Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Zeit [Minuten]
97	7
93	5
90	5
86	5
83	5
...	
20	5
-3	Ende

**Tabelle 10-4** Temperaturverlauf während des Annealing der jeweiligen *tetO*-Varianten

Die auf diese Weise hergestellten Operatoren wurden bei  $-20^{\circ}$ C gelagert.

## 10.6 SPR-Analyse

### Materialien und Geräte

Anlage zur Reinstwasserherstellung (Milli-Q plus, Millipore GmbH, Schwalbach)

Mikrotiterplatten und Autosamplergefäße (Biacore International AB, Uppsala, Schweden)

Sensorchip SA mit Streptavidin-Oberfläche (Biacore International AB, Uppsala, Schweden)

Sensorchip CM-5 mit Carboxymethyldextran-Oberfläche (Biacore International AB, Uppsala, Schweden)

Wasserbad (LKB Bromma, 2209 Multitemp, Bromma, Schweden)

Zentrifuge (Hermle Z 200A mit Rotor 220.96 V01, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen)

Zentrifuge (Megafuge 1.0R mit Rotor BS 4402/A, W.C. Heraeus GmbH, Hanau)

### Reagenzien und Lösungen

4-epi-Chlortetracyclin-HCl (Acros Organics, Geel, Belgien)

4-epi-Oxytetracyclin (Acros Organics, Geel, Belgien)

4-epi-Tetracyclin-HCl (Riedel-de-Haën, Seelze)

50 mM NaOH in 1 M NaCl

Acetonitril, HPLC grade (Fisher Scientific GmbH, Schwerte)

Amine coupling kit; beinhaltet Ethyldiaminopropylcarbodiimid (EDC), N-Hydroxysuccinimid (NHS) und Ethanolamin (Biacore International AB, Uppsala, Schweden)

Anhydrotetracyclin-HCl (Acros Organics, Geel, Belgien)

Chlortetracyclin-HCl (Fluka, Seelze)

Doxycyclin-HCl \* ½ H<sub>2</sub>O \* ½ Ethanol (Fluka, Seelze)

HBS-P-Puffer (10 mM 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure, 150 mM NaCl, 0,005 % Surfactant P-20; pH 7,4) (Biacore International AB, Uppsala, Schweden)

Laufpuffer (HBS-P-Puffer dotiert mit 5 mmol/L MgSO<sub>4</sub>)

MgSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O (Merck KGaA, Darmstadt)

Minocyclin-HCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & CoKG, Karlsruhe)

NaCl (Fluka, Seelze)

NaOH (Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe)

Oxytetracyclin-HCl (Fluka, Seelze)

Probenpuffer (HBS-P-Puffer dotiert mit 5 mmol/L MgSO<sub>4</sub> und 350 mmol/L NaCl)

Rolitetracyclin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & CoKG, Karlsruhe)

SDS (Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe)

Tetracyclin-HCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & CoKG, Karlsruhe)

### Software

Zur Auswertung der Daten, die mit dem SPR-Gerät Biacore Q<sup>®</sup> erhalten wurden, wurde die Biacore Evaluation Software, Version 1.0 verwendet. Quantifizierungen von Tetracyclin und Berechnungen der IB<sub>50</sub>-Konzentrationen der Kalibrierkurven wurden mit der BIAevaluation Software Version 3.1 durchgeführt. Zur Aufnahme der Daten standen – je nach SPR-Gerät – die Software Biacore Q Control Software, Version 3.0.3 und die Biacore 3000 Control Software, Version 3.1.1 zur Verfügung.

#### **10.6.1 Präparation der Sensorchips**

Um die Chips für die SPR-Messreihen verwenden zu können, musste zunächst der für den jeweiligen Assay-Aufbau benötigten Bindungspartner auf der Oberfläche immobilisiert werden.

Die Immobilisierung des Repressor-Proteins für den direkten Assay erfolgte auf einem CM-5 Chip. Hier wurde der Repressor chemisch immobilisiert. Um die Immobilisierung unter möglichst optimalen Bedingungen durchzuführen, sollte der pH-Wert des Immobilisierungspuffers zwischen pH 3,5 und dem isoelektrischen Punkt des Proteins liegen. Bei diesen Bedingungen weist die Carboxymethyl-dextran-Schicht des Sensorchips eine negativ geladene Oberfläche auf, während das Protein positiv geladen ist. Dadurch wird die Annäherung des Proteins zur Chipoberfläche gewährleistet, die für eine Immobilisierung nötig ist. Da der isoelektrische Punkt des Tet-Repressors nicht bekannt war, wurden verschiedene pH-Werte für den Immobilisierungspuffer getestet. Zu diesem Zweck wurden jeweils 100 µg/ml Protein in 10 mmol/L Natriumacetat-Puffer pH 4,0 und pH 5,0 gelöst. Zunächst wurden 20 µl der Lösung mit pH 4 mit einem Fluss von 5 µl/min über die unbehandelte Chipoberfläche gegeben. Die Injektion des Proteins zeigte unspezifische Wechselwirkungen mit der Oberfläche in Höhe von 17.587 RU. Das Protein konnte auch nach mehreren Versuchen mit unterschiedlichen Regenerationslösungen (Lösung B, U, I und 10 mmol/L Glycinpuffer pH 1 und 1,5) nicht wieder vollständig von der Chipoberfläche entfernt werden, um eine zur Immobilisierung unbelegte Oberfläche zu erhalten. Um eine so starke Anheftung des Proteins bei der Injektion der TetR-Lösung mit pH 5 zu vermeiden, wurde die Kontaktzeit mit der Chipoberfläche durch Erhöhung der Flussrate auf 100 ml/min von 4 Minuten (pH 4) auf 12 Sekunden (pH 5) verkürzt. Die Proteinlösung mit pH 5 brachte eine sehr geringe

Wechselwirkung mit der Chipoberfläche von 395 RU, so dass für die chemische Immobilisierung des Repressors der Acetatpuffer mit pH 4 gewählt wurde.

Die Immobilisierung erfolgte bei einem Fluss von 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  nach dem in Tabelle 10-5 angegebenen Protokoll. Der abschließende Regenerationsschritt mit Acetonitril/NaOH diente zum Ablösen nicht kovalent gebundenen Materials.

	Injektions- volumen	Lösung
Aktivierung der Oberfläche	35 $\mu\text{l}$	EDC/NHS-Mischung, frisch (1:1)
Immobilisierung	35 $\mu\text{l}$	Protein (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) / Na-Acetatpuffer (pH 4,0)
Deaktivierung	35 $\mu\text{l}$	Ethanolamin
Regeneration	3 x 5 $\mu\text{l}$	5 % Acetonitril in 2,5 mM NaOH

**Tabelle 10-5 Injektionsprotokoll für die Immobilisierung von TetR auf dem CM-5-Chip mit dem Amine coupling kit. Alle Lösungen wurden mit einer Flussgeschwindigkeit von 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  injiziert.**

Mit diesem Protokoll wurden die Flusszellen 2 und 3 mit TetR belegt. Dabei wurde eine Belegungsdichte bei Flusszelle 2 von 15.140 RU und bei Flusszelle 3 von 15.839 RU erreicht. Flusszelle 1 diente als Referenzzelle und wurde analog zu Tabelle 10-5 mit einer Pufferlösung ohne Protein behandelt.

Die Immobilisierung des biotinylierten *tetO*-Fragmentes erfolgt auf einem bereits mit Streptavidin vorbelegten SA-Chip. Dieser wurde gemäß Herstellerangaben vor der Immobilisierung 3 Mal hintereinander für jeweils 1 Minute mit 1 mol/L NaCl in 50 mmol/L NaOH behandelt. Anschließend wurde der Chip durch Injektion von Laufpuffer für 1 Minute gespült, um die NaOH/NaCl-Lösung vollständig zu entfernen. Die Operator-Lösung (100  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) wurde unmittelbar vor der Immobilisierung mit Laufpuffer auf eine Konzentration von 20 nmol/L verdünnt und mit einem Fluss von 4  $\mu\text{l}/\text{min}$  injiziert. Die Injektionszeit richtete sich nach dem gewünschten Immobilisierungslevel. Standardmäßig wurde der Operator für 10 Minuten injiziert, was zu einem Immobilisierungslevel von rund 1100 RU führte. Im Anschluss an die *tetO*-Injektion wurde der Chip für jeweils eine Minute mit 0,3 % SDS in Laufpuffer gefolgt von 2 x Laufpuffer gespült, um nicht gebundenen *tetO* von der Chipoberfläche zu entfernen. Mit Ausnahme der *tetO*-Injektion wurden alle Injektionen mit einem Fluss von 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  durchgeführt.

