

Beitrag zur Biosensoranalytik von
Tetracyclinrückständen in Lebensmitteln
mittels
Oberflächenplasmonresonanz

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

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)

genehmigte Dissertation

von

Ulrike Andree

aus

Hagen in Westfalen

2009

Diese Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20090680

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20090680>]

Abstract

In this work a major goal was to set up an indirect competitive assay format for the detection of tetracyclines in food matrices using surface plasmon resonance technology. As a receptor for tetracyclines TetR, a repressor protein binding tetracyclines in tetracycline-resistant bacteria, was used. Doxycycline derivatives, attached to the sensor surface, were used as competitors. It was shown that an indirect competitive assay format using TetR and doxycycline derivatives was possible (proof of principle). The assay format was characterized to identify the most important parameters for the optimization. After comparison of four different sensor chip surfaces (differing in surface chemistry and layer thickness) a carboxymethyl-dextrane surface was found most suitable in terms of minimal non-specific binding and good regeneration characteristics. Parameters that influenced the immobilization of the doxycycline derivatives, binding of the receptor protein and regeneration of the sensor surface were studied. Not only was the sensor surface shown to have crucial influence on the assay characteristics, but also the spacer length at the doxycycline derivative imparted the immobilization of the derivative and the subsequent binding of the receptor protein. A longer spacer led to a higher immobilization degree; on the other hand this was counteracted by the reduction of binding activity in the ligand-receptor system. This was proven for derivatives in solution and can also be seen on the carboxymethyl-dextrane surface. However, when immobilized on a monolayer sensor chip the doxycycline derivative with the longest spacer did not display lower receptor binding. The non-competitive format had to cope with a poor stability of the system accompanied by low precision and poor reproducibility. These rendered a sensitive analytics impossible.

Parallel to the studies with the competitive assay format, a tetracycline specific screening assay described by Möller et al. [1] was validated. In this assay a gene regulation mechanism occurring in tetracycline-resistant gram-negative bacteria is mimicked: In the resistant bacterial cell the synthesis of a tetracycline efflux protein is controlled by a repressor protein (TetR) that in absence of tetracycline binds to a short DNA sequence, the tetracycline operator (*tetO*) and thus blocks the expression of the efflux protein. Tetracyclines present bind to the repressor protein and release it from the DNA. This mechanism was used for SPR measurements in honey.

Another goal in this work was the evaluation of the robustness of the screening assay in terms of reagent stability towards different storage conditions, different reagent lots and the application of the assay in different laboratories. Suitable storage conditions for the sensor chips were found. The repressor protein was very stable under all conditions tested, so were the sensor chips pre-immobilized with the operator DNA sequence. No difference between different lots of TetR was observed. Differing immobilization levels in loading sensor chips with the *tetO* fragment relating to different batches *tetO* and sensor chips used could easily be levelled through variation of the injection volumen of the fragment. The results obtained in the application of the screening assay to honey samples in a laboratory in Japan were in good compliance with the results obtained in our laboratory. Since the use of tetracyclines in honey production is not approved by the European Union a screening test for the use in the EU

should be able to detect tetracycline concentrations below 10 µg/kg. Thus, efforts were made to lower the limit of detection (LOD) for tetracyclines in honey. Working parameters for the assay like injection time, injection volume and sample dilution were optimized, but did not lead to a lower LOD altogether. Since interfering matrix compounds seemed critical for the LOD, different approaches were made to find a sample preparation suitable to eliminate matrix interferences. The approaches included extraction procedures as well as deproteination, degradation of sugars and extraction of trace lipids. However, the complex composition of honey and the differences in composition of honeys from different geographical and floral origin in combination with the need for physiological conditions in the screening assay were challenges that were not overcome by the techniques employed.

Comparing both assay formats investigated it was pointed out that the application of the competitive format had no advantage over the indirect assay with *tetO*.

DANK

Die vorgelegte Arbeit wurde in der Zeit von April 2005 bis einschließlich Juli 2008 im Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften der Bergischen Universität Wuppertal in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Michael Petz angefertigt.

Prof. Dr. Michael Petz überließ mir das Thema zur weitgehend selbständigen Bearbeitung und stand mir in zahlreichen Diskussionen beratend zur Seite.

Prof. Dr. Wolfgang Hillen ermöglichte mir die Isolierung des Repressorproteins TetR in seinem Arbeitskreis und stellte dafür kompetente *E.coli*-Zellen sowie die notwendigen Arbeitsmaterialien zur Verfügung. Dr. Eva-Maria Henssler unterstützte mich bei den mikrobiologischen Arbeiten und hatte für all meine Fragen stets ein offenes Ohr.

Prof. Dr. Peter Gmeiner ermöglichte die Synthese von Doxycyclinderivaten in seinem Arbeitskreis und diskutierte bereitwillig die Ergebnisse der Messungen. Darüber hinaus übernahm er freundlicherweise das Korreferat.

Vorrei rivolgere tutta la mia gratitudine anche ad Dr. Igor Usai di avermi assistito con la velocissima sintesi così semplice dei derivati di doxycyclin e del suo interesse nelle misure coinvolte.

Die Firma Biacore (Uppsala, Schweden) ermöglichte die Durchführung der SPR-Messungen durch Bereitstellung des Biacore Q[®]. Dr. Heiko Meier sowie Dr. Steffi Bachem setzten sich insbesondere für das Zustandekommen und die Fortführung der Zusammenarbeit auch in kritischen Phasen ein und lieferten wertvolle Anregungen.

Terry McGrath (Xenosense, Belfast, UK) vermittelte mir in zahllosen Gesprächen und Diskussionen eine Sicht darauf, was für Herstellung und Vertrieb von kommerziellen Testkits notwendig ist und gab zahlreiche Tipps und Denkanstöße. Darüber hinaus ermöglichte er die Durchführung von SPR-Messungen durch ein japanisches Labor.

Dr. Eva Rademacher stellte sortenreine Honigproben für die Ermittlung der Entscheidungsgrenze und des Matrixeinflusses verschiedener Honige zur Verfügung.

Dr. Erika Müller-Seitz nahm sich in allen Phasen der Arbeit Zeit für die Diskussion von Ergebnissen und aufgetretenen Probleme jeder Art und trug durch viele hilfreiche Vorschläge oft zur Lösung derselben bei.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstützte diese Arbeit finanziell.

Meine Kollegen schafften ein rundum angenehmes Arbeitsklima; waren in Tiefphasen mit tröstenden Worten zur Stelle, konnten sich mit mir über Erfolge freuen und lieferten bei manchen fachlichen Fragen wichtige Denkanstöße. Über die Arbeit hinaus waren sie auch bei der Freizeitgestaltung für jeden Spaß zu haben und ließen mich bei Bingo-, Grill- und Weinabenden die Arbeit schnell vergessen.

Flo Mayer hörte sich geduldig jeden Frust an, den ich mir von der Seele reden musste und vermochte es immer wieder mich aufzuheitern und zu motivieren weiterzumachen.

Meine Familie unterstützte mich darin, meinen Weg zu gehen. Mein Bruder war eine große Hilfe bei der Literaturrecherche.

Ihnen allen sei an dieser Stelle ein herzlicher Dank ausgesprochen.

I may not have gone where I intended to go,
but I think I have ended up where I needed to be.

-Douglas Adams

Für Werner Andree

Inhalt

1	Einleitung	1
2	Tetracycline	2
2.1	Geschichte.....	2
2.2	Struktur.....	3
2.3	Chemie der Tetracycline.....	6
2.3.1	Epimerisierung.....	6
2.3.2	Isomerisierung.....	8
2.3.3	Wasserabspaltung.....	9
2.3.4	Komplexbildung.....	10
2.3.5	Protonierung und Keto-Enol-Tautomerie.....	11
2.3.6	Tetracyclinderivate.....	15
2.4	Wirkung von Tetracyclinen.....	16
2.4.1	Aufnahme von Tetracyclinen in die Zelle.....	16
2.4.2	Wirkmechanismus.....	17
2.4.3	Strukturelle Voraussetzungen für die biologische Aktivität von Tetracyclinen.....	19
2.4.4	Anwendungen in der Veterinärmedizin.....	20
2.4.5	Toxikologie.....	21
2.5	Tetracyclin-Resistenz.....	21
2.5.1	Ausschleusen von Tetracyclin (Efflux) und Genregulation.....	22
2.5.2	Bildung von ribosomalen Schutzproteinen.....	25
2.5.3	Enzymatische Inaktivierung.....	25
2.5.4	Mutation der 16S-RNA.....	25
2.6	Das Operator-Repressor-System.....	26
2.6.1	Tetracyclin-Repressoren.....	26
2.6.2	Tetracyclin-Operator.....	27
2.6.3	Induktion des Repressors durch $[MgTc]^+$	28
2.7	Einsatz von Tetracyclinen bei lebensmittelliefernden Tieren: rechtliche Regelungen.....	30
3	Analytik von Tetracyclinrückständen	34
3.1	Mikrobiologische und immunchemische Verfahren.....	35
3.1.1	Hemmstofftests.....	35
3.1.2	Immunchemische Verfahren.....	36
3.1.3	Rezeptortests.....	37
3.2	Physikalisch-chemische Verfahren.....	38
3.2.1	Extraktion und Clean-up.....	39
3.2.2	Chromatographische Trennung.....	40
3.2.3	Massenspektrometrische Detektion.....	41

3.3	Biosensor-Verfahren.....	41
3.3.1	Einsatz von Biosensoren zum Nachweis von Tetracyclinen	42
3.3.2	Oberflächenplasmonresonanz in der Rückstandsanalytik von Antibiotika	43
4	Grundlagen der SPR-Messungen	45
4.1	Grundlagen der Oberflächenplasmonresonanz	45
4.2	Aufbau des SPR-Spektrometers Biacore Q	48
4.3	Sensorchipoberflächen.....	51
4.4	Assayformate	54
5	Zielsetzung.....	56
6	Ergebnisse und Diskussion.....	59
6.1	Kompetitives Assayformat mit Doxycyclinderivaten	59
6.1.1	Aufbau des kompetitiven Assayformates und Konzeption der Versuche	59
6.1.2	Beweis der Möglichkeit des kompetitiven Assayformates mit Doxycyclinderivaten	65
6.1.3	Immobilisierung von Doxycyclinderivaten	67
6.1.4	TetR-Bindung	76
6.1.5	Detektion von Tetracyclinen.....	91
6.1.6	Regeneration der Oberfläche	98
6.1.7	Optimierung des Assays für CM5-Chips.....	104
6.1.8	Stabilität des Systems	112
6.1.9	Fazit der Messungen mit dem kompetitiven Assayformat	114
6.2	Nicht-kompetitives Assay-Format mit <i>tetO</i> und TetR	116
6.2.1	Aufbau des nicht-kompetitiven Assays und Charakteristika des Sensorgrammes	116
6.2.2	Ausgangslage für die Untersuchungen mittels des nicht-kompetitiven Assays.....	120
6.3	Robustheit des Screening-Tests mit <i>tetO</i> und TetR	122
6.3.1	Konzept der Messungen	122
6.3.2	Lagerstabilität der Sensorchips	124
6.3.3	Einfluss der <i>tetO</i> -Variante auf die Lagerstabilität	131
6.3.4	Lagerstabilität der <i>tetO</i> -Sensorchips bei verschiedenen Temperaturen	134
6.3.5	Lagerstabilität des Tet-Repressors	137
6.3.6	Stabilität von Tetracyclinlösungen.....	141
6.3.7	Robustheit des Assays im Hinblick auf verschiedene Chargen der verwendeten Reagenzien und Sensorchips	148
6.3.8	Zusammensetzung des Laufpuffers.....	159
6.3.9	Anwendung des für Honig optimierten Screeningtests in einem Labor in Japan ..	165
6.3.10	Fazit zur Robustheit des Screeningtests mit <i>tetO</i> und TetR	168
6.4	Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit für Tetracycline in Honig	170