### 10.6.2 Belegung des chipgebundenen *tetO* mit TetR

Zur Belegung des chipgebundenen Operators mit TetR wurde eine Lösung von 1  $\mu\text{mol/L}$  des Proteins in Laufpuffer verwendet. Diese wurde für jede Messreihe frisch verdünnt und für 120 Sekunden mit einer Flussgeschwindigkeit von 5  $\mu\text{l/min}$  injiziert.

### 10.6.3 Ermittlung geeigneter Regenerationsbedingungen

Die Regenerationsbedingungen wurden nach Andersson [176; 177] ermittelt. Es wurden verschiedene Kombinationen von 6 Regenerations-Stammlösungen analysiert. Dazu wurde der Chip zunächst mit 1  $\mu\text{mol/L}$  TetR belegt (Injektion: 5  $\mu\text{l/min}$ , 120 s). Anschließend wurde nach Abschnitt 10.6.4.3 (Seite 176) vorbereiteter Honig injiziert (5  $\mu\text{l/min}$ , 120 s) und die Chipoberfläche mit der jeweiligen Regenerationslösung regeneriert. Die Regenerationskraft der Lösung wurde berechnet als die Menge an TetR/Matrix, die durch die Regeneration vom Chip gelöst werden konnte bezogen auf die Menge, die sich vor der Regeneration auf dem Chip befunden hat (siehe auch Abschnitt 6.7, Seite 78).

Als Ausgangslösungen wurden die im Folgenden aufgeführten Mischungen hergestellt. Die dafür erforderlichen Chemikalien wurden alle von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH & CoKG (Karlsruhe), von Fluka (Seelze) oder von der Carl Roth GmbH & CoKG (Karlsruhe) bezogen.

Acidic (A): Oxalsäure (0,15 mol/L)  
Phosphorsäure (0,15 mol/L)  
Ameisensäure (0,15 mol/L)  
Malonsäure (0,15 mol/L)

Lösungen in Reinstwasser herstellen, zu gleichen Teilen (v/v) mischen und mit 4 mol/L NaOH auf pH 5,0 einstellen.

Basic (B): Ethanolamin (0,2 mol/L)  
Trinatriumphosphat (0,2 mol/L)  
Glycin (0,2 mol/L)

Lösungen in Reinstwasser herstellen, zu gleichen Teilen (v/v) mischen und mit 2 mol/L HCl auf pH 9,0 einstellen.

Ionic (I): Kaliumthiocyanat (0,46 mol/L)  
Magnesiumchlorid (1,83 mol/L)  
Harnstoff (0,92 mol/L)  
Guanidin-HCl (1,83 mol/L)

Lösung herstellen (in Reinstwasser).

Non-polar (U): Dimethylsulfoxid (DMSO)  
Formamid  
Ethanol  
Acetonitril  
n-Butanol

Zu gleichen Teilen (v/v) mischen.

Detergent (D): CHAPS (3-[(3-Chloramidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat)  
(0,3 %, w/v)  
Zwittergent 3-12 (3-Dodecyl-dimethylamino-propan-1-sulfonat) (0,3 %, w/v)  
Tween 80 (0,3 %, v/v)  
Tween 20 (0,3 %, v/v)  
Triton X-100 (0,3 %, v/v)

Lösung herstellen (in Reinstwasser).

SDS (S): Sodiumdodecylsulfat (SDS) (0,3 %, w/v)

Lösung herstellen (in Laufpuffer).

Jede dieser Stammlösungen wurde zu einem 3-Komponentensystem mit entweder einer anderen Stammlösungen und einem Anteil Wasser (w) oder mit 2 Teilen Wasser gemischt. Dabei wurden die Kombinationen BI<sub>w</sub>, BU<sub>w</sub>, IS<sub>w</sub> und IU<sub>w</sub> nicht in das SPR-System injiziert, da diese Mischungen entweder ausfallen (BI<sub>w</sub>, BU<sub>w</sub>, IS<sub>w</sub>) oder Mischungen ergeben, die die Chipoberfläche angreifen (IU<sub>w</sub>) [176]. Alle anderen Kombinationen wurden getestet.

Zusätzlich zu den oben angegebenen Lösungen wurde das Regenerationsvermögen von 50 mmol/L NaOH in 1 mol/L NaCl, einer 20 mmol/L EDTA-Lösung und einer 0,5 %igen SDS-Lösung (w/v) in Laufpuffer geprüft. Dazu wurden diese Lösungen in 6 aufeinander-

folgenden Zyklen sowohl mit Puffer (Zyklus 1-3), als auch mit entfetteter, 1/5 verdünnter UHT-Milch (Zyklus 4-6) getestet.

Alle Regenerationslösungen wurden zunächst mit einer Flussgeschwindigkeit von 5 µl/min für 120 Sekunden injiziert. Nachdem sich herausgestellt hatte, dass SDS trotz seiner Eigenschaft, sich in die Chipmatrix einzulagern für die Regeneration verwendet werden musste, wurden die Injektionsbedingungen so verändert, dass eine möglichst kurze Kontaktzeit des SDS mit der Chipoberfläche bei vollständiger Regeneration erreicht werden konnte. Für die folgenden Messreihen wurde SDS mit einer Flussgeschwindigkeit von 20 µl/min für 15 Sekunden injiziert. Um das SDS schneller aus der Chipmatrix zu entfernen wurde anschließend für 60 Sekunden und 20 µl/min Probenpuffer injiziert.

#### **10.6.4 Analyse von Rohmilch und Honig**

##### **10.6.4.1 Dotierung der Proben**

Für die Dotierung von Rohmilch- und Honigproben wurden Stammlösungen von 1 mg/ml Tetracyclin in Probenpuffer (Tetracyclin-HCl, Oxytetracyclin-HCl, Doxycyclin-HCl \* ½ H<sub>2</sub>O \* ½ Ethanol) oder in Reinstwasser (Chlortetracyclin-HCl<sup>6</sup>) hergestellt, die für maximal 1 Woche bei 4 °C gelagert wurden. Diese wurden für jede Analysenreihe frisch in der jeweiligen Matrix verdünnt, um Arbeitslösungen im Konzentrationsbereich von 100 bis 100.000 µg/kg Tetracyclin zu erhalten.

Ein Milliliter rückstandsfreie Rohmilch wurde mit tetracyclinhaltiger Arbeitslösung (maximal 20 µl) versetzt und auf dem Vortex gemischt. Anschließend erfolgte die Probenaufarbeitung gemäß Abschnitt 10.6.4.2 (Seite 176).

Für Honigproben wurde 1 g Honig in ein 15 ml Probengefäß eingewogen und in 10 g Probenpuffer gelöst. Bekannte Volumina (maximal 500 µl) der tetracyclinhaltigen Arbeitslösungen wurden auf der Waage zu den Honig-Lösungen gegeben und die Verdünnung wurde über das Gesamtgewicht (Honig + Probenpuffer + Dotierlösung) berechnet. Zum vollständigen Lösen wurden die Proben sowohl auf einem Schüttler als auch auf einem Vortex gemischt. Die weitere Behandlung der Proben ist in Abschnitt 10.6.4.3 (Seite 176) beschrieben.

---

<sup>6</sup> Chlortetracyclin-HCl war in Probenpuffer nicht lösbar.

#### **10.6.4.2 Rohmilchproben**

Für die Untersuchungen stand eine Tank-Milch der Forschungsfarm „De Tolakker“ der Universität Utrecht (Institute for Risk Assessment Sciences), Niederlande zur Verfügung. Die Untersuchungen von Rohmilchproben unterschiedlicher Kühe wurden mit Gemelken einzelner Kühe und einer Tank-Milch eines Landwirtes aus Großenlüder-Müs durchgeführt. Die Lagerung der Rohmilch erfolgte bei  $-20\text{ °C}$ .

Die nach 10.6.4.1 (Seite 175) dotierten Rohmilchproben wurden zunächst durch Zentrifugation (4.000 g, 10 min,  $4\text{ °C}$ ) entfettet. Die entfettete Rohmilch wurde mit Probenpuffer im Verhältnis 1:5 (v/v) verdünnt und anschließend zur Verringerung von Matrixinterferenzen für 5 Minuten im Wasserbad auf  $95\text{ °C}$  erhitzt. In einem zweiten Zentrifugationsschritt (18.000 g, 15 min, RT) wurden denaturierte Proteine abgetrennt und der Überstand zur SPR-Analyse verwendet.

Unspezifische Bindungen von Milchkomponenten mit der Chipoberfläche wurden durch Injektion von undotierten Milchproben analysiert.

Um den Effekt der Lyophilisation von Rohmilch auf den Assay zu testen, wurden jeweils  $500\text{ }\mu\text{l}$  der dotierten Rohmilchproben mit flüssigem Stickstoff eingefroren und über Nacht lyophilisiert. Die Lagerung dieser Proben erfolgte bei  $4\text{ °C}$  für maximal 5 Tage. Zur Rekonstitution wurde das den Proben zuvor entzogenen Wasser wieder zugesetzt, auf dem Vortex gemischt, für 8 Minuten im Wasserbad bei  $45\text{ °C}$  gehalten und erneut gemischt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter Abschnitt 10.6.4.2 (Seite 176) beschrieben.

#### **10.6.4.3 Honigproben**

Nach der Dotierung und der Verdünnung des Honigs wurden die Proben zentrifugiert (350 g, 15 min, RT), um Pollen und andere Partikel zu entfernen. Der Überstand wurde ohne weitere Aufarbeitung zur SPR-Analyse verwendet.

Unspezifische Bindungen von Honigkomponenten mit der Chipoberfläche wurden durch Injektion von undotierten Honigen analysiert.

Die Bestimmung von Entscheidungsgrenze ( $CC_{\alpha}$ ) und Nachweisvermögen ( $CC_{\beta}$ ) erfolgte gemäß der Entscheidung 2000/657/EG [76] durch die Analyse von 20 unterschiedlichen Honigen. Die hierfür verwendeten Honige sind in Tabelle 10-6 aufgelistet.

Num- mer	Honig, laut Deklaration	Her- kunft
1	Honig klar, Spar Select, Moerdejk, Holland	1
2	Orangenblütenhonig, Fa. Biophar, Fürsten Reform, Dr. med. Hans Plümer Nachf., 38110 Braunschweig	1
3	Waldhonig, Fa. Biophar, Fürsten Reform, Dr. med. Hans Plümer Nachf., 38110 Braunschweig	1
4	unverarbeiteter Blütenhonig	2
5	Imker Auslese, Fa. Biophar, Fürsten Reform, Dr. med. Hans Plümer Nachf., 38110 Braunschweig	1
6	Blütenhonig, naturrein, Fa. Mühlenbach, Gunz Warenhandels GmbH, Im Hau 23, 6841 Mäder, Österreich	3
7	Farigola Mel Crua (Thymianhonig), Fa. Mel de Ca Nostra, Toni Cerdà, carter Font 70, Lluçmajor, Spanien	3
8	Eukalyptus Honig, Fa. C'est bon:, Amsterdam, Niederlande	1
9	Rapshonig, Imker: Armin Popperl, Ahornweg 2, 72776 Altbach	4
10	Waldhonig aus Süd/Mittelamerika und Mittelmeerraum, Fa Maribel, hergestellt für Lidl Stiftung & Co KG, 74167 Neckarsulm	1
11	Bienenhonig, Darbo Honig, „echter ausländischer Bienenhonig“ Mischung aus EG-Ländern und nicht EG-Ländern, A-6135 Stans/Tirol	1
12	Frühlingsblüte, Imkerei: Bienegarten, Winzenheimer Str. 35, 55595 Hargesheim	1
13	Sommerblüten mit Akazienhonig, Imker-Auslese, Flotte Biene, Fa. Langnese Honig KG, 22933 Bargeheide	1
14	Gebirgsblütenhonig, Imker-Auslese, Flotte Biene, Fa. Langnese Honig KG, 22933 Bargeheide	1
15	Waldhonig aus biologisch-ökologischer Imkerei, Honig-Wernet GmbH, 79183 Waldkirch, Schwarzwald	3
16	Imker Honig, Fa. Biophar	1
17	Sonnenblumen Honig (Extra feine Auslese), Immenhof Naturprodukte, 81735 München	3
18	Bio Akazienhonig aus biologisch-ökologischer Imkerei, Honig-Wernet GmbH, 79183 Waldkirch, Schwarzwald	3
19	Sommerblütenhonig	5
20	Frühlingsblütenhonig	5
21	Zitronenhonig, Imkerei: Uwe Paletta, Auf den Pöthen 43, 42553 Velbert-Neviges	3

**Tabelle 10-6 Honigproben zur Ermittlung von Entscheidungsgrenze und Nachweisvermögen. Herkunft: 1 = Einzelhandel, 2 = freundlichst zur Verfügung gestellt von T. McGrath, Xenosense, Belfast, 3 = Internethandel, 4 = Honig vom Deutschen Imker Bund (DIB) (vom Imker direkt bezogen), 5 = freundlichst zur Verfügung gestellt von Dr. J. Lamar.**

Die Lagerung der Honigproben erfolgte bei Raumtemperatur.

Die Honige 2 bis 21 wurden wie unter 10.6.4.3 (Seite 176) beschrieben aufgearbeitet und undotiert vermessen. Zur Berechnung von  $CC_{\alpha}$  [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] wurde eine Kalibrierkurve in Honig 1 im Konzentrationsbereich von 0 bis 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  erstellt. Die Berechnung der Entscheidungsgrenze [RU] erfolgte nach folgender Formel:

$$CC_{\alpha} = \bar{x} - 3 * s \quad [4]$$

wobei  $\bar{x}$  den Mittelwert der Messwerte der Honige 2 bis 21 und  $s$  die Standardabweichung dieser Werte darstellt. Das Nachweisvermögen  $CC_{\beta}$  [RU] kann aus dem gleichen Lauf nach folgender Formel berechnet werden

$$CC_{\beta} = CC_{\alpha} - 1,64 * s . \quad [5]$$

Erfahrungsgemäß erfüllt die so berechnete Entscheidungsgrenze bei Quantifizierungen von Analyten mit sehr geringem Gehalt nicht die Anforderungen einer maximalen Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %, wie sie in der Entscheidung 2000/657/EG [76] gefordert wird [183]. Deshalb wurde eine zweite Messreihe zur Ermittlung der wahren Entscheidungsgrenze durchgeführt. Hierzu wurden die Honigproben 2 bis 21 mit 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Tetracyclin dotiert. Auch bei dieser Messreihe wird eine Kalibrierung im Konzentrationsbereich von 0 bis 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in Honig 1 mitgeführt. Über diese Kalibrierung wurde jede der dotierten Honigproben quantifiziert und mit der zuvor bestimmten Entscheidungsgrenze verglichen. Gemäß den Forderungen der Entscheidung 2000/657/EG müssen mindestens 19 der 20 Honigproben (entspricht 95 %) einen Gehalt oberhalb von  $CC_{\alpha}$  aufweisen.

#### 10.6.4.4 Bestimmung der Kreuzreaktivität

Die Kreuzreaktivität der Tetracycline wurde in Honig bestimmt. Sie wurde auf Tetracyclin bezogen angegeben. Dazu wurde von den Tetracyclin Oxytetracyclin, Tetracyclin, Chlortetracyclin und Doxycyclin eine Kalibrierkurve mit Gehalten von 0 bis 15.000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  aufgenommen. Das Signal jeder Kalibrierkurve, das einer 50 %igen Ablösung von gebundenem TetR entspricht (=  $IB_{50}$ -Konzentration), wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$IB_{50} [\text{RU}] = \frac{(\Delta \text{RU}_{(15.000)} - \Delta \text{RU}_{(0)})}{2} + \Delta \text{RU}_{(0)} \quad [6]$$

wobei  $\Delta \text{RU}_{(15.000)}$  und  $\Delta \text{RU}_{(0)}$  die bestimmten  $\Delta \text{RU}$ -Werte bei der höchsten und niedrigsten Tetracyclin-Konzentration darstellen. Der erhaltene  $IB_{50}$ -Wert der Tetracyclin-Kalibrierkurve [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] wurde als Bezugswert genutzt und die anderen  $IB_{50}$ -Konzentrationen prozentual angegeben.

### 10.6.5 Lagerung der mit *tetO* belegten Chips

Die Messreihen am Biacore 3000<sup>®</sup> erfolgten immer innerhalb einer Woche. Dabei wurden die Sensorchips kontinuierlich ohne Ausbau vermessen.