6.4.1	Optimierung der Arbeitsparameter.....	171
6.4.2	Bestimmung der Entscheidungsgrenze nach Optimierung der Arbeitsparameter	179
6.5	Versuche zur Identifizierung und Entfernung von störenden Matrixbestandteilen in Honig.....	186
6.5.1	Selektiver Abbau einzelner Honigbestandteile.....	186
6.5.2	Flüssig/Flüssig-Extraktion und Festphasenextraktion von Tetracyclinen.....	197
6.5.3	Fazit der Versuche zur Verbesserung der Entscheidungsgrenze für Tetracycline in Honig.....	210
6.6	Vergleich der beiden Assayformate.....	214
6.7	Expression und Isolierung des Repressor-Proteins TetR(BD).....	215
7	Zusammenfassung.....	216
8	Ausblick.....	222
9	Material und Methoden.....	224
9.1	Isolierung und Reinigung des Repressor-Proteins TetR(BD).....	224
9.1.1	Expression des Proteins und Aufschluss der Zellen.....	227
9.1.2	Isolierung und Reinigung des Proteins.....	228
9.1.3	Gelelektrophorese.....	230
9.1.4	Photometrische Bestimmung der Konzentration.....	231
9.1.5	Aktivitätsbestimmung mittels Fluoreszenz-Titration.....	232
9.2	Herstellung von <i>tet</i> -Operatoren.....	234
9.3	SPR-Analysen im System mit Doxycyclinderivaten.....	236
9.3.1	Präparation von Sensorchips für das Assay-Format mit Doxycyclinderivaten	237
9.3.2	Standardbedingungen für SPR-Messungen mit immobilisierten Doxycyclinderivaten.....	238
9.3.3	Charakterisierung der TetR-Bindung.....	239
9.3.4	Kompetition von Tetracyclinen mit den Doxycyclinderivaten um die Bindestellen des TetR.....	239
9.3.5	Ermittlung geeigneter Regenerationsbedingungen.....	240
9.4	SPR-Analysen mittels des <i>tetO</i> /TetR-Systems.....	243
9.4.1	Präparation von SA-Sensorchips für den Screening-Test.....	245
9.4.2	Beladung des immobilisierten Operators mit TetR.....	246
9.4.3	Regeneration der Sensorchip-Oberfläche.....	246
9.4.4	Herstellung von Kalibrierlösungen in Puffer und Matrix.....	247
9.4.5	Honigproben.....	248
9.4.6	Extraktion von Honigproben.....	249
9.4.7	Bestimmung der Entscheidungsgrenze für Tetracycline in Honig.....	250
9.4.8	Herstellung einer Zuckerlösung (Honigimitat).....	251
9.4.9	Messung der Lagerstabilität der Reagenzien.....	251

9.4.10	Herstellung von Pufferlösungen verschiedener Ionenstärke	254
9.4.11	Messung von Doxycyclinderivaten in Lösung	255
10	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	256
11	<i>Literatur</i>	259
12	<i>Anhang</i>	276

1 EINLEITUNG

Tetracycline fanden als Antibiotika bereits kurz nach ihrer Entdeckung eine weite Verbreitung in Human- und Veterinärmedizin. Die Gründe dafür liegen darin, dass sie nicht nur gegen grampositive und gramnegative Bakterien wirken, sondern auch kostengünstig herzustellen, leicht zu applizieren und gut verträglich sind [2]. Nach wie vor stellen die Tetracycline den größten Anteil verabreichter Antibiotika in der Veterinärmedizin [3].

Antibiotika werden zur Behandlung bakterieller Infektionen eingesetzt. Während in der Humanmedizin der Einsatz von Antibiotika fast ausschließlich zu therapeutischen Zwecken erfolgt, also der gezielten Behandlung von Infektionen, werden sie in der industriellen Tierhaltung auch zur Prophylaxe, Metaphylaxe und Leistungsförderung bei ganzen Tiergruppen eingesetzt. Die Anwendung antimikrobieller Wirkstoffe schafft einen Selektionsdruck und damit eine wesentliche Voraussetzung für die Ausbreitung resistenter Bakterien. Diese können durch den Kontakt mit Tieren auf Menschen übertragen werden, aber auch durch die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel. Letztendlich besteht auch das Risiko einer Resistenzselektion bei Menschen durch die Aufnahme von Antibiotika-Rückständen mit der Nahrung [4].

Zum Schutz der Verbraucher vor Rückständen wurden vom Gesetzgeber Wartezeiten vorgeschrieben, die nach der Verabreichung von Tierarzneimitteln eingehalten werden müssen, bevor das Tier geschlachtet oder dessen Produkte (Milch, Eier, Honig) verkauft werden dürfen. Zusätzlich wurden gesetzliche Rückstandshöchstmengen festgesetzt, bei deren Überschreitung die tierischen Lebensmittel nicht verkauft werden dürfen. Die Einhaltung der Höchstmengen wird in nationalen und europaweiten Rückstandskontrollen überprüft. Im Zuge der Globalisierung gelangen Waren auf den europäischen Markt, die in Ländern erzeugt wurden, deren gesetzliche Vorschriften – oder deren Überwachung weniger strikt sind.

Zur Überwachung der Einhaltung der Rückstandshöchstmengen sind empfindliche Analysenverfahren notwendig; sowohl Screening-Tests, die eine schnelle Aussage über das Vorhandensein von Rückständen und einen hohen Probendurchsatz erlauben, als auch Bestätigungsverfahren, mit denen die Identität der Rückstände ermittelt und eine exakte Quantifizierung erfolgen kann.

2 TETRACYCLINE

2.1 Geschichte

B.M. Duggar isolierte 1948 eine Substanz aus *Streptomyces aureofaciens*, die er aufgrund der gelben Färbung Aureomycin (heute Chlortetracyclin) nannte [5]. Duggar fand, dass diese Substanz antibiotische Wirkung gegenüber grampositiven als auch gramnegativen Bakterien zeigte und meldete 1949 ein Patent auf die Isolierung von Aureomycin an [6]. 1950 wurde vom Unternehmen Chas. Pfizer and Co. ein Patent auf die Gewinnung und Herstellung einer Substanz mit ähnlichen Eigenschaften erhalten, das damals Terramycin benannte Oxytetracyclin [7]. Terramycin war aus *Streptomyces rimosus* isoliert worden und war der erste Vertreter der Tetracycline, dessen Struktur nach mehrjähriger Forschungsarbeit im Jahre 1953 aufgeklärt wurde [8]. Die chemische Struktur von Aureomycin wurde ein Jahr später von Stephens et al. beschrieben [9]. Aufgrund ihrer Wirkung sowohl gegen gramnegative als auch grampositive Bakterien und auch den Erreger der Cholera (*Vibrio Cholera*) wurde im Zusammenhang mit Tetracyclinen erstmalig der Begriff des Breitband-Antibiotikums geprägt.

Zur ersten Generation der beschriebenen natürlich vorkommenden Tetracycline gehörte auch das Tetracyclin, (heute Tetracyclin), das 1954 als Biosynthese-Produkt von *Streptomyces aureofaciens* entdeckt wurde [10] und in seinen Eigenschaften mit dem durch katalytische Hydrierung von Aureomycin erhaltenen Deschloro-aureomycin gewonnenen übereinstimmte [9, 10].

Die Forschung in den 1960er- und 70er-Jahren konzentrierte sich auf die Isolierung weiterer Tetracycline aus Mikroorganismen, die chemische Charakterisierung und die Halbsynthese neuer und chemisch modifizierter Tetracycline [11]. Intensiv wurde über einen langen Zeitraum auch an der Totalsynthese von Tetracyclinen gearbeitet, wobei sowohl die komplexe Stereochemie des Moleküls als auch die Reaktionsfähigkeit der Substituenten gegenüber sauren, alkalischen und reduzierenden Reagenzien eine große Herausforderung darstellten. Die Totalsynthese von Sancyclin (6-Desmethyl-6-desoxy-tetracyclin) gelang 1962 einer Arbeitsgruppe der Firma Chas. Pfizer and Co in einer

22stufigen Synthese mit geringen Ausbeuten [12]. 1968 wurde von Muxfeldt und Rogalski eine weniger aufwendige Methode entwickelt, die es erlaubte, sowohl natürliche Tetracycline als auch neuartige herzustellen [13]. Die Totalsynthese hat aufgrund mangelnder Effizienz keinen Einzug in die industrielle Herstellung von Tetracyclinen gehalten; Tetracycline werden heute fermentativ oder teilsynthetisch produziert.

Die Partialsynthese neuer Tetracycline verfolgte das Ziel, die Eigenschaften der Tetracycline im Hinblick auf Löslichkeit, Resorption und Wirksamkeit zu verbessern. So zeigen Rolicyclin und Lymecyclin gegenüber den natürlichen Tetracyclinen eine verbesserte Wasserlöslichkeit bei physiologischem pH-Wert. Methacyclin und Doxycyclin sind lipophiler und werden besser resorbiert. Minocyclin zeigte Wirksamkeit gegenüber grampositiven Staphylokokken-Stämmen, die gegen andere Tetracycline resistent waren [14, 15]. Die jüngeren Entwicklungen im Bereich der Tetracyclin-Antibiotika wurden von Sum et al. und Chopra et al. beschrieben [16, 17].

Mit dem Aufkommen und der Verbreitung von Resistenzen gegen Tetracycline wurden Anfang der 90er Jahre Anstrengungen vorgenommen, um neue Tetracyclin-Analoga zu entdecken; diese sollten sowohl wirksam sein gegenüber Organismen, die gegen die klassischen Tetracycline resistent waren, als auch die Aktivität gegenüber tetracyclinempfindlichen Organismen erhalten. Die Forschungen führten zur Entdeckung der Glycylcycline. Diese waren auch gegenüber Bakterien wirksam, bei denen *tet*-Gene entweder durch Efflux oder durch den Schutz der Ribosomen Resistenz gegenüber Tetracyclinen vermittelten [16-18]. Als bisher einziger Wirkstoff der Klasse der Glycylcycline wurde Tigecyclin 2005 in den USA von der FDA zugelassen [19].

2.2 Struktur

Die Struktur der Tetracycline leitet sich von einem System aus 4 linear verknüpften Sechsringen ab. Nach IUPAC werden die Ringe mit ABCD bezeichnet, die Nummerierung der C-Atome am Ring startet beim C1 von Ring A und wird gegen den Uhrzeigersinn fortgeführt. Alle „Skelett“- und exocyclischen C-Atome erhalten eine Nummer, tertiäre Brücken-C-Atome werden mit einer Nummer und einem Buchstaben gekennzeichnet (Abbildung 2-1). Der Tetracyclinkern ist mit Ausnahme des

aromatischen D-Ringes hydriert. Die Ringe A und B enthalten jeweils eine Doppelbindung. Die Struktur des Tetracyclingerüsts ist in Abbildung 2-1 dargestellt.

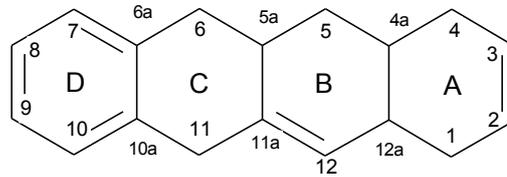


Abbildung 2-1: Struktur des Tetracyclingerüsts (1,4,4a,5,5a,6,11,12a-Octahydronaphthalen)

Für die biologische Aktivität von Tetracyclinen ist die Einführung funktioneller Gruppen notwendig. Einen Überblick über verschiedene Tetracycline gibt Tabelle 2-1.