Während der Messungen am Biacore Q<sup>®</sup> mussten zuvor mit *tetO* belegte Sensorchips für routinemäßige Reinigungsläufe oder wenn mit anderen Chips gemessen werden sollten ausgebaut und gelagert werden. Dazu wurden die Chips aus ihrer Kunststoff-Schutzhülle herausgeholt und die Chip-Oberfläche mit entionisiertem Wasser abgespült. Anschließend wurde die Oberfläche im Stickstoffstrom getrocknet und der Chip zurück in seine Schutzhülle geschoben. Die Lagerung erfolgte über Trockenmittel in 50 ml Greiner-Röhrchen bei 4 °C im Kühlschrank.

Vor dem Wiedereinbau erfolgte keine erneute Reinigung oder Behandlung der Chipoberfläche.

## 11 Abkürzungsverzeichnis

s	Standardabweichung
$\bar{x}$	Mittelwert
ACE	Affinitäts-Kapillarelektrophorese (engl.: affinity capillary electrophoresis)
ADI	acceptable daily intake
AK	Antikörper
APCI	atmospheric pressure chemical ionisation
ATC	Anhydrotetracyclin
ATCC	American type culture collection
CC <sub>α</sub>	Entscheidungsgrenze
CC <sub>β</sub>	Nachweisvermögen
CM	Carboxymethyldextran
CTC	Chlortetracyclin
Da	Dalton
DAD	Dioden-Array-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DIB	Deutscher Imkerbund
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDC	Ethylldiaminopropylcarbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ESI	electrospray ionisation
FAB	fast atom bombardment
FAO	Food and Agriculture Organisation
Fc	flow cell
FPLC	fast protein liquid chromatography
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
HBS-P	HEPES gepufferte Kochsalzlösung mit Surfactant P 20
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	high performance liquid chromatography

---

HPTLC	high thin layer chromatography
HRP	horse radish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IB <sub>50</sub>	Tetracyclin-Konzentration bei 50 %iger TetR-Ablösung
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
LFBG	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
min	Minute
MRL	maximum residue limit
MS	Massenspektrometrie
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen
OTC	Oxytetracyclin
psi	pound per square inch
PB	particle beam
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RP	reversed phase
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RTC	Rolitetracyclin
RU	response units
SDS	sodium dodecylsulfat
s	Sekunde
SPE	solid phase extraction
SPR	surface plasmon resonance (Oberflächenplasmonresonanz)
SP-Welle	surface plasmon-Welle
TC	Tetracyclin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tet(M)	ribosomales Schutzprotein
<i>tetO</i>	Gensequenz des Tetracyclin-Operators
TetR	Tetracyclin-Repressor-Protein
TMB	Tetramethylbenzidin
v	Volumen
w	Wasser
WHO	World Health Organisation

## 12 Literatur

- [1] Michalova E, Novotna P, Schlegelova J (2004) *Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them*, Vet Med - Czech **29**: 79-100.
- [2] FEDESA (1998) Dtsch Tierärztebl **11**: 1093.
- [3] Nelson M, Hillen W, Greenwald RA (2001) *Tetracyclines in biology, chemistry and medicine*, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin,
- [4] Verordnung (EG) Nr. 281/96 der Kommission 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 tierischer Herkunft ABl. L 37: 9-11
- [5] Verordnung (EG) Nr. 1000/98 der Kommission zur Änderung der Anhänge I und II der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs ABl. L 142: 18-21
- [6] Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln in der Fassung vom 11.12.1998 (BGBl. I S. 3586), geändert am 1.09.2005 (BGBl I S. 2618, 2655)
- [7] Duggar BM (1948) *Aureomycin*, Ann NY Acad Sci **51**: 177-181.
- [8] Hochstein F, Stephens C, Conover L, Regna P, Pasternack R, Brunings K, Woodward R (1953) *The structure of Terramycin*, J Am Chem Soc **75**: 5455-5475.
- [9] Stephens C, Conover L, Pasternack R, Hochstein F, Moreland W, Regna P, Pilgrim F (1954) *The structure of Aureomycin*, J Am Chem Soc **75**: 3568-3575.
- [10] Conover L, Moreland W, English A, Stephens C, Pilgrim F (1953) *Terramycin XI Tetracycline*, J Am Chem Soc **75**: 462.
- [11] Chopra I, Roberts M (2001) *Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance*, Microbiol Mol Biol Rev **65**: 232-260.
- [12] Dürckheimer W (1975) *Tetracyclines: chemistry, biochemistry, and structure-activity relations*, Angew Chem Int Ed Engl **14**: 721-734.
- [13] Mitscher LA (1978) *Medicinal Research in The Chemistry of the Tetracycline Antibiotics*. Ed.: Grunewald GL. Marcel Dekker Inc., New York; 9th edition,
- [14] Hussar DA, Niebergall PJ, Sugita ET, Doluisio JT (1968) *Aspects of the epimerization of certain tetracycline derivatives*, J Pharm Pharmacol **20**: 539-546.
- [15] Remmers EG, Sieger GM, Doerschuk AP (1963) *some observations on the kinetics of the C4-epimerization of tetracycline*, J Pharm Sci **52**: 752-756.
- [16] Qiang ZM, Adams C (2004) *Potentiometric determination of acid dissociation constants (pK(a)) for human and veterinary antibiotics*, Water Res **38**: 2874-2890.
- [17] Oliva B, Gordon G, McNicholas P, Ellestad G, Chopra I (1992) *Evidence that tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome cause lysis of Escherichia coli*, Antimicrob Agents Chemother **36**: 913-919.

- [18] Schneider S, Schmitt MO, Brehm G, Reiher M, Matousek P, Towrie M (2003) *Fluorescence kinetics of aqueous solutions of tetracycline and its complexes with Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>*, *Photochem Photobiol Sci* **2**: 1107-1117.
- [19] Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K (2001) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Urban & Fischer, München, Jena, 8th edition,
- [20] Agwuh KN, MacGowan A (2006) *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycyclines*, *J Antimicrob Chemother* **58**: 256-265.
- [21] Somogyi A (1982) *Gesundheitliche Bedeutung von Rückständen pharmakologisch wirksamer Substanzen in der Tierhaltung*, *Bundesgesundhbl* **25**: 365-370.
- [22] Chopra I (2003) *Tetracyclines in Antibiotic and Chemotherapy - Anti-infective agents and their use in therapy*. Finch RG, Greenwood D, Norrby SR and Whitley RJ. Churchill Livingstone, Edinburgh; 8th
- [23] Kucers A, McK Bennett N (1987) *The use of antibiotics*, Heinemann Medical, Oxford, 4th edition,
- [24] Eisner HJ, Stirn FE, Dornbusch AC, Oleson JJ (1953) *The enhancement of serum levels of aureomycin in experimental animals*, *J Pharmacol Exp Ther* **108**: 442-449.
- [25] WHO (1998) *Food Additives Series 41*, Geneva, [www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v041je07.htm](http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v041je07.htm).
- [26] Kelly RG, Kanegis LA (1967) *Tissue distribution of tetracycline and chlortetracycline in the dog*, *Toxicol Appl Pharmacol* **11**: 114-120.
- [27] Milch RA, Rall DP, Tobie JE (1958) *Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone*, *J Bone Joint Surg Am* **40-A**: 897-910.
- [28] Kline AH, Blattner RJ, Lunin M (1964) *Transplacental effect of tetracyclines on teeth*, *Jama* **188**: 178-180.
- [29] Eisner HJ, Wulf RJ (1963) *The metabolic fate of chlortetracycline and some comparisons with other tetracyclines*, *J Pharmacol Exp Ther* **142**: 122-131.
- [30] Zurhelle G, Petz M, Mueller-Seitz E, Siewert E (2000) *Metabolites of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline and their distribution in egg white, egg yolk, and hen plasma*, *J Agric Food Chem* **48**: 6392-6396.
- [31] Kennedy DG, McCracken RJ, Carey MP, Blanchflower WJ, Hewitt SA (1998) *Iso- and epi-iso-chlortetracycline and the principal metabolites of chlortetracycline in the hen's egg*, *J Chromatogr A* **812**: 327-337.
- [32] Kennedy DG, McCracken RJ, Hewitt SA, McEvoy JD (1998) *Metabolism of chlortetracycline: drug accumulation and excretion in the hen's egg*, *Analyst* **123**: 2443-2447.
- [33] Zurhelle G (2000) *Entwicklung und Anwendung einer automatisierten HPLC-Methode mit gekoppelter on-line Dialyse: Metabolismus, Verteilung und Elimination dreier Tetracycline bei Legehennen*, Dissertation, Bergische Universität, Wuppertal.
- [34] Böcker RH, Peter R, Machbert G, Bauer W (1991) *Identification and determination of the two principal metabolites of minocycline in humans*, *J Chromatogr* **568**: 363-374.

- [35] Nelis HJ, De Leenheer AP (1982) *Metabolism of minocycline in humans*, Drug Metab Dispos **10**: 142-146.
- [36] Böcker R (1983) *Analysis and quantitation of a metabolite of doxycycline in mice, rats, and humans by high-performance liquid-chromatography*, J Chromatogr **274**: 255-262.
- [37] WHO *Food Additives Series 36*, Geneva, [www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v36je06.htm](http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v36je06.htm).
- [38] Chopra I, Hawkey PM, Hinton M (1992) *Tetracyclines, molecular and clinical aspects*, J Antimicrob Chemother **29**: 245-277.
- [39] Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung ABl. L 268: 29-43
- [40] Yamaguchi A, Ohmori H, Kaneko-Ohdera M, Nomura T, Sawai T (1991) *Delta pH-dependent accumulation of tetracycline in Escherichia coli*, Antimicrob Agents Chemother **35**: 53-56.
- [41] Schnappinger D, Hillen W (1996) *Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms*, Arch Microbiol **165**: 359-369.
- [42] Chopra I (1985) *The Tetracyclines* in Handbook of Experimental Pharmacology. Springer-Verlag, 78,
- [43] Nikaido H, Thanassi DG (1993) *Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples*, Antimicrob Agents Chemother **37**: 1393-1399.
- [44] Pioletti M, Schlünzen F, Harms J, Zarivach R, Glühman M, Avila H, Bashan A, Bartels H, Auerbach T, Jacolbi C, Hartsch T, Yonath A, Franceschi F (2001) *Crystal structure of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine, IF3*, EMBO J **20**: 1829-1839.
- [45] Kolesnikov IV, Protasova NY, Gudkov AT (1996) *Tetracyclines induce changes in accessibility of ribosomal proteins to proteases*, Biochimie **78**: 868-873.
- [46] Strel'tsov SA, Kukhanova MK, Gurskii GV, Kraevskii AA, Beliavskaia IV, Viktorova LS, Trebogonov AD, Gottikh BP (1975) *Binding of hydroxtetracycline to E. coli ribosomes*, Molecular Biology **9**: 729-738.
- [47] Brodersen DE, Clemons WM, Jr., Carter AP, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V (2000) *The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit*, Cell **103**: 1143-1154.
- [48] Auerbach T, Bashan A, Harms J, Schlunzen F, Zarivach R, Bartels H, Agmon I, Kessler M, Pioletti M, Franceschi F, Yonath A (2002) *Antibiotics targeting ribosomes: crystallographic studies*, Curr Drug Targets Infect Disord **2**: 169-186.
- [49] EMEA summary report (2), Doxycycline (1997), [www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/027097en.pdf](http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/027097en.pdf)
- [50] EMEA summary report (3), Oxytetracycline, Tetracycline, Chlortetracycline (1995) [www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/Tetracyclines\(3\)02359.pdf](http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/Tetracyclines(3)02359.pdf)
- [51] Dietz DD, Abdo KM, Haseman JK, Eustis SL, Huff JE (1991) *Comparative toxicity and carcinogenicity studies of tetracycline and oxytetracycline in rats and mice*, Fundam Appl Toxicol **17**: 335-346.

- [52] Roberts MC (2003) *Tetracycline therapy: update*, Clin Infect Dis **36**: 462-467.
- [53] Lima AA, Lima NL, Pinho MC, Barros Junior EA, Teixeira MJ, Martins MC, Guerrant RL (1995) *High frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, streptomycin, chloramphenicol, and tetracycline isolated from patients with shigellosis in northeastern Brazil during the period 1988 to 1993*, Antimicrob Agents Chemother **39**: 256-259.
- [54] Roberts MC (2005) *Update on acquired tetracycline resistance genes*, FEMS Microbiol Lett **245**: 195-203.
- [55] Yamaguchi A, Iwasakiohba Y, Ono N, Kanekoohdera M, Sawai T (1991) *Stoichiometry of metal-tetracycline/H<sup>+</sup> antiport mediated by transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein in Escherichia coli*, Febs Letters **282**: 415-418.
- [56] Eckert B, Beck CF (1989) *Overproduction of transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein results in cell-death and loss of membrane-potential*, J Bacteriol **171**: 3557-3559.
- [57] Saenger W, Orth P, Kisker C, Hillen W, Hinrichs W (2000) *The tetracycline repressor - a paradigm for a biological switch*, Angew Chem Int Ed Engl **39**: 2042-2052.
- [58] Teo JW, Tan TM, Poh CL (2002) *Genetic determinants of tetracycline resistance in Vibrio harveyi*, Antimicrob Agents Chemother **46**: 1038-1045.
- [59] Schwarz S, Cardoso M, Wegener HC (1992) *Nucleotide sequence and phylogeny of the tet(L) tetracycline resistance determinant encoded by plasmid pSTE1 from Staphylococcus hyicus*, Antimicrob Agents Chemother **36**: 580-588.
- [60] Wang Y, Rotman ER, Shoemaker NB, Salyers AA (2005) *Translational control of tetracycline resistance and conjugation in the Bacteroides conjugative transposon CTnDOT*, J Bacteriol **187**: 2673-2680.
- [61] Hoshino T, Ikeda T, Tomizuka N, Furukawa K (1985) *Nucleotide sequence of the tetracycline resistance gene of pTHT15, a thermophilic Bacillus plasmid: comparison with staphylococcal TcR controls*, Gene **37**: 131-138.
- [62] Speer BS, Bedzyk L, Salyers AA (1991) *Evidence that a novel tetracycline resistance gene found on two Bacteroides transposons encodes an NADP-requiring oxidoreductase*, J Bacteriol **173**: 176-183.
- [63] Diaz-Torres ML, McNab R, Spratt DA, Villedieu A, Hunt N, Wilson M, Mullany P (2003) *Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome*, Antimicrob Agents Chemother **47**: 1430-1432.
- [64] Nonaka L, Suzuki S (2002) *New Mg<sup>2+</sup>-dependent oxytetracycline resistance determinant tet 34 in Vibrio isolates from marine fish intestinal contents*, Antimicrob Agents Chemother **46**: 1550-1552.
- [65] Orth P (1998) *Der Regulationsmechanismus des Tetrazyklin-Repressors*, Dissertation, Freie Universität, Berlin.
- [66] Hinrichs W, Kisker C, Duvel M, Muller A, Tovar K, Hillen W, Saenger W (1994) *Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance*, Science **264**: 418-420.