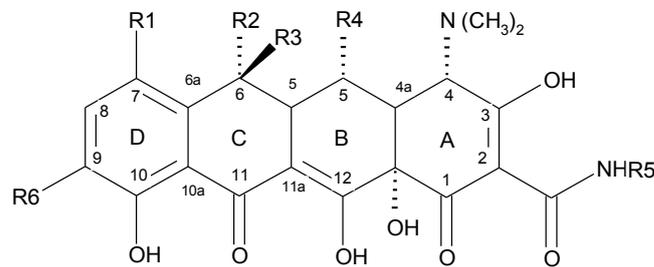


Abbildung 2-2: Grundstruktur der Tetracycline

Tabelle 2-1: verschiedene Tetracycline

Name	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Sancyclin ¹	H	H	H	H	H	H
Tetracyclin*	H	CH ₃	OH	H	H	H
Oxytetracyclin*	H	CH ₃	OH	OH	H	H
Chlortetracyclin*	Cl	CH ₃	OH	H	H	H
Doxycyclin ¹	H	CH ₃	H	OH	H	H
Methacyclin ¹	H	=CH ₂	OH	H	H	H
Rolitetracyclin ¹	H	CH ₃	OH	H		H
Lymecyclin ¹	H	CH ₃	OH	OH		H
Minocyclin ¹	N(CH ₃) ₂	H	H	H	H	H
Tigecyclin ¹	N(CH ₃) ₂	H	H	H	H	

*natürlich vorkommende Tetracycline

¹partialsynthetisch gewonnene Tetracycline

Aufgrund der Anordnung der Doppelbindungen enthalten Tetracycline zwei chromophore Bereiche, einer ist am A-Ring lokalisiert, wohingegen sich der zweite über die Ringe BCD erstreckt. Tetracycline zeigen daher charakteristische UV-Spektren. So absorbiert der Ring-A-Chromophor Licht der Wellenlänge 262 nm, der Ring BCD-Chromophor Licht der Wellenlängen 225, 285, 320 und 360 nm. Eine weitere Absorptionsbande bei 275 nm setzt sich aus mehreren Absorptionen zusammen [20].

Durch das Vorhandensein von Asymmetriezentren sind Tetracycline optisch aktiv. Potentielle Asymmetriezentren sind die Kohlenstoffatome 4, 4a, 5, 5a, 6 und 12a. Je nach Substitution enthalten Tetracycline eine unterschiedliche Anzahl asymmetrischer C-Atome. Oxytetracyclin beispielsweise besitzt 6, Chlortetracyclin, Tetracyclin und Demethylchlortetracyclin 5 Asymmetriezentren. Die Einführung von sechs sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen im unteren Molekülbereich und am C3-Kohlenstoff sowie die Einführung der Dimethylaminogruppe am C4 verändern die Struktureigenschaften des Moleküls gegenüber denen des Grundgerüsts und führen dazu, dass der A-Ring entlang der Bindung C4a-C12a aus der Ebene abgewinkelt wird.

Das Pharmacophor des Moleküls umfasst den unteren Bereich des Ringsystems (C-Atome C10 bis C3, sowie die Dimethylaminofunktion am C4), an dem die physikochemischen und strukturellen Eigenschaften des Ringsystems durch die hohe Dichte der sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen beeinflusst werden. Die lineare Anordnung der Ringe ABCD ist essentiell für die biologische Aktivität von Tetracyclinen. Generell führen Modifikationen entlang der unteren Molekülregion zu einer Abnahme bis zum Verlust der Bioaktivität, wohingegen die obere Molekülregion (C-Atome C5 bis C9) chemisch modifiziert werden kann, beispielsweise um bioaktive Tetracycline mit veränderten Eigenschaften zu erhalten. In Abbildung 2-3 ist zur Veranschaulichung der Lage des Pharmacophors das einfachste gegenüber Prokaryoten wirksame Tetracyclin Sancyclin dargestellt.

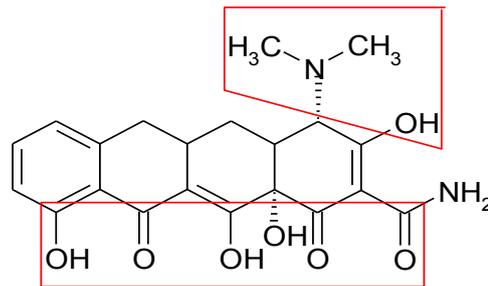


Abbildung 2-3: Struktur von Sancyclin. Rot umrandet sind die Molekülregionen, die für eine Aktivität gegenüber Prokaryoten essentiell sind; Veränderungen in diesen Regionen führen zur Abnahme oder Verlust der Bioaktivität

2.3 Chemie der Tetracycline

2.3.1 Epimerisierung

Von Doerschuk et al. wurde 1955 die Isomerisierung am C4-Atom erstmalig beschrieben [21]. Sie hat unter der Bezeichnung „Epimerisierung“ Eingang in die einschlägige Literatur gefunden; die Isomere werden entsprechend als „Epimere“ bezeichnet. Zur Abgrenzung gegenüber den Isotetracyclinen (siehe Seite 8, Abschnitt 2.3.2) wird im Folgenden die Isomerisierung am C4-Kohlenstoff mit dem Terminus „Epimerisierung“ bezeichnet.

Die C4-Dimethylaminofunktion kann reversibel das C4 β -Epimer bilden [22], dessen biologische Wirksamkeit weniger als 5% der Wirksamkeit der „normalen“ α -Form ausmacht [21]. Die Epimerisierung tritt zumeist im pH-Bereich von pH 2 bis pH 6 auf. Substituenten am C2- und C5-Kohlenstoff sowie die Anwesenheit von Metallionen vermindern im Allgemeinen die Epimerisierung, wohingegen wässrige Lösungen und Säuren die Epimerbildung begünstigen. In alkalischen Lösungen und in Anwesenheit chelatisierender Metalle erfolgt eine komplette Rückreaktion zur aktiven C4 α -Form [23].

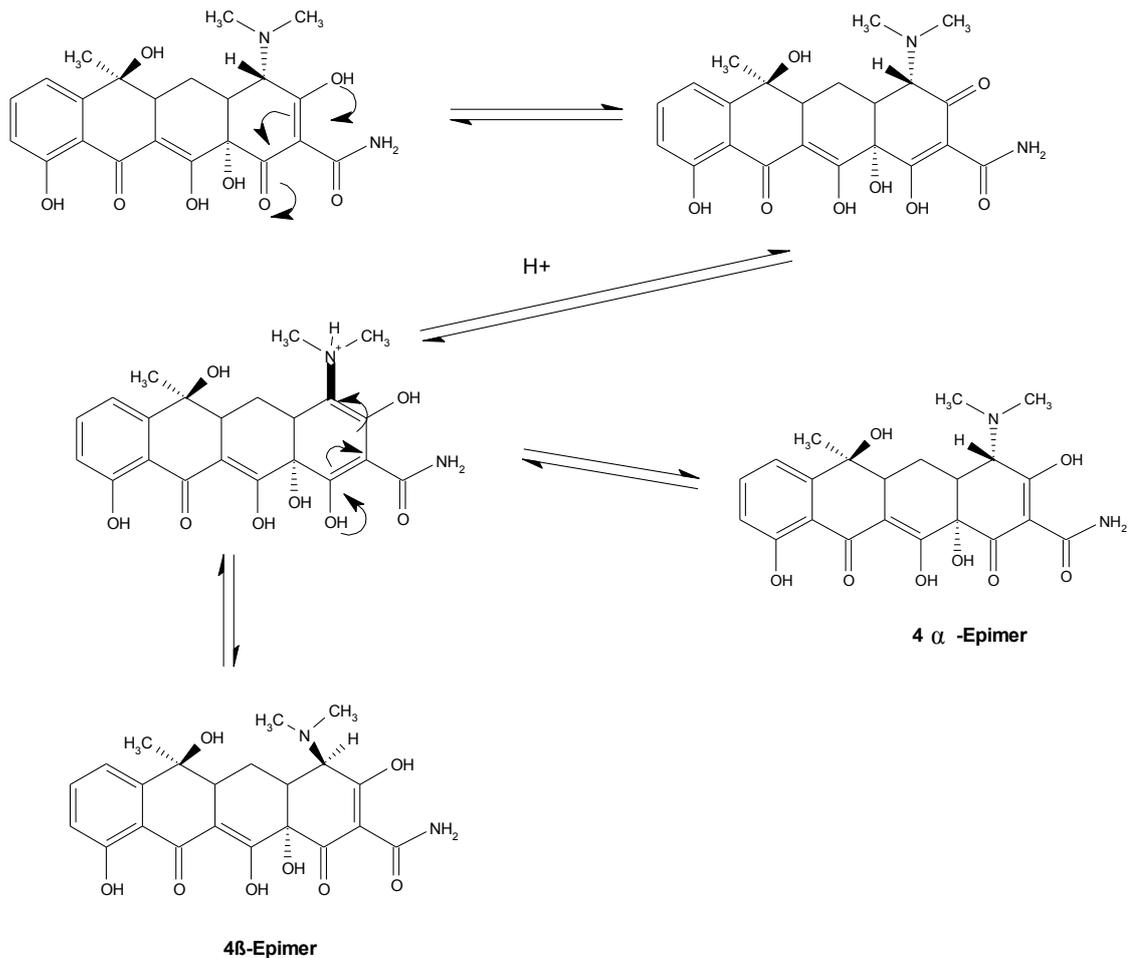


Abbildung 2-4: Mechanismus der säurekatalysierten C4-Epimerisierung von Tetracyclinen

Die Kinetik der Epimerisierung wird durch das verwendete Puffersystem (Ionenstärke, pH-Wert), Lösungsmittel, mehrwertige Kationen, Lösungsvermittler und die Temperatur beeinflusst [22, 24, 25]. Von Hussar et al. wurde die Epimerisierungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von pH-Wert und Temperatur untersucht und gezeigt, dass die Geschwindigkeit mit abnehmendem pH-Wert und steigender Temperatur zunahm. Die Untersuchungen machten auch deutlich, dass Oxytetracyclin wesentlich langsamer epimerisierte als Tetracyclin, was darauf zurückgeführt wurde, dass die Hydroxylgruppe am C5-Kohlenstoff eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zur Dimethylaminogruppe am C4 ausbildet und dadurch die Epimerisierung verzögert [24].

Remmers et al. untersuchten die Lage des Epimerisierungsgleichgewichtes in Abhängigkeit vom pH-Wert und stellten fest, dass der Anteil epi-Tetracyclin im Gleichgewicht zwischen 18 und 55% lag [22].

2-2: Anteil epi-Tetracyclin im Epimerisierungsgleichgewicht bei verschiedenen pH-Werten [22]

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

2.3.2 Isomerisierung

Tetracycline, deren C6-Atom mit einer Hydroxylfunktion substituiert ist, bilden in Gegenwart von Basen unter Spaltung des C-Ringes am C-11a-Kohlenstoff und Lactonbildung iso-Tetracycline. Besonders empfindlich für diese Reaktion ist Chlortetracyclin, hier tritt die Isomerisierung zum iso-Chlortetracyclin bereits bei pH 7,5 in der Wärme auf. Oxytetracyclin und Tetracyclin isomerisieren erst bei einem pH-Wert oberhalb von pH 9. Tetracycline, die keine Methylgruppe am C6-Kohlenstoff tragen, sind gegenüber Basen stabiler [14, 23]. Die Bildung und Struktur von iso-Chlortetracyclin zeigt folgende Abbildung:

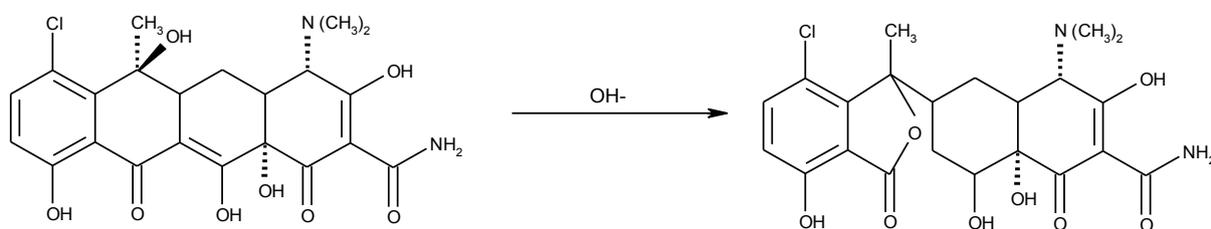


Abbildung 2-5: Bildung von iso-Chlortetracyclin

Die Isomerisierung ist irreversibel, allerdings können die iso-Tetracycline in einer reversiblen Reaktion zu epi-iso-Tetracyclinen epimerisieren. Iso-Tetracycline sind

aufgrund der Zerstörung des Keto-Enol-Systems zwischen C11a und C12 biologisch inaktiv.

2.3.3 Wasserabspaltung

Tetracycline, die am C6-Kohlenstoff mit einer Hydroxylfunktion substituiert sind, spalten bei niedrigen pH-Werten (≤ 2) Wasser ab und bilden unter Aromatisierung des C-Ringes Anhydrotetracycline. Die Wasserabspaltung ist irreversibel und wird durch Erwärmen begünstigt [23]. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 2-6 dargestellt.

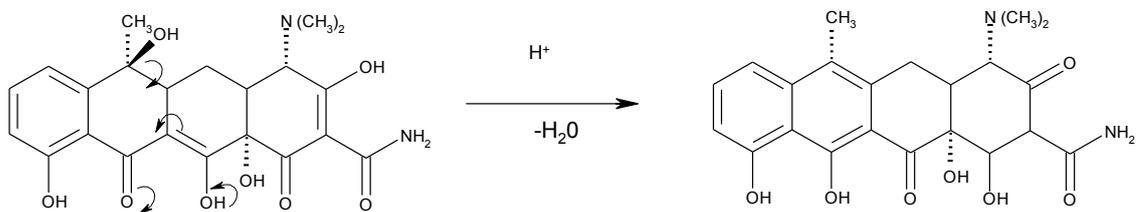


Abbildung 2-6: Bildung von Anhydrotetracyclin aus Tetracyclin

Epimerisierung tritt auch bei Anhydrotetracyclinen auf. Anhydrotetracycline und epi-Anhydrotetracycline zeigen bakterizide Wirkung. Diese beruht nicht - wie bei den übrigen Tetracyclinen - auf dem Erliegen der Proteinbiosynthese durch Bindung an das bakterielle Ribosom, sondern vielmehr auf der Zerstörung des Zellmembranpotentials [26]. In vivo zeigen Anhydrotetracycline hepatotoxische und phototoxische Wirkung, so dass eine Verwendung als Antibiotikum trotz der biologischen Aktivität nicht stattfindet [11, 23].

Anhydro-Oxytetracyclin ist aufgrund der Hydroxylfunktion am C5-Kohlenstoff instabil und bildet in einer Folgereaktion unter Spaltung des B-Ringes α - und β -apo-Oxytetracyclin [23] (Abbildung 2-7).

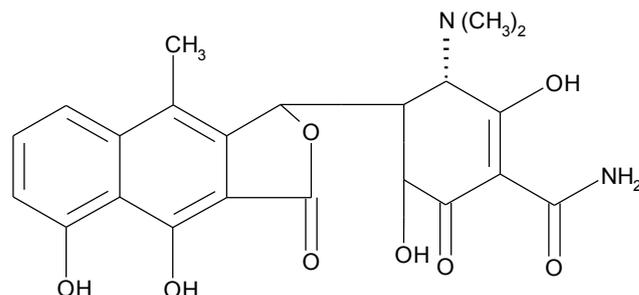


Abbildung 2-7: apo-Oxytetracyclin

2.3.4 Komplexbildung

Tetracycline bilden reversible Komplexe mit Metall-Kationen, Anionen, Neutralstoffen und Biopolymeren. Einen Überblick über Stoffe, mit denen Tetracycline Komplexe bilden können gibt Tabelle 2-3 [14].

Tabelle 2-3: Komplexbildner für Tetracycline

Metall-Kationen	Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Be^{2+} , Al^{3+} , Zr^{4+}
Anionen	Phosphat, Citrat, Salicylat, p-Hydroxybenzoat, Saccharin-Anion
Neutralstoffe	Coffein, Harnstoff, Thioharnstoff, Polyvinylpyrrolidon
Biopolymere	Serumalbumin, Lipoproteine, Globuline, RNA

Die Komplexbildung mit Metallkationen wird von der Ladung des Kations und dem pH-Wert der Lösung beeinflusst. In Lösung kann man daher in Abhängigkeit vom pH-Wert und dem Vorkommen von zwei- oder dreiwertigen Metallkationen verschiedene Komplexarten finden, die sich in Metall-Ligand-Verhältnis, Protonierungsgrad und Konformation unterscheiden [11, 27]. Unterhalb von pH 3 komplexieren Tetracycline nicht. Zwischen pH 3 und 7,5 kann das Phenol-Diketon-System der Ringe BCD ein Kation binden. Oberhalb von pH 7,5 wird die Dimethylaminogruppe am C4-Kohlenstoff deprotoniert, so dass hier ein weiteres Kation gemeinsam mit der cis-ständigen 12a-Hydroxyfunktion gebunden werden kann. Bei epi-Tetracyclinen ist die Hydroxyfunktion trans-ständig zur Dimethylaminogruppe, daher können epi-Tetracycline nur ein Metallkation komplexieren [11, 14]. Oxytetracycline können

aufgrund einer zusätzlichen Hydroxylfunktion am C5-Kohlenstoff oberhalb von pH 7 einen Chelatkomplex zwischen C5 und C12a bilden [14]. Die Komplexbildung mit Metallkationen verstärkt die Fluoreszenz von Tetracyclinen; dieser Effekt kann analytisch genutzt werden [28].

Die Bindung von Tetracyclinen an Proteine (beispielsweise Albumin, Globulin oder Lipoproteine) hängt ab vom pH-Wert, sowie Temperatur und Konzentration der Proteine. Bei der Bindung an Serumproteine handelt es sich um eine hydrophobe Bindung, die durch lipophile Gruppen verstärkt, durch hydrophile geschwächt wird. Es ist auch eine Abhängigkeit von der Konzentration an Ca^{2+} und Mg^{2+} zu beobachten; die Bindung von Tetracyclin an Proteine nimmt mit steigenden Konzentrationen der Kationen zu [14].

2.3.5 Protonierung und Keto-Enol-Tautomerie

Tetracycline können Protonen sowohl abgeben als auch aufnehmen und sind daher amphoter. Eine Protonierung oder Deprotonierung kann an folgenden Gruppen im Molekül auftreten: am C3-Sauerstoff, am C4-Stickstoff und an den Sauerstoffatomen am C10 und C12-Kohlenstoff. Die Konformation des Moleküls ist vom Protonierungszustand abhängig.

Am Ring A wird die Abspaltung eines Protons aus der Hydroxylgruppe am C3 durch die Ausbildung tautomerer Strukturen begünstigt, die Deprotonierung am C3 weist daher einen niedrigen pK_a -Wert auf ($\text{pK}_{a1} = 2,8 - 3,3$). Die tautomeren Grenzstrukturen am A-Ring sind in Abbildung 2-8 dargestellt.

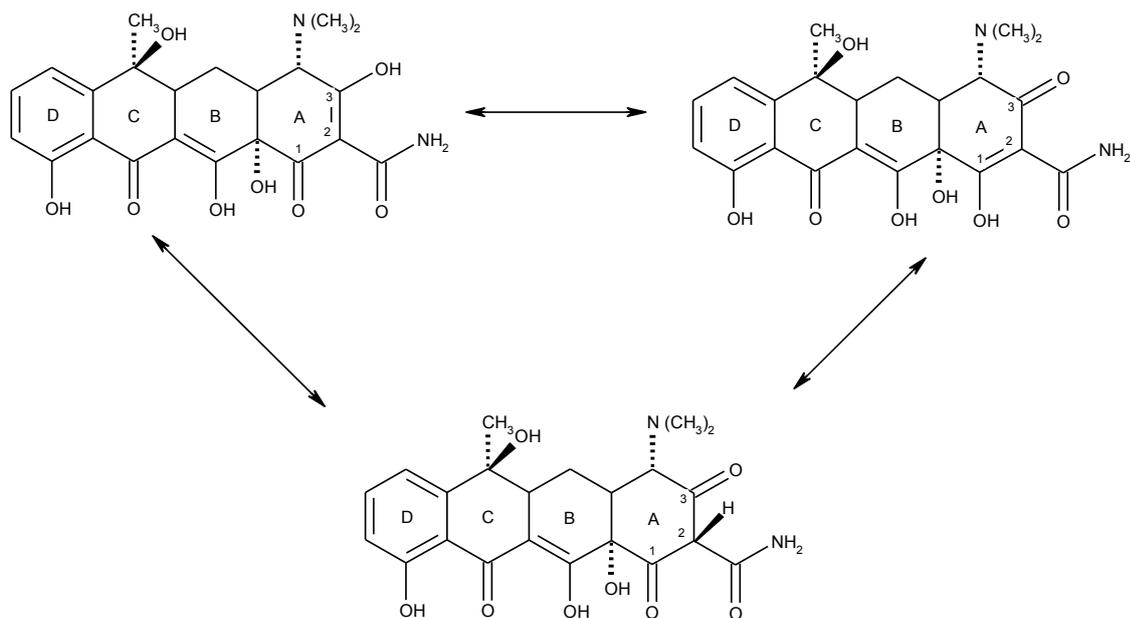


Abbildung 2-8: Tautomere Strukturen am A-Ring

Die Ringe B und C weisen zwischen den Kohlenstoffatomen C11, C11a und C12 ebenfalls eine Keto-Enol-Tautomerie auf, von der bei höheren pH-Werten die Abspaltung eines weiteren Protons erfolgt (pK_{a2}). Ein drittes Proton wird bei der Deprotonierung des protonierten Stickstoffs am C4 freigesetzt (pK_{a3}). Das Deprotonierungsschema ist in Abbildung 2-9 dargestellt. Von Duarte et al. wurde darüber hinaus auch die Abspaltung eines vierten Protons von der Hydroxylgruppe am C10 postuliert, der pK_a -Wert liegt für diese Deprotonierung zwischen 12 und 13. Im physiologischen pH-Bereich werden die Protonierungsgleichgewichte nicht durch die Deprotonierung des Protons am C10-Hydroxyl beeinträchtigt, so dass diese Reaktion vernachlässigt werden kann [29].