- [67] Orth P, Schnappinger D, Sum PE, Ellestad GA, Hillen W, Saenger W, Hinrichs W (1999) *Crystal structure of the tet repressor in complex with a novel tetracycline, 9-(N,N-dimethylglycylamido)-6-demethyl-6-deoxy-tetracycline*, J Mol Biol **285**: 455-461.
- [68] Scholz O, Köstner M, Reich M, Gastiger S, Hillen W (2003) *Teaching TetR to recognize a new inducer*, J Mol Biol **329**: 217-227.
- [69] Scholz O, Schubert P, Kintrup M, Hillen W (2000) *Tet repressor induction without Mg<sup>2+</sup>*, Biochemistry **39**: 10914-10920.
- [70] Takahashi M, Altschmied L, Hillen W (1986) *Kinetic and equilibrium characterization of the Tet repressor-tetracycline complex by fluorescence measurements. Evidence for divalent metal ion requirement and energy transfer*, J Mol Biol **187**: 341-348.
- [71] Ettner N, Metzger JW, Lederer T, Hulmes JD, Kisker C, Hinrichs W, Ellestad GA, Hillen W (1995) *Proximity mapping of the Tet repressor-tetracycline-Fe<sup>2+</sup> complex by hydrogen peroxide mediated protein cleavage*, Biochemistry **34**: 22-31.
- [72] Orth P, Schnappinger D, Hillen W, Saenger W, Hinrichs W (2000) *Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system*, Nat Struct Biol **7**: 215-219.
- [73] Kamionka A, Bogdanska-Urbaniak J, Scholz O, Hillen W (2004) *Two mutations in the tetracycline repressor change the inducer anhydrotetracycline to a corepressor*, Nucleic Acids Res **32**: 842-847.
- [74] Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Lebensmitteln tierischen Ursprungs ABl. L 224: 1-8
- [75] Gesetz zur Neuordnung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts (LFBG) in der Fassung vom 1.09.2005 (BGBl. I. S. 2618)
- [76] Entscheidung 2002/657/EG von der Kommission zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysenmethoden und die Auswertung von Ergebnissen vom 12.08.2002, ABl. 221, S. 8
- [77] Barker SA, Walker CC (1992) *Chromatographic methods for tetracycline analysis in foods*, J Chromatogr **624**: 195-209.
- [78] Anderson CR, Rupp HS, Wu WH (2005) *Complexities in tetracycline analysis - chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography*, J Chromatogr A **1075**: 23-32.
- [79] Oka H, Ito Y, Matsumoto H (2000) *Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods*, J Chromatogr A **882**: 109-133.
- [80] Produktinformation BRT-Hemmstofftestsysteme, Analytik in Milch, Produktions- und Vertriebs-GmbH, München, Deutschland, [www.aim-bayern.de/deutsch/produkte/index.htm](http://www.aim-bayern.de/deutsch/produkte/index.htm)
- [81] Produktinformation Delvotest, DSM Food Specialities, Delft, Niederlande, [www.dsm.com/le/en\\_US/delvotest/html/home/htm](http://www.dsm.com/le/en_US/delvotest/html/home/htm)
- [82] Produktinformation CMT - Copan Milk Test, Copan Italia, Brescia, Italien, [www.copanswabs.com/cmt/index.html](http://www.copanswabs.com/cmt/index.html)
- [83] Produktinformation Eclipse, Zeu Inmunotec, Zaragoza, Spanien, [www.zeu-inmunotec.com/index.php?|eng=ingles](http://www.zeu-inmunotec.com/index.php?|eng=ingles)

- [84] *Produktinformation BR-Test AS Brilliant, DSM Food Specialities, Delft, Niederlande, [www.dsm.com/en\\_US/html/dfs/dairy-products-tests.htm](http://www.dsm.com/en_US/html/dfs/dairy-products-tests.htm).*
- [85] *Produktinformation Cowside test, Charm Sciences Inc., Lawrence, Massachusetts, USA, [www.charm.com/pdf/100-9911-662-300-02\\_cowside.pdf](http://www.charm.com/pdf/100-9911-662-300-02_cowside.pdf)*
- [86] *Produktinformation Premi-Test, DSM Premi-Test, Heerlen, Niederlande, [www.dsm.com/en\\_US/html/premitest/home.htm](http://www.dsm.com/en_US/html/premitest/home.htm)*
- [87] *BVL (Hrsg), Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB 01.00 6, Nachweis von Hemmstoffen in Milch mit dem Agar-Diffusionsverfahren, Blättchentest, Beuth Verlag, Berlin*
- [88] *Nouws J, van Egmond H, Smulders I, Loeffen G, Schouten J, Stegeman H (1999) A microbiological assay system for assessment of raw milk exceeding EU maximum residue levels, Int Dairy J 9: 85-90.*
- [89] *Nouws JF, Loeffen G, Schouten J, van Egmond H, Keukens H, Stegeman H (1998) Testing of raw milk for tetracycline residues, J Dairy Sci 81: 2341-2345.*
- [90] *Nouws JFM, Loeffen G, Schouten J, van Egmond H, Keukens H, Stegeman H (1995) Improvement of the tube diffusion test with respect to detection of antibiotic residues and sulphonamides in raw milk, Arch Lebensm hyg 46: 140-141.*
- [91] *Meyer MT, Bumgarner JE, Varns JL, Daughtridge JV, Thurman EM, Hostetler KA (2000) Use of radioimmunoassay as a screen for antibiotics in confined animal feeding operations and confirmation by liquid chromatography/mass spectrometry, Sci Total Environ 248: 181-187.*
- [92] *Lang B, Märtlbauer E, Terplan G (1992) Ein enzymimmunologischer Nachweis von Tetracyclinen in Milch, Arch Lebensm hyg 43: 77-80.*
- [93] *Märtlbauer E (1993) Enzymimmunotests für antimikrobiell wirksame Stoffe, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart,*
- [94] *Produktinformation Ridascreen Tetracyclin, r-biopharm AG, Darmstadt, Deutschland, [www.r-biopharm.de/foodandfeed/pdf/R3501%20Tetracyclin%2005-11-07korr.pdf](http://www.r-biopharm.de/foodandfeed/pdf/R3501%20Tetracyclin%2005-11-07korr.pdf)*
- [95] *Produktinformation Charm II, Charm sciences inc., Lawrence, Massachusetts, USA, [www.charm.com/pdf/charmII-milk-MRL.pdf](http://www.charm.com/pdf/charmII-milk-MRL.pdf)*
- [96] *Charm SE, Chi R (1988) Microbial receptor assay for rapid detection and identification of 7 families of antimicrobial drugs in milk - collaborative study, J Assoc Off Anal Chem 71: 304-316.*
- [97] *Produktinformation Tetrasensor, Unisensor diagnostic engineering, Wandre (Liège), Belgien, [www.tetrasensor.de](http://www.tetrasensor.de)*
- [98] *Alfredsson G, Branzell C, Granelli K, Lundstrom A (2005) Simple and rapid screening and confirmation of tetracyclines in honey and egg by a dipstick test and LC-MS/MS, Anal Chim Acta 529: 47-51.*
- [99] *Okerman L, Croubels S, Cherlet M, De Wasch K, De Backer P, Van Hoof J (2004) Evaluation and establishing the performance of different screening tests for tetracycline residues in animal tissues, Food Addit Contam 21: 145-153.*

- [100] Granier B, Lepage S (2001) Europäisches Patent 1318400, *Method of in vitro diagnostics based on mechanisms of gene regulation and diagnostic reagent therefore*
- [101] Bossuyt R, Van Renterghem R, Waes G (1976) *Identification of antibiotic residues in milk by thin-layer chromatography*, J Chromatogr **124**: 37-42.
- [102] Tsuji K, Robertson JH (1973) *Formation of trimethylsilyl derivatives of tetracyclines for separation and quantitation by gas-liquid chromatography*, Anal Chem **45**: 2136-2140.
- [103] Tjornelund J, Hansen SH (1997) *Use of metal complexation in non-aqueous capillary electrophoresis systems for the separation and improved detection of tetracyclines*, J Chromatogr A **779**: 235-243.
- [104] Stubbings G, Tarbin JA, Shearer G (1996) *On-line metal chelate affinity chromatography clean-up for the high-performance liquid chromatographic determination of tetracycline antibiotics in animal tissues*, J Chromatogr B Biomed Appl **679**: 137-145.
- [105] *BVL (Hrsg), Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFBG 06.00 48(V), Bestimmung von Rückständen an Oxytetracyclin, Tetracyclin, Chlortetracyclin und deren Epimeren, Doxycyclin und Demeclocyclin in Fleisch, Fisch, Milch, Ei und Honig - HPLC-Methode*, Beuth Verlag, Berlin.
- [106] Croubles SM, Vanoosthuyze KEI, Van Peteghem CH (1997) *Use of metal chelate affinity chromatography and membrane-based ion-exchange as clean-up procedure for trace residue analysis of tetracyclines in animal tissues and egg*, J Chromatogr B **690**: 173-179.
- [107] Oka H, Ikai Y, Kawamura N, Uno K, Yamada M, Harada K, Suzuki M (1987) *Improvement of chemical analysis of antibiotics. XII. Simultaneous analysis of seven tetracyclines in honey*, J Chromatogr **400**: 253-261.
- [108] Oka H, Ikai Y, Kawamura N, Uno K, Yamada M, Harada K, Uchiyama M, Asukabe H, Mori Y, Suzuki M (1987) *Improvement of chemical analysis of antibiotics. IX. A simple method for residual tetracyclines analysis in honey using a tandem cartridge clean-up system*, J Chromatogr **389**: 417-426.
- [109] Podhorniak LV, Leake S, Schenck FJ (1999) *Stability of tetracycline antibiotics in raw milk under laboratory storage conditions*, J Food Prot **62**: 547-548.
- [110] Zurhelle G, Müller-Seitz E, Petz M (2000) *Automated residue analysis of tetracyclines and their metabolites in whole egg, egg white, egg yolk and hen's plasma utilizing a modified ASTED system*, Journal of Chromatography B **739**: 191-203.
- [111] Martel AC, Zeggane S, Drajnudel P, Faucon JP, Aubert M (2006) *Tetracycline residues in honey after hive treatment*, Food Addit Contam **23**: 265-273.
- [112] Croubels S, Vermeersch H, De Backer P, Santos MD, Remon JP, Van Peteghem C (1998) *Liquid chromatographic separation of doxycycline and 4-epidoxycycline in a tissue depletion study of doxycycline in turkeys*, J Chromatogr B Biomed Sci Appl **708**: 145-152.
- [113] Pena A, Pelantova N, Lino CM, Silveira MI, Solich P (2005) *Validation of an analytical methodology for determination of oxytetracycline and tetracycline residues in honey by HPLC with fluorescence detection*, J Agric Food Chem **53**: 3784-3788.
- [114] Oka H, Ikai Y, Hayakawa J, Harada K, Asukabe H, Suzuki M, Himei R, Horie M, Nakazawa H, MacNeil JD (1994) *Improvement of chemical-analysis of antibiotics. XXII. Identification of residual tetracyclines in honey by Frit Fab/LC/MS using a volatile mobile phase*, J Agric Food Chem **42**: 2215-2219.

- [115] Nakazawa H, Ino S, Kato K, Watanabe T, Ito Y, Oka H (1999) *Simultaneous determination of residual tetracyclines in foods by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry*, J Chromatogr B **732**: 55-64.
- [116] Oka H, Ikai Y, Ito Y, Hayakawa J, Harada K, Suzuki M, Odani H, Maeda K (1997) *Improvement of chemical analysis of antibiotics. XXIII. Identification of residual tetracyclines in bovine tissues by electrospray high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*, J Chromatogr B **693**: 337-344.
- [117] Carson MC, Ngoh MA, Hadley SW (1998) *Confirmation of multiple tetracycline residues in milk and oxytetracycline in shrimp by liquid chromatography particle beam mass spectrometry*, J Chromatogr B **712**: 113-128.
- [118] Baeumner AJ (2003) *Biosensors for environmental pollutants and food contaminants*, Anal Bioanal Chem **377**: 434-445.
- [119] Nakamura H, Karube I (2003) *Current research activity in biosensors*, Anal Bioanal Chem **377**: 446-468.
- [120] Cooper MA (2003) *Label-free screening of bio-molecular interactions*, Anal Bioanal Chem **377**: 834-842.
- [121] Cacciatore G, Petz M (2005) *Optische Biosensoren, die neuen Augen der Rückstandsanalytiker*, Deutsche Lebensmittel-Rundschau **101**: 501-508.
- [122] 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.
- [123] Karlsson R (2004) *SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas*, J Mol Recognit **17**: 151-161.
- [124] Kretschmann E, Raether H (1968) *Radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light*, Z. Naturforsch **23a**: 2135-2136.
- [125] Homola J (2003) *Present and future of surface plasmon resonance biosensors*, Anal Bioanal Chem **377**: 528-539.
- [126] Raether H (1988) *Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings* in Springer Tracts in Modern Physics. Höhler G. Springer-Verlag, Berlin; Volume 111,
- [127] Homola J, Yee SS, Gauglitz G (1999) *Surface plasmon resonance sensors: review*, Sensors and Actuators B-Chemical **54**: 3-15.
- [128] Baird CL, Myszka DG (2001) *Current and emerging commercial optical biosensors*, J Mol Recognit **14**: 261-268.
- [129] Ekgasit S, Thammacharoen C, Knoll W (2004) *Surface plasmon resonance spectroscopy based on evanescent field treatment*, Anal Chem **76**: 561-568.
- [130] Fägerstam LG, Frostell-Karlsson A, Karlsson R, Persson B, Rönnerberg I (1992) *Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis*, J Chromatogr **597**: 397-410.
- [131] *Gerätehandbuch Biacore Q*, Fa. Biacore International AB, Uppsala, Schweden.
- [132] Liedberg B, Nylander C, Lundström I (1995) *Biosensing with surface plasmon resonance-how it all started*, Biosens Bioelectron **10**: i-ix.

- [133] *Produktinformation Biacore 3000*.
- [134] Indyk HE, Persson BS, Caselunghe MC, Moberg A, Filonzi EL, Woollard DC (2002) *Determination of vitamin B12 in milk products and selected foods by optical biosensor protein-binding assay: method comparison*, J AOAC Int **85**: 72-81.
- [135] 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 optical biosensor-based immunoassay*, J AOAC Int **83**: 1141-1148.
- [136] Haughey SA, O'Kane AA, Baxter GA, Kalman A, Trisconi MJ, Indyk HE, Watene GA (2005) *Determination of pantothenic acid in foods by optical biosensor immunoassay*, J AOAC Int **88**: 1008-1014.
- [137] Gillis EH, Gosling JP, Sreenan JM, Kane M (2002) *Development and validation of a biosensor-based immunoassay for progesterone in bovine milk*, J Immunol Methods **267**: 131-138.
- [138] Daly SJ, Keating GJ, Dillon PP, Manning BM, O'Kennedy R, Lee HA, Morgan MR (2000) *Development of surface plasmon resonance-based immunoassay for aflatoxin B(1)*, J Agric Food Chem **48**: 5097-5104.
- [139] Caldow M, Stead SL, Day J, Sharman M, Situ C, Elliott C (2005) *Development and validation of an optical SPR biosensor assay for tylosin residues in honey*, J Agric Food Chem **53**: 7367-7370.
- [140] Haasnoot W, Bienenmann-Ploum M, Kohen F (2003) *Biosensor immunoassay for the detection of eight sulfonamides in chicken serum*, Analytica Chimica Acta **483**: 171-180.
- [141] Cacciatore G, Petz M, Rachid S, Hakenbeck R, Bergwerff AA (2004) *Development of an optical biosensor assay for detection of beta-lactam antibiotics in milk using the penicillin-binding protein 2x*, anal chim acta **520**: 105-115.
- [142] Sternesjo A, Gustavsson E (2006) *Biosensor analysis of beta-lactams in milk using the carboxypeptidase activity of a bacterial penicillin binding protein*, J AOAC Int **89**: 832-837.
- [143] Haasnoot W, Loomans EEMG, Cazemier G, Dietrich R, Verheijen R, Bergwerff AA, Stephany RW (2002) *Direct versus competitive biosensor immunoassays for the detection of (dihydro)streptomycin residues in milk*, Food Agricul Immunol **14**: 15-27.
- [144] Gaudin V, Maris P (2001) *Development of a biosensor-based immunoassay for screening of chloramphenicol residues in milk*, Food and Agricultural Immunology **13**: 77-86.
- [145] McCarney B, Traynor IM, Fodey TL, Crooks SRH, Elliott CT (2003) *Surface plasmon resonance biosensor screening of poultry liver and eggs for nicarbazin residues*, Analytica Chimica Acta **483**: 165-169.
- [146] Samsonova JV, Baxter GA, Crooks SR, Elliott CT (2002) *Biosensor immunoassay of ivermectin in bovine milk*, J AOAC Int **85**: 879-882.
- [147] 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.
- [148] Bokken GC, Corbee RJ, van Knapen F, Bergwerff AA (2003) *Immunochemical detection of Salmonella group B, D and E using an optical surface plasmon resonance biosensor*, FEMS Microbiol Lett **222**: 75-82.