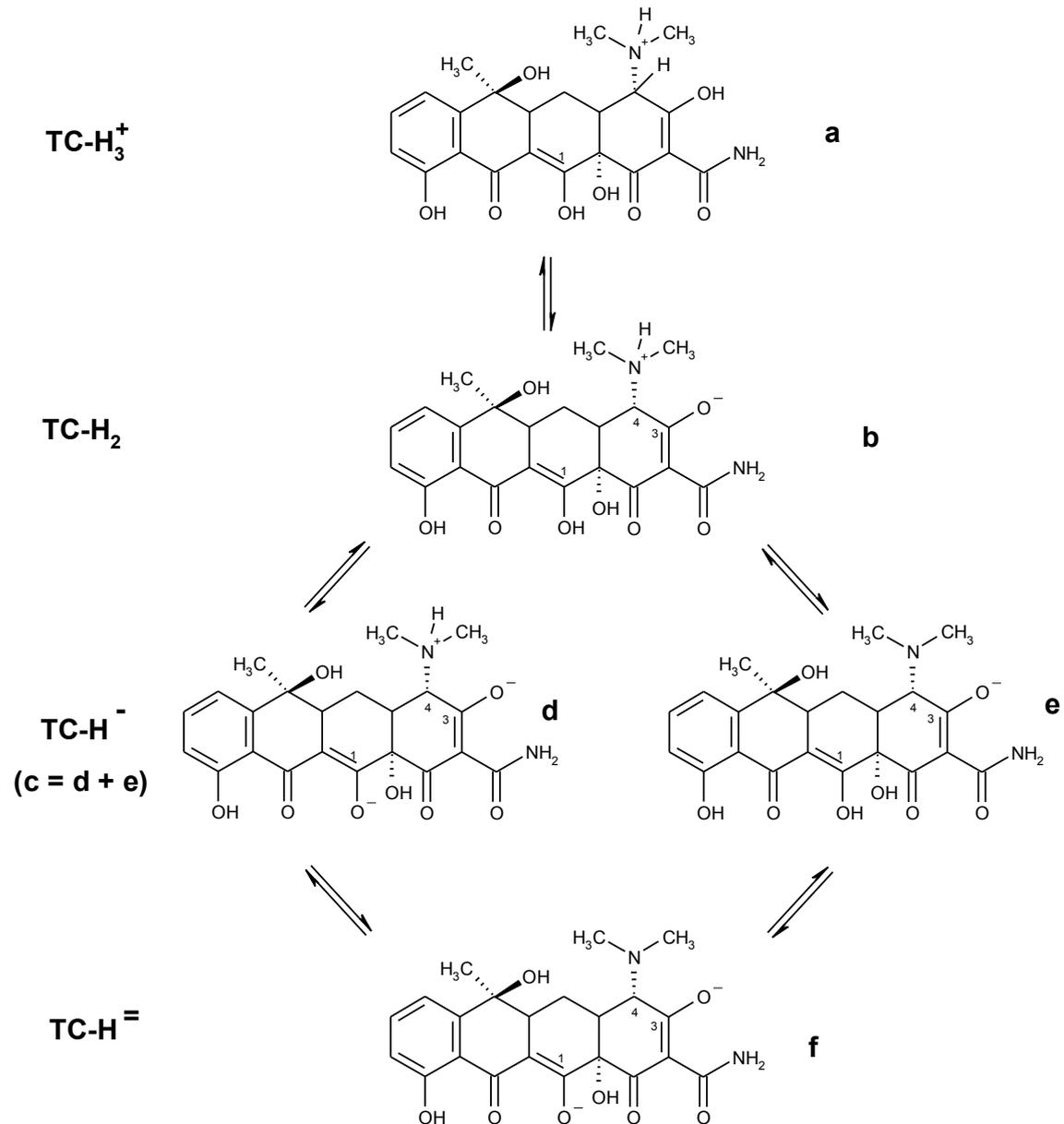


Abbildung 2-9: Schema der Deprotonierung von Tetracyclinen bei nach unten zunehmendem pH-Wert. Dargestellt sind die verschiedenen Formen, in denen Tetracyclin bei den unterschiedlichen pH-Werten vorliegt, für das einfach negativ geladene Tetracyclin sind zwei Formen möglich.

Von Qiang und Adams wurden die pK_a -Werte verschiedener Tetracycline ermittelt [30], eine Zusammenfassung zeigt Tabelle 2-4.

Tabelle 2-4: pK_a-Werte einiger Tetracycline nach [30], für die Messungen der pK_a-Werte wurden die Hydrochloride eingesetzt

	pK _{a1}	pK _{a2}	pK _{a3}
Tetracyclin	3,2	7,5	8,9
Oxytetracyclin	3,3	7,8	9,6
Chlortetracyclin	3,3	7,6	9,3
Doxycyclin	3,0	8,0	9,2

Tetracycline kommen in wässrigen Lösungen als Mischung von Formen mit unterschiedlichem Protonierungsgrad vor, was dadurch deutlich wird, dass die pK_a-Werte für die Deprotonierung des zweiten und dritten Protons dicht beieinander liegen. Das neutrale Tetracyclin liegt als Zwitterion vor, wie Abbildung 2-9 verdeutlicht. Abbildung 2-10 zeigt, zu welchem Anteil die verschiedenen Formen in wässrigen Lösungen im pH-Bereich von 2 bis 11 vorliegen. In der Darstellung wurden zur Vereinfachung Epimerisierung, Isomerisierung und Bildung von Anhydrotetracyclinen vernachlässigt.

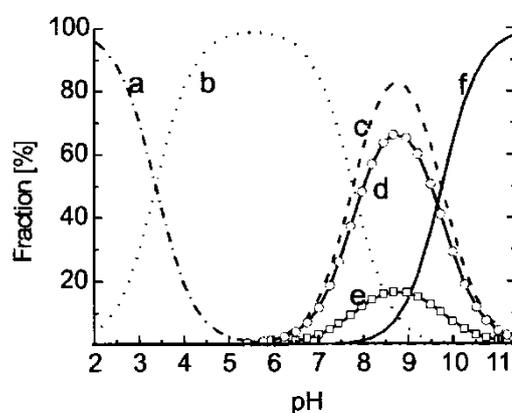


Abbildung 2-10: Anteil der verschiedenen Formen in wässriger Lösung bei verschiedenen pH-Werten (Abbildung entnommen aus [11]). a: TC-H₃⁺, b: TC-H₂[±], c: TC-H⁻, f: TC-H⁼. d und e entsprechen den zwei möglichen Formen des einfach geladenen Anions (siehe Abbildung 2-9), c beschreibt die Summe aus d und e.

Bei pH-Werten ≤ 2 liegt die vollständig protonierte Form TC-H₃⁺ vor (a). Bei steigendem pH-Wert wird entsprechend Abbildung 2-9 zunächst das Proton an der C3-Hydroxylfunktion abgespalten, wodurch sich die neutrale Form des Tetracyclins bildet (TC-H₂[±] (b)). Bei einem pH-Wert zwischen 5 und 6 liegt diese Form zu annähernd 100% vor. Eine weitere Deprotonierung findet bei einem pH-Wert oberhalb von 6 statt

und liefert die negativ geladene Form TC-H^- (c). Es existieren von dieser Form zwei Unterformen: eine trägt je eine negative Ladung an den Sauerstoffatomen am C3 und C12 sowie eine positive Ladung am Stickstoff der Dimethylaminofunktion (d), die andere Form trägt eine negative Ladung am Sauerstoff an C3 (e). Aus Abbildung 2-10 geht hervor, dass vorwiegend die Form (d) auftritt. Oberhalb von pH 7,5 wird die vollständig deprotonierte Form TC-H^{2-} (f) gebildet. Es wird deutlich, dass in wässrigen Lösungen über einen weiten pH-Bereich Tetracycline verschiedener Deprotonierungsstufen nebeneinander vorliegen, insbesondere im Bereich zwischen pH 6 und 11.

2.3.6 Tetracyclinderivate

Durch den massiven Einsatz von Tetracyclinen in der Veterinärmedizin und dem damit einhergehenden Selektionsdruck entwickelten viele Bakterien Resistenzen gegenüber Tetracyclinen (siehe Kapitel 2.5, Seite 21). Auf der Suche nach Struktureinheiten, mit denen Tetracycline die Resistenz umgehen können, wurde eine Vielzahl an Derivaten mit Substitutionen an C7, C8 und C9 synthetisiert [18, 31-35]. Für die Chemie und Synthese der Derivate, die aufgrund dieser Motivation entwickelt wurden sei auf die zitierte Literatur verwiesen. Im Folgenden soll auf Tetracyclinderivate eingegangen werden, bei denen nicht die antibiotische Wirkung im Vordergrund steht, sondern die Nutzung für eine analytische Fragestellung.

Zhang et al. und Pastor-Navarro et al. beschreiben die Derivatisierung von Tetracyclinen aus der Motivation heraus, diese für die Herstellung von Haptenen und Immunogenen zu nutzen [36, 37]. Von Pastor-Navarro et al. wurden 7 oder 9-(4'-carboxyphenylazo)-Derivate von Tetracyclin, Oxytetracyclin und Chlortetracyclin sowie Glycinmethyl-Derivate von Oxytetracyclin und Chlortetracyclin synthetisiert. Im Fall der Carboxyphenylazo-Derivate wurde dem Tetracyclinkern ein aromatischer Spacer am D-Ring hinzugefügt, im anderen Fall ein aliphatischer Spacer am A-Ring. Für die Herstellung von Immunogenen wurden diese Derivate über die Carboxylfunktion mit den Aminogruppen von Lysin aus BSA und OVA verknüpft. Die höchsten Antikörper-Titer wurden gegen Haptene gebildet, denen Oxytetracyclin zugrunde lag, die besten Resultate wurden mit 7 oder 9-(4'-carboxyphenylazo)-Oxytetracyclin

erreicht. Die dagegen gerichteten Antikörper konnten zur Entwicklung eines empfindlichen Enzymimmunoassays für Tetracycline genutzt werden [37]

Zhang et al. beschreiben ebenfalls die Synthese von 7 oder 9-(4'-carboxyphenylazo)-Tetracyclin. Daneben synthetisierten sie Tolidin-Derivate (Tolidinrest an 7-Position) und 1,1'-carbonyldiimidazol-Derivate von Tetracyclin. Bei letzterem wurde die Hydroxylfunktion am C6-Atom des Tetracyclins derivatisiert [36]. Die Haptene wurden an BSA und OVA gekoppelt und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Mit den gewonnenen Antikörpern wurde ein Enzymimmunoassay entwickelt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Doxycyclinderivate verwendet, die am C9-Kohlenstoff derivatisiert waren: 9-(5'-Aminopentanamido)-Doxycyclin, 9-(8-Aminooktanamido)-Doxycyclin und 9-(11-Aminoundekanamido)-Doxycyclin. Die Synthese wurde von Usai beschrieben [38].

2.4 Wirkung von Tetracyclinen

2.4.1 Aufnahme von Tetracyclinen in die Zelle

Tetracycline wirken durch die Bindung an bakterielle Ribosomen und müssen, um ihre Wirkung zu entfalten, zunächst zum Wirkort gelangen. Es wurde beobachtet, dass Tetracyclin-sensitive Bakterienzellen das Antibiotikum im Zytoplasma anreichern [39-41]; die Tetracyclinkonzentration nimmt dabei vom Umgebungsmedium über das Periplasma bis zum Zytoplasma zu. Da die Aufnahme von Tetracyclin in die Zelle gegen ein Konzentrationsgefälle erfolgt, wurde ein energieabhängiger Mechanismus postuliert. Bei gramnegativen Organismen passiert Tetracyclin als positiv geladener Komplex mit Magnesium die Zellwand durch Porin-Kanäle und gelangt ins Periplasma; für diesen Vorgang wird ein passiver Transport angenommen [42]. Durch das Donnan-Potential der Zellwand wird dieser Prozess unterstützt, da durch das Potential positiv geladene Ionen ins Zellinnere strömen.

In der Zytoplasmamembran wurden bisher keine spezifischen Carrier-Proteine identifiziert, so dass der Durchtritt der Tetracycline einem anderen Mechanismus folgen muss. Von Yamaguchi et al. wurde die pH-Differenz zwischen Zyto- und Periplasma als Motor für den Transport vorgeschlagen [39]. Sie zeigten, dass bei steigendem pH-Wert und

zunehmender Magnesiumkonzentration in der Zellumgebung die Aufnahme von Tetracyclin abnimmt. Dieses Ergebnis kann auf das Protonierungsgleichgewicht der Tetracycline (siehe Abschnitt 2.3.5) zurückgeführt werden; da Tetracyclin die Zytoplasmamembran in neutralem Zustand durchtritt und bei höherem pH-Wert weniger Tetracyclin in einer neutralen Form vorliegt (siehe auch Abbildung 2-10). Im Zytoplasma herrscht ein höherer pH-Wert vor als im Periplasma, wodurch das Protonierungsgleichgewicht von Tetracyclin verschoben wird und mehr negativ geladene Formen von Tetracyclin vorliegen. Im Zytoplasma findet daher wahrscheinlich eine Komplexierung mit Magnesiumionen statt [43]. Durch diese Komplexierung wird die negativ geladene Form aus dem Protonierungsgleichgewicht entfernt und dadurch die Konzentration der ungeladenen Spezies in der Zelle verringert. Dieser Effekt begünstigt die Anreicherung von Tetracyclin im Zytoplasma. Wird ein Gleichgewicht aller Formen erreicht, beträgt die Tetracyclinkonzentration innerhalb einer Zelle rechnerisch das Doppelte der Konzentration im Umgebungsmedium [44]. Für die Anreicherung von Tetracyclin und Minocyclin in *E.coli* wurde eine Anreicherung um den Faktor 100 beobachtet (Verhältnis der Konzentration in der Zelle gegenüber der Konzentration in der Umgebung), für *Staphylococcus aureus* eine Anreicherung um den Faktor 20 – 30 [45].

2.4.2 Wirkmechanismus

Tetracycline werden anhand ihres Wirkmechanismus in zwei Gruppen unterschieden: die „typischen“ Tetracycline, die bakteriostatische Wirkung zeigen und die „atypischen“ Tetracycline (beispielsweise Anhydrotetracycline), die bakterizid wirken. Atypische Tetracycline hemmen die Proteinbiosynthese nur in geringem Maße. Die bakterizide Wirkung beruht hier auf der Störung des elektrochemischen Potentials der Zytoplasmamembran [26].