- [149] Haughey SA, Baxter GA (2006) *Biosensor screening for veterinary drug residues in foodstuffs*, J AOAC Int **89**: 862-867.
- [150] Cacciatore G (2005) *Screening auf Rückstände von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika in Milch: Entwicklung eines optischen Biosensor-Assays mit Penicillin-bindenden Proteinen*, Dissertation, Bergische Universität, Wuppertal.
- [151] Lottspeich F, Zorbas H (1998) *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, 1. Auflage
- [152] D'Haese E, Nelis HJ, Reybroeck W (1997) *Inhibition of beta-galactosidase biosynthesis in Escherichia coli by tetracycline residues in milk*, Appl Environ Microbiol **63**: 4116-4119.
- [153] Kurittu J, Lonnberg S, Virta M, Karp M (2000) *A group-specific microbiological test for the detection of tetracycline residues in raw milk*, J Agric Food Chem **48**: 3372-3377.
- [154] Hansen LH, Sorensen SJ (2000) *Detection and quantification of tetracyclines by whole cell biosensors*, FEMS Microbiol Lett **190**: 273-278.
- [155] Bahl MI, Hansen LH, Sorensen SJ (2005) *Construction of an extended range whole-cell tetracycline biosensor by use of the tet(M) resistance gene*, FEMS Microbiol Lett **253**: 201-205.
- [156] Pellinen T, Huovinen T, Karp M (2004) *A cell-free biosensor for the detection of transcriptional inducers using firefly luciferase as a reporter*, Anal Biochem **330**: 52-57.
- [157] Weber CC, Link N, Fux C, Zisch AH, Weber W, Fussenegger M (2005) *Broad-spectrum protein biosensors for class-specific detection of antibiotics*, Biotechnol Bioeng **89**: 9-17.
- [158] Degand G, Bernes-Duyckaerts A, Scippo M, Maghuin-Rogister G (2000) *development of receptor assays for screening of tetracycline and macrolide antibiotic residues in food products*. EuroResidue IV - Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food, Veldhoven NL, Federation of European Chemical Societies (FECS), Division of Food Chemistry.
- [159] Strel'tsov SA, Kukhanova MK, Gurskii GV, Kraevskii AA, Beliavskaia IV, Viktorova LS, Trebogyanov AD, Gottikh BP (1975) *Binding of hydroxytetracycline to E. coli ribosomes*, Mol Biol **9**: 729-738.
- [160] Dahlberg AE (2001) *Ribosome structure. The ribosome in action*, Science **292**: 868-869.
- [161] Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2002) *Brock Mikrobiologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- [162] Madjar J-J (1994) *Preparation of ribosomes and ribosomal proteins from cultured cells*, Academic Press, San Diego
- [163] Doucet-Populaire F, Truffot-Pernot C, Grosset J, Jarlier V (1995) *Acquired resistance in Mycobacterium avium complex strains isolated from AIDS patients and beige mice during treatment with clarithromycin*, J Antimicrob Chemother **36**: 129-136.
- [164] Schlegel HG (1992) *Allgemeine Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York,
- [165] Lottspeich F, Zorbas H (1998) *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin,

- [166] Gao J, Mrksich M, Mammen M, Whitesides G (1998) *Affinity capillary electrophoresis: using capillary electrophoresis to study the interaction of proteins with ligands*, John Wiley & Sons, inc., New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Toronto,
- [167] Gottstein WJ, Minor WF, Cheney LC (1959) *Carboxamino derivatives of tetracyclines*, J Am Chem Soc **81**: 1198-1201.
- [168] Ito K, Komaki R, Sekiya M (1977) *Preparations of N-alkylthiomethyl and N-aminomethyl derivatives of amino acids*, Chem Pharm Bull **25**: 3385-3388.
- [169] Pezeshk A, Pezeshk V (1992) *Spectroscopic and biological studies of spin-labeled tetracycline*, Life Sci **50**: 1561-1565.
- [170] Bernardelli C, Bucher G, Lauria F, Logemann W, Tosolini G, Vita G (1967) *Über die Einhornreaktion mit Aminosäuren, III*, Liebigs Ann Chem **706**: 243-249.
- [171] Schnappinger D, Schubert P, Pfeleiderer K, Hillen W (1998) *Determinants of protein-protein recognition by four helix bundles: changing the dimerization specificity of Tet repressor*, EMBO J **17**: 535-543.
- [172] Scholz O (2002) *Induktorerkennung und Induktion des Tet Repressors*, Dissertation, Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg.
- [173] Schubert P (2001) *Untersuchungen zur Protein-Protein- und Protein-Ligand-Erkennung von Tet Repressoren*, Dissertation, Friedrich Alexander Universität, Erlangen-Nürnberg.
- [174] Schubert P, Schnappinger D, Pfeleiderer K, Hillen W (2001) *Identification of a stability determinant on the edge of the Tet repressor four-helix bundle dimerization motif*, Biochemistry **40**: 3257-3263.
- [175] Ameres SL, Druempel L, Pfeleiderer K, Schmidt A, Hillen W, Berens C (2005) *Inducible DNA-loop formation blocks transcriptional activation by an SV40 enhancer*, EMBO J **24**: 358-367.
- [176] Andersson K, Hamalainen M, Malmqvist M (1999) *Identification and optimization of regeneration conditions for affinity-based biosensor assays. A multivariate cocktail approach*, Anal Chem **71**: 2475-2481.
- [177] Andersson K, Areskoug D, Hardenborg E (1999) *Exploring buffer space for molecular interactions*, J Mol Recognit **12**: 310-315.
- [178] Brigham-Burke M, O'shannessy D (1993) *A micro-scale method employing surface plasmon resonance detection for the determination of conditions for immunoaffinity chromatography of proteins*, Chromatographia **35**: 45-49.
- [179] Gedig, Erk; Fa. XanTec, Münster (Westf.), persönliche Mitteilung
- [180] Jönsson U, Fägerstam L, Löfas S, Stenberg E, Karlsson R, Frostell Å, Markey F, Schindler F (1993) *Introducing a biosensor based technology for real-time biospecific interaction analysis*, Ann Biol Clin (Paris) **51**: 19-26.
- [181] Kedracka-Krok S, Wasylewski Z (1999) *Kinetics and equilibrium studies of Tet repressor-operator interaction*, J Protein Chem **18**: 117-125.
- [182] Andrew SM (2000) *Effect of fat and protein content of milk from individual cows on the specificity rates of antibiotic residue screening tests*, J Dairy Sci **83**: 2992-2997.
- [183] McGrath, Terry; Fa. Xenosense, Belfast, persönliche Mitteilung

- [184] Gestwicki JE, Hsieh HV, Pitner JB (2001) *Using receptor conformational change to detect low molecular weight analytes by surface plasmon resonance*, Anal Chem **73**: 5732-5737.
- [185] Mannen T, Yamaguchi S, Honda J, Sugimoto S, Kitayama A, Nagamune T (2001) *Observation of charge state and conformational change in immobilized protein using surface plasmon resonance sensor*, Anal Biochem **293**: 185-193.
- [186] May LM, Russell DA (2002) *The characterization of biomolecular secondary structures by surface plasmon resonance*, Analyst **127**: 1589-1595.
- [187] Sota H, Hasegawa Y, Iwakura M (1998) *Detection of conformational changes in an immobilized protein using surface plasmon resonance*, Anal Chem **70**: 2019-2024.
- [188] Myszka DG, He X, Dembo M, Morton TA, Goldstein B (1998) *Extending the range of rate constants available from biacore: interpreting mass transport-influenced binding data*, Biophys J **75**: 583-594.
- [189] Schuck P, Minton AP (1996) *Analysis of mass transport-limited binding kinetics in evanescent wave biosensors*, Anal Chem **68**: 262-272.
- [190] Yarmush ML, Patankar DB, Yarmush DM (1996) *An analysis of transport resistances in the operation of biacore: implications or kinetic studies of biospecific interaction*, Mol Immunol **33**: 1203-1214.
- [191] Ryan, Tom; Fa. Reichert Analytical Instruments, Depew, NY, USA, persönliche Mitteilung
- [192] Sjolander S, Csaba U (1991) *Integrated fluid handling system for biomolecular interaction analysis*, Anal Chem **63**: 2338-2345.
- [193] Kamionka A, Majewski M, Roth K, Bertram R, Kraft C, Hillen W (2006) *Induction of single chain tetracycline repressor requires the binding of two inducers*, Nucleic Acid Res **34**: 3834-3841.
- [194] Henssler EM, Scholz O, Lochner S, Gmeiner P, Hillen W (2004) *Structure-based design of Tet repressor to optimize a new inducer specificity*, Biochemistry **43**: 9512-9518.
- [195] Möller N, Müller-Seitz E, Scholz O, Hillen W, Bergwerff AA, Petz M (2007) *A new strategy for the analysis of tetracycline residues in foodstuffs by a surface plasmon resonance biosensor*, Eur Food Res Technol **224**: 285-292.
- [196] Ettner N, Müller G, Berens C, Backes H, Schnappinger D, Schreppe T, Pfeleiderer K, Hillen W (1996) *Fast large-scale purification of tetracycline repressor variants from overproducing Escherichia coli strains*, J Chromatogr A **742**: 95-105.
- [197] Amann E, Brosius J, Ptashne M (1983) *Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for regulated expression of cloned genes in Escherichia coli*, Gene **25**: 167-178.
- [198] Wetlaufer D (1962) *Ultraviolet spectra of proteins and amino acids*, Adv Protein Chem **17**: 303-390.