Die bakteriostatische Wirkung der typischen Tetracycline beruht auf der Hemmung der Proteinbiosynthese am Ribosom und wird im Folgenden näher betrachtet. Für Tetracycline wurden von Pioletti et al. sechs mögliche Bindestellen an der kleinen Untereinheit des bakteriellen Ribosoms identifiziert [46], weitere Bindestellen auf der großen Untereinheit des Ribosoms wurden von Kolesnikov et al. beschrieben [47].

Die Bindestelle mit der höchsten Affinität für Tetracycline ($1,3 \cdot 10^6$ L/mol [48]) liegt sehr nahe der Stelle, an der sich die Aminoacyl-t-RNA für die Proteinbiosynthese anlagert (a-site). Die Bindung von Tetracyclin an das Ribosom erfolgt als Magnesiumkomplex über elektrostatische Wechselwirkungen (Salzbrücken) zwischen Magnesium und Phosphatresten der ribosomalen 16S RNA. Darüber hinaus werden auch Wasserstoffbrücken zwischen den Phosphatgruppen der RNA und den polaren Gruppen an der Unterseite des Tetracyclinmoleküls ausgebildet [49]. Die Anordnung der Substituenten in diesem Bereich ist für die Bindung von Tetracyclin ans Ribosom essentiell (siehe auch 2.4.3).

Durch die Bindung von Tetracyclin in unmittelbarer Nähe der a-site wird das Andocken von Aminoacyl-t-RNA an das Ribosom blockiert [50]. Aminoacyl-t-RNA-Moleküle haben die Funktion, Aminosäuren in aktivierter Form zum Ribosom zu transportieren, wo diese zu einer Peptidkette verknüpft werden. Wird die Anlagerung der Aminoacyl-t-RNA unterbunden, führt dies zu einem Abbruch der naszierenden Peptidkette, die Proteinbiosynthese kommt zum Erliegen.

Neben dem oben beschriebenen Wirkmechanismen wird auch über die Wechselwirkung von Tetracyclinen mit verschiedenen Enzymsystemen in der Zelle berichtet. So können Tetracycline Enzyme des Elektronentransports, Cytochromoxidase und auch die oxidative Phosphorylierung hemmen, darüber hinaus wurde auch die Inhibition der Synthese von Zellwand und Nucleinsäuren beschrieben [11, 14].

Obwohl sich die Ribosomen von Pro- und Eukaryoten in ihrem Aufbau unterscheiden, gehen Tetracycline auch Wechselwirkungen mit den Ribosomen von Eukaryoten ein, so wird insbesondere die mitochondriale Proteinsynthese bei Eukaryoten gehemmt [11, 14, 45]. Die 80S-Ribosomen von Säugern sind unempfindlicher gegenüber der Hemmung durch Tetracycline [51]. Dazu kommt, dass Tetracycline in Bakterienzellen aktiv aufgenommen werden, ein Mechanismus, der bei Eukaryoten nicht auftritt und zur Erklärung der Spezifität von Tetracyclinen für Prokaryoten beitragen kann [45].

2.4.3 Strukturelle Voraussetzungen für die biologische Aktivität von Tetracyclinen

Das strukturell einfachste Tetracyclin mit biologischer Wirksamkeit ist Sancyclin (Abbildung 2-3). Es weist die Strukturmerkmale auf, die für die biologische Aktivität, das heißt die hochaffine Bindung an das Ribosom, unerlässlich sind. Eine wesentliche Voraussetzung für die antibiotische Wirkung ist die lineare Anordnung der vier Ringe. Derivate mit weniger als vier Ringen und solche, bei denen Ringe aufgespalten sind (Iso-Tetracycline, apo-Oxytetracyclin) zeigen keine Hemmung der Proteinbiosynthese. Essentiell ist auch der aromatische Charakter des D-Ringes, wohingegen die Aromatisierung weiterer Ringe, beispielsweise des C-Ringes bei Anhydro-Tetracyclinen zu einem Wirkungsverlust führt [14].

Tetracycline tragen zwei Keto-Enol-Systeme (Abbildung 2-2). Modifikationen, die die Ausbildung von tautomeren Strukturen verhindern, resultieren im Verlust der biologischen Aktivität, gezeigt wurde dies am Beispiel von 11a-Halogenotetracyclinen sowie Pyrazoltetracyclin [14].

Eine bestimmte Konfiguration an den Asymmetriezentren C4, C4a und C12a ist essentiell für die biologische Aktivität, während die Konfiguration an den übrigen Zentren variieren kann. Die natürlich vorkommenden Tetracycline sind an C4a und C12a so konfiguriert, dass der A-Ring aus der Ebene der Ringe BCD gehoben wird. Wird Ring A durch Änderung der Molekülstruktur (beispielsweise durch Aromatisierung) in die Ebene, die von den Ringen BCD aufgespannt wird, hineingedrückt, geht die antibiotische Wirkung verloren [14]. Eine stereochemische Voraussetzung für die Hemmung der Proteinbiosynthese ist auch die α -Ständigkeit der Dimethylaminofunktion am C4, die β -ständigen Epimere zeigen nur eine sehr geringe Aktivität [21]. Tetracyclinderivate, die keine Dimethylaminogruppe am C4 tragen, zeigen keine Wirkung gegenüber Prokaryoten, wohl aber gegenüber eukaryotischen Zellen [11].

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Veränderungen der Tetracyclinstruktur an C1, C10, C11 und C12 zu einer Reduktion oder zum Verlust der antibiotischen Aktivität

führen, wohingegen der hydrophobe Bereich des Moleküls – C6, C7, C8 und C9 - modifiziert werden kann, ohne dass zwangsläufig die Fähigkeit zur Hemmung der Proteinbiosynthese vermindert wird [14, 52]. Die Zulässigkeit von Modifikationen an den genannten C-Atomen ermöglicht eine Modifikation der Moleküleigenschaften durch funktionelle Gruppen, dies wird bei der Teilsynthese neuer Tetracycline genutzt.

2.4.4 Anwendungen in der Veterinärmedizin

Das Wirkungsspektrum der Tetracycline umfasst grampositive sowie gramnegative Bakterien und Kokken, Spirochäten, Rickettsien, große Viren und Mykoplasmen. Pilze, Hefen und Protozoen sind gegen Tetracycline resistent [14]. Neben dem breiten Wirkungsspektrum förderten insbesondere auch die gute Resorption, geringe Toxizität sowie geringe Kosten den großflächigen Einsatz der Tetracycline [2].

Hauptanwendungsgebiete sind bakterielle Infektionen des Gastrointestinaltraktes und respiratorischem System, Hautinfektionen, Infektionen des Bewegungsapparates und systemische Infektionen. In der Europäischen Union sind im veterinärmedizinischen Bereich die Tetracycline Doxycyclin, Chlortetracyclin, Tetracyclin und Oxytetracyclin zugelassen.

Tetracycline können oral oder als Aerosol appliziert werden, beispielsweise wird dies in der Massentierhaltung von Vögeln eingesetzt [45]. Bei Wiederkäuern kann keine orale Applikation erfolgen, da die empfindliche Mikroflora im Wiederkäuermagen gestört wird, die Applikation von Tetracyclinen erfolgt hier intramuskulär oder intravenös [2]. Tetracycline spielen bei der Behandlung nahezu aller für die Fleisch- und Milchproduktion genutzten Tierarten (Schwein, Rind, Geflügel, Schafe, Ziegen) aber auch von Haustieren (Hunde, Katzen und Pferde) eine große Rolle. Auch in Aquakulturen werden häufig Tetracycline zur Vorbeugung von Infektionen eingesetzt [52]. Allein in den USA wurden im Jahr 2006 4210 t Tetracycline zur Behandlung von Tieren verkauft, über die Jahre 2004 – 2006 nahm die Menge der verkauften Tetracycline stetig zu [53].

Tetracycline eignen sich auch zur Behandlung einiger Bienenkrankheiten. Die Erreger der Amerikanischen und Europäischen Faulbrut, *Paenibacillus larvae* und *Melissococcus pluton* sind empfindlich gegen Tetracycline. Im Bereich der Behandlung

von Bienen oder auch zur Prävention werden zumeist Tetracyclin und Oxytetracyclin eingesetzt, die über das Futter verabreicht werden [54, 55]. In der Europäischen Union sind Tetracycline nicht für die Behandlung von Bienenvölkern zugelassen [56].

Neben der therapeutischen Wirkung zeigen Tetracycline – in subtherapeutischen Dosen verabreicht – wachstumsfördernde Eigenschaften und fanden auch als Wachstumsförderer einen breiten Einsatz in der Veterinärmedizin. In der Europäischen Union ist der Zusatz von Tetracyclinen zu Futtermitteln zum Zweck der Wachstumsförderung allerdings untersagt [57].

2.4.5 Toxikologie

Die Toxizität der Tetracycline gegenüber Säugern ist gering. Der LD₅₀-Wert für Tetracyclin und Chlortetracyclin in Mäusen und Ratten liegt zwischen 2150 und >5000 mg/kg Körpergewicht, der für Oxytetracyclin zwischen 3600 und 7200 mg/kg Körpergewicht. Vom JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives) wurden für Tetracyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin und Doxycyclin eine duldbare Tagesdosis (ADI, acceptable daily intake) von 0 – 30 µg/kg Körpergewicht festgesetzt [58]. Hinweise für eine Reproduktions- oder Genotoxizität von Tetracyclinen liegen nicht vor, eine cancerogene Wirkung wurde bisher nicht nachgewiesen [59, 60].

2.5 Tetracyclin-Resistenz

Die extensive Nutzung von Tetracyclinen seit der Entdeckung in den 50er Jahren führte schnell zur Entwicklung von Resistenzen. So wurde bereits 1953 das erste tetracyclin-resistente Bakterium (*Shigella dysenteriae*) isoliert [51]. 1955 wurde erstmalig eine Shigellenart mit einer Multidrugresistenz gegenüber Tetracyclin, Streptomycin und Chloramphenicol isoliert [61], diese kam in 0,02% der getesteten Fälle vor [52]. Bis 1960 zeigten etwa 10% der in Japan untersuchten Shigellen diese Multidrugresistenz. Studien aus den 90er Jahren zeigen, dass die Resistenz in Shigellen weiter zunahm, in den Jahren 1988 – 1993 waren bereits 60% der untersuchten Stämme von *Shigella flexneri* resistent [62]. Auch bei Enterobacteriaceen sowie Staphylokokken-, Streptokokken- und Bakteroiden-Arten wurde über ein erhöhtes Vorkommen von Tetracyclin-resistenz berichtet [52, 63].

Die rasche Verbreitung von Resistenzen ist darauf zurückzuführen, dass die für die Resistenz codierenden Gene meist auf mobilen Elementen (beispielsweise Plasmiden, Transposons oder Integrons) lokalisiert sind, die über einen horizontalen Gentransfer zwischen Bakterien weitergegeben werden können, auch wenn die Bakterien verschiedenen Arten angehören. Häufig wird beobachtet, dass mit den mobilen Elementen mehrere Resistenzgene gleichzeitig vermittelt werden [51, 52, 64]. Bakterien werden gegen antibiotische Substanzen resistent, wenn sie Mechanismen entwickeln oder erwerben, die ihnen erlauben, in der Gegenwart von Antibiotika zu überleben. Für Resistenz gegenüber Tetracyclin werden in Wesentlichen vier verschiedene Mechanismen beschrieben:

- Aktives Ausschleusen von Tetracyclin aus der Zelle (Efflux)
- Störung der Tetracyclin-Ribosom-Bindung durch die Bildung ribosomaler Schutzproteine
- Enzymatische Inaktivierung von Tetracyclin
- Veränderung der Zielstruktur durch Mutationen in der 16S-RNA

Derzeit sind 38 Gene beschrieben, die Tetracyclinresistenz vermitteln. Der Großteil (23 Gene) codiert für Effluxproteine, 11 Gene codieren für ribosomale Schutzproteine, 3 Gene codieren für ein Enzym, das Tetracyclin inaktiviert, während der Resistenzmechanismus, für den ein weiteres Gen codiert noch nicht aufgeklärt ist [51, 64].

2.5.1 Ausschleusen von Tetracyclin (Efflux) und Genregulation

Durch das aktive Ausschleusen von Tetracyclin aus der Zelle wird verhindert, dass im Zytoplasma Tetracyclinkonzentrationen erreicht werden, die die Proteinbiosynthese hemmen. Der Mechanismus des aktiven Ausschleusens wird auch als Efflux bezeichnet. Es ist der bei gramnegativen Bakterien am häufigsten vorkommende Resistenzmechanismus, das Auftreten von Efflux-Pumpen wurde aber auch bei grampositiven Bakterien beschrieben.

Mit dem Begriff „Effluxpumpen“ werden membrandurchspannende Proteine bezeichnet, deren Funktion darin besteht, Tetracycline (oder andere Stoffe) energieabhängig gegen Protonen auszutauschen und dadurch deren Konzentration in der Zelle zu verringern. Am Effluxprotein TetA wurde gezeigt, dass ein Proton gegen den

einfach positiv geladenen Komplex $[\text{TC-Mg}]^+$ im Verhältnis 1:1 ausgetauscht wird, der Austausch demnach elektrochemisch neutral erfolgt [65]. Sowohl in grampositiven als auch gramnegativen Bakterien ist die Expression von Effluxproteinen streng reguliert, allerdings unterscheiden sich die Regulationsmechanismen. Die Regulation ist zum Schutz der Zelle notwendig: Bei einer permanenten Expression von Effluxproteinen und deren Einbau in die Zellmembran würden auch bei Abwesenheit von Tetracyclin Protonen in die Zelle aufgenommen werden, wodurch das Membranpotential gestört würde [66]. Daher wird das Effluxprotein von der Bakterienzelle nur dann exprimiert, wenn Tetracyclin in die Zelle eindringt. Allerdings muss die Bildung des Proteins bereits bei einer Konzentration einsetzen, bei der die Proteinbiosynthese noch nicht gehemmt wird. Die Genregulation für die Expression bei gramnegativen Bakterien wird im Folgenden für das Effluxprotein TetA beschrieben.

Das für TetA codierende Gen ist auf der DNA hinter einer kurzen Operator-Sequenz O2 (auch *tetO2*) angeordnet. In Abwesenheit von Tetracyclin ist an die Operatorsequenz ein Protein gebunden, das die Transkription des Gens verhindert. Dieses Protein wird als Tetracyclin-Repressor TetR bezeichnet. Die Expression des Repressorproteins wird ebenfalls durch eine Operatorsequenz (*tetO1*) reguliert. Das Gen, das für das Repressorprotein codiert, liegt in direkter Nachbarschaft zum *tetA*-Gen, wird aber in umgekehrter Richtung abgelesen. Das Repressorprotein TetR bindet an beide Operatorsequenzen *tetO1* und *tetO2* und verhindert damit in Abwesenheit von Tetracyclin sowohl die Expression des Effluxproteins TetA als auch die Expression von weiterem TetR.

Wird Tetracyclin in die Bakterienzelle aufgenommen, bildet es im Cytoplasma einen Magnesiumkomplex. Dieser bindet mit einer hohen Affinität an den Tet-Repressor und bewirkt dadurch eine Konformationsänderung des Proteins, die in der Ablösung des Repressors von der Operatorsequenz resultiert. Nach der Ablösung des Repressors können die Proteine TetA und TetR exprimiert werden. Das gebildete TetA wird in die Zellmembran eingebaut und schleust den Tetracyclin-Magnesiumkomplex im Austausch gegen Protonen aus der Zelle.

Der exprimierte Repressor TetR bindet in der Zelle vorhandenes Tetracyclin, bevor dieses an das Ribosom binden kann. TetR bindet Tetracyclin mit einer etwa 1000fach höheren Affinität als das Ribosom [67]. Ist alles in der Zelle vorliegende Tetracyclin entweder ausgeschleust oder von TetR gebunden, bindet das überschüssige TetR an die Operatorsequenzen tetO1 und tetO2 und stoppt dadurch die Expression der Proteine. Zur Veranschaulichung ist der Mechanismus in Abbildung 2-11 dargestellt.

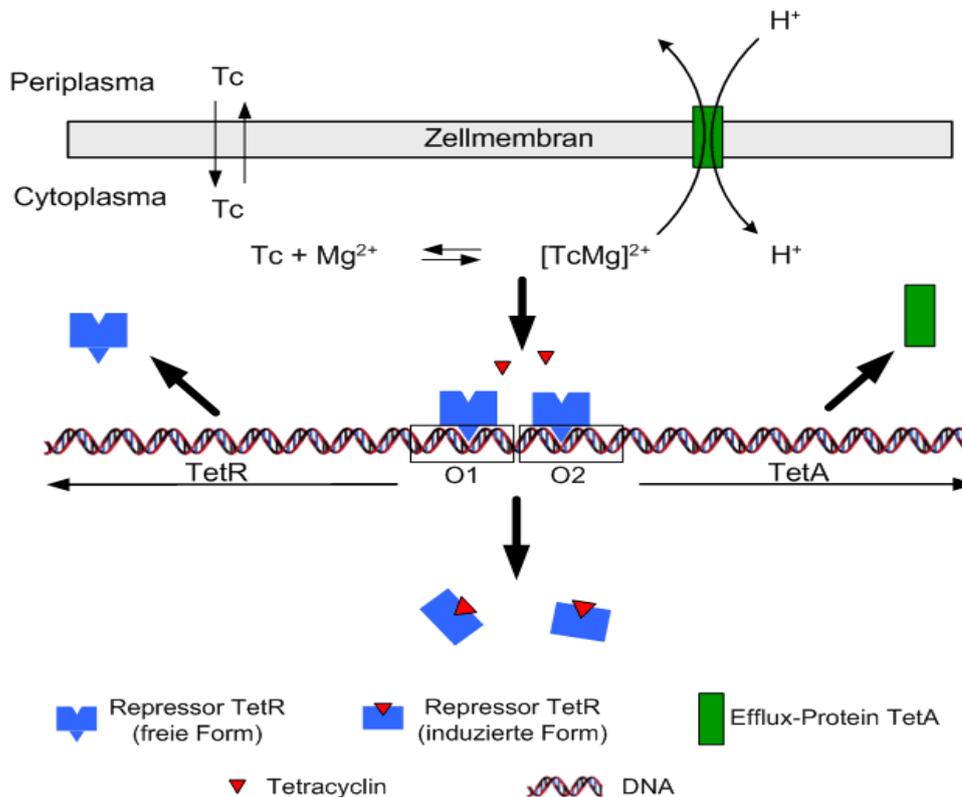


Abbildung 2-11: Schematische Darstellung des Resistenzmechanismus bei gramnegativen Organismen einschließlich der Genregulation nach [67]

Neben dieser Art bestehen weitere Möglichkeiten der Steuerung der Expression von Effluxproteinen. Beispielsweise codiert *tet(35)* für eine Effluxpumpe; anstelle der Steuerung über ein Repressorprotein ist jedoch in diesem Fall die Expression eines Proteins notwendig, das die Effluxpumpe aktiviert [68].

Einige grampositive Bakterien steuern die Expression von Effluxproteinen mittels eines attenuativen Mechanismus, die Steuerung erfolgt dann nach der Transkription auf der Ebene der m-RNA. Weitere Informationen zu diesem Mechanismus finden sich in der zitierten Literatur [69-71].

2.5.2 Bildung von ribosomalen Schutzproteinen

Gene, die für ribosomale Schutzproteine codieren, wurden in grampositiven und gramnegativen Bakterien nachgewiesen [2, 43]. Die Proteine binden nahe der Stelle am Ribosom, an der Tetracyclin gebunden ist und induzieren GTP-abhängig die Ablösung von Tetracyclin [72]. Das Antibiotikum wird dabei ins Zytosol abgegeben, kann jedoch an eine der sechs weniger spezifischen Bindungsstellen des Ribosoms binden. Ribosomale Schutzproteine vermitteln daher nur bei geringen Tetracyclin-konzentrationen Resistenz [46, 73].

2.5.3 Enzymatische Inaktivierung

Bislang wurde nur ein Enzym charakterisiert, das in der Lage ist, Tetracyclin abzubauen (TetX). TetX ist eine flavinabhängige Monooxygenase, die in Anwesenheit von Sauerstoff und NADPH Tetracyclin am C11a-Kohlenstoff hydroxyliert. Die hydrophile Unterseite des Tetracyclinmoleküls wird für die Bindung an das Ribosom benötigt. Durch die Einführung einer Hydroxylfunktion am C11a-Kohlenstoff kann zwischen C11 und C12 keine Komplexierung von Magnesium erfolgen (vergleiche auch Absatz 2.4.3, Seite 19). Die Unfähigkeit, einen Magnesiumkomplex zu bilden, verhindert die Bindung von Tetracyclin an das Ribosom. Das Reaktionsprodukt der Hydroxylierung ist sehr labil und zerfällt bei physiologischem pH-Wert [74, 75].

2.5.4 Mutation der 16S-RNA

Von Ross et al. wurde von resistenten Propionibakterien berichtet, bei denen die Tetracyclinresistenz durch den Austausch von Cytosin mit Guanin in Position 1058 (*E. coli*) der 16S-RNA-Sequenz vermittelt wird [76]. Hierbei handelt es sich um eine Mutation im Genom des Bakteriums, die nicht auf mobilen Elementen lokalisiert ist. Ein horizontaler Gentransfer kann nicht erfolgen, so dass die Verbreitung dieser Resistenz von untergeordneter Bedeutung ist [73].

2.6 Das Operator-Repressor-System

2.6.1 Tetracyclin-Repressoren

Die Tetracyclin-Repressor Proteine werden anhand der Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenzen in 9 Klassen eingeteilt: TetR(A) bis TetR(E), TetR(G), TetR(H), TetR(J) und TetR(30) [77, 78]. Die Aminosäuresequenzen der Proteine zeigen eine Übereinstimmung von 38 – 88%, konserviert sind insbesondere die Aminosäuren, die an der Bindung an den Operator oder der Tetracyclinbindung beteiligt sind [67]. Die Länge der Peptidketten liegt für die verschiedenen TetR-Varianten zwischen 207 und 218 Aminosäuren [67].

Der Tet-Repressor ist ein Homodimer aus zwei identischen Monomeren. Jedes Monomer ist in 10 α -Helices gefaltet, die mit $\alpha 1$ bis $\alpha 10$ für das eine und $\alpha 1'$ bis $\alpha 10'$ für das andere Monomer bezeichnet werden. Die beiden Monomere sind rotationssymmetrisch angeordnet [79-81]. Der Repressor lässt sich unterteilen in zwei kleine, N-terminale Domänen, die für die Bindung an die DNA verantwortlich sind und eine große globuläre Kerndomäne. Jede DNA-bindende Domäne wird von einem 3-Helix-Bündel (Helices $\alpha 1$ bis $\alpha 3$ beziehungsweise $\alpha 1'$ bis $\alpha 3'$) gebildet. Die Helices $\alpha 3$ und $\alpha 3'$ sorgen für die Erkennung der DNA, die Helices $\alpha 1$ und $\alpha 2$ sowie $\alpha 1'$ und $\alpha 2'$ für die Positionierung des Repressors an der DNA. Der Abstand der Erkennungshelices wird durch die Helices $\alpha 4$ und $\alpha 4'$ kontrolliert, die die DNA-bindenden Domänen mit der Kerndomäne verknüpfen.

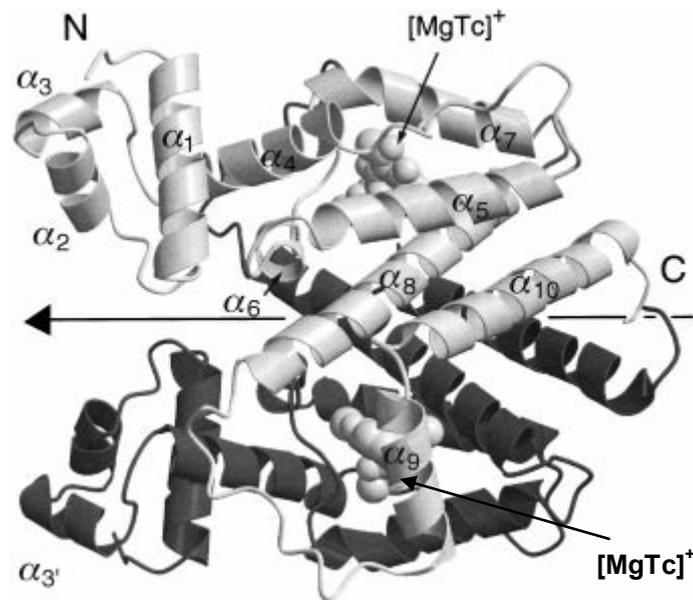


Abbildung 2-12: Struktur des Repressors TetR(D) als Komplex mit zwei Tetracyclinmolekülen. In hell und dunkel dargestellt sind die beiden Untereinheiten des Proteins. Die Lage der α -Helices der hell dargestellten Untereinheit ist mit α_1 bis α_{10} gekennzeichnet. Beginn und Ende der Aminosäurekette sind mit N für den N-Terminus und C für den C-Terminus gekennzeichnet. Der Pfeil beschreibt die Rotationsachse des Moleküls. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Prof. Wolfram Saenger, Freie Universität Berlin [67])

Die Helices α_5 bis α_8 des einen und α_8' und α_9' des anderen Monomers bilden jeweils eine Bindetasche für Tetracyclin, das Dimer verfügt über 2 Bindetaschen. Wird Tetracyclin als Magnesiumkomplex gebunden, schiebt sich die Helix α_9 wie eine Schiebetür hinter die Bindetasche, so dass Tetracyclin vollständig eingeschlossen ist [79]. Der Tet-Repressor bindet den $[\text{MgTc}]^+$ -Komplex mit einer sehr hohen Affinität. Für TetR(BD) (synthetische Chimäre der natürlich vorkommenden Repressoren TetR(B) und TetR(D)) wurde eine Affinitätskonstante von $5,3 \cdot 10^9$ L/mol bestimmt [82].

2.6.2 Tetracyclin-Operator

Zwischen den beiden Genen *tetR* und *tetA* liegen die Operator-Sequenzen O1 und O2. Bei beiden Operatoren handelt es sich um palindrome Sequenzen, das heißt, dass der komplementäre Strang in gegenläufiger Richtung dieselbe Basensequenz aufweist. Jeweils in der Mitte des Operators liegt ein nicht-palindromes Basenpaar, das nicht an der Repressor-Bindung beteiligt ist (Basenpaar 0, die Nummerierung weiterer Basen erfolgt ausgehend von diesem Basenpaar 0 nach rechts mit positiven Zahlen, nach links mit negativen Zahlen) (siehe Abbildung 2-13).

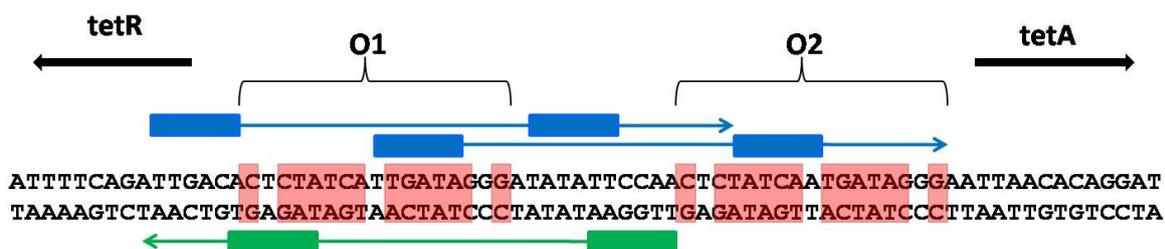


Abbildung 2-13: Nukleotidsequenz der Operatoren O1 und O2 für die Klasse TetR(D) aus dem Resistenzfaktor RA1 [63]. Palindrome Sequenzen sind rot unterlegt. Die schwarzen Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung der beiden Resistenzdeterminanten tetR und tetA. Mit den farbigen Pfeilen sind die Promotoren von tetA (blau) und tetR (grün) markiert, die Bindungsregionen für RNA-Polymerase sind durch dicke Balken hervorgehoben.

Die Bindung des Tet-Repressors an die Operator-Sequenz erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Kräfte. Die Bindung wird von zwei α -Helices des TetR vermittelt, die in zwei nebeneinander liegenden großen Furchen der Operatorsequenz positioniert werden. Mittels Röntgenstrukturanalyse zeigten Orth et al., dass die Basenpaare -7 bis +7 an der Bindung des Repressors beteiligt sind [83]. Die Aminosäuren der α -Helices α_2 und α_3 bilden van-der-Waals-Bindungen und spezifische Wasserstoffbrückenbindungen zu den Basen G2, A3 und T4 des parallelen und T5 des antiparallelen Stranges aus [67], diese Basen sind daher für die Bindung des Repressors von besonderer Bedeutung. TetR(BD) bindet mit einer Affinitätskonstante von $5,6 \cdot 10^9$ L/mol an *tetO1* [84].

2.6.3 Induktion des Repressors durch $[\text{MgTc}]^+$

Die Regulation der Genexpression beruht darauf, dass Tetracyclin an den Tet-Repressor bindet und dessen Ablösung von der zugehörigen Operatorsequenz bewirkt, so dass ein Effluxprotein exprimiert werden kann, das Tetracyclin aus der Zelle schleust. Die Bindung von Tetracyclin an den Repressor erfolgt als Komplex mit einem zweiwertigen Metallkation [85]. Unter physiologischen Bedingungen wird Tetracyclin meistens von Magnesiumionen komplexiert; allerdings sind auch andere zweiwertige Metalle in der Lage, Tetracyclin zu komplexieren und die Ablösung des Repressors zu induzieren. Beispielsweise binden Fe^{2+} -Ionen etwa 100fach stärker an Tetracyclin als Mg^{2+} und zeigen auch eine etwa 1000fach höhere Induktion [86, 87]. Bei Abwesenheit zweiwertiger Metallkationen fällt die Bindungsaffinität um einige Größenordnungen (Affinitätskonstante $< 10^5$ L/mol) [86].

Die Bindetasche für Tetracyclin wird von den Helices $\alpha 5$ und $\alpha 7$ sowie der Schleife zwischen $\alpha 6$ - $\alpha 7$ und $\alpha 9'$ gebildet. Der Komplex $[\text{MgTc}]^+$ gelangt mit dem Ring A voran in die Bindetasche. Die Erkennung des $[\text{MgTc}]^+$ -Komplexes wird durch die Koordination des Mg^{2+} und Wasserstoffbrückenbindungen mit TetR-Seitenketten vermittelt. Mg^{2+} wird durch die O11/O12-Ketoenolatgruppe des Tetracyclin, durch eine Histidin-Seitenkette im TetR sowie drei Wassermoleküle oktaedrisch koordiniert. Zwei der Wasserliganden bilden Seitenketten zum Carboxylatrest einer Glutaminsäureseitenkette aus und liefern dadurch einen wichtigen Beitrag zur Erkennung und Bindung des Tetracyclins. Darüber hinaus werden weitere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Hydroxylgruppen von Tetracyclin mit Seitenketten verschiedener Aminosäuren im TetR ausgebildet, zusätzlich steht der aromatische D-Ring von Tetracyclin mittels van-der-Waals-Wechselwirkungen mit hydrophoben Seitenketten am TetR in Kontakt [80]. Neben der Erkennung von Tetracyclin sind Wassermoleküle auch daran beteiligt, TetR nach der Induktion durch Tetracyclin in einer Konformation zu fixieren, die die Bindung an *tetO* verhindert [88].

Die Bindung des Tetracyclins bewirkt eine Verschiebung von Helix $\alpha 6$, die ihrerseits zu einer leichten Rotation von Helix $\alpha 4$ führt. Letztendlich führt dies zu einer Verformung des Moleküls, wodurch sich der Abstand der beiden DNA-erkennenden Helices $\alpha 3$ und $\alpha 3'$ der beiden Monomere um etwa 3 Å vergrößert. Dies resultiert in einer Ablösung des Repressors, da im induzierten Zustand die Bindungsaffinität zu *tetO* um 6 bis 10 Größenordnungen geringer ist als im nicht-induzierten Zustand [67]. Die Induktion des Repressors setzt bereits bei einer Tetracyclinkonzentration von etwa 1 $\mu\text{Mol/l}$ in der Bakterienzelle ein [79].

2.7 Einsatz von Tetracyclinen bei lebensmittelliefernden Tieren: rechtliche Regelungen

Durch den Einsatz von Tierarzneimitteln bei Tieren, die der Produktion von Lebensmitteln dienen, können Rückstände dieser Tierarzneimittel in den Lebensmitteln dieser Tiere vorhanden sein. Tierarzneimittelrückstände werden definiert als „alle pharmakologisch wirksamen Stoffe“ – seien es wirksame Bestandteile, Arzneiträger oder Abbauprodukte – und ihre Stoffwechselprodukte, die in Nahrungsmitteln auftreten, welche von Tieren gewonnen wurden, denen das betreffende Tierarzneimittel verabreicht wurde“ [89]. Für die Behandlung lebensmittelliefernder Tiere mit Arzneimitteln wurden rechtliche Regelungen etabliert, die den Verbraucher vor einer gesundheitlichen Beeinträchtigung durch Tierarzneimittelrückstände in Lebensmitteln tierischen Ursprungs schützen sollen. Auf Grundlage einer toxikologischen Bewertung wurden Höchstmengen (MRL-Werte = **m**aximum **r**esidue **l**imit) für Tierarzneimittelrückstände festgesetzt, bei denen keine Gefahr für die Gesundheit des Verbrauchers besteht. Eine Auflistung der in der Europäischen Union bisher festgelegten MRL-Werte findet sich in den Anhängen der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates „Zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs“ beziehungsweise den Änderungen der Anhänge [90, 91]. In der Europäischen Union sind zur Behandlung von Tieren die Tetracycline Tetracyclin, Oxytetracyclin Chlortetracyclin und Doxycyclin zugelassen, die entsprechenden MRL-Werte sind in Tabelle 2-5 wiedergegeben. Doxycyclin ist nur für die Behandlung von Rind, Schwein und Geflügel zugelassen, wohingegen die anderen drei Tetracycline für „alle zur Lebensmittelerzeugung genutzten Arten“ zugelassen sind, dieser Terminus schließt allerdings Honigbienen nicht ein. Dies ergibt sich aus der Erklärung zu Verordnung (EG) Nr. 1000/98 der Kommission, in der es heißt: „Bei Tierarzneimitteln, die für Legegeflügel, Tiere in der Laktationsphase oder Honigbienen bestimmt sind, müssen auch Höchstmengen für Rückstände in Eiern, Milch oder Honig festgelegt werden“ [90].

Tabelle 2-5: zulässige Höchstmengen für Tetracycline in Lebensmitteln in der Europäischen Union

Pharmakologisch aktive Substanz	Markerrückstand	Tierart	Lebensmittel	MRL [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
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/Haut	300
		Muskel	100	

Für Tetracyclin, Oxytetracyclin und Chlortetracyclin wurden identische MRLs festgelegt, die für die Summe aus Muttersubstanz und 4-Epimer gelten, das sich durch den tierischen Metabolismus oder bei der Probenaufarbeitung bilden kann. Doxycyclin hingegen zeigt bei der Probenaufarbeitung keine Epimerisierung, so dass die MRLs hier nur für die Muttersubstanz festgesetzt wurden. Unterschiedliche MRLs für die verschiedenen Zielgewebe tragen sowohl dem Verzehrverhalten des Konsumenten als auch der Pharmakokinetik der Antibiotika Rechnung. Sind in einem Lebensmittel Tierarzneimittelrückstände vorhanden, deren Gehalt höher liegt als der MRL, oder enthalten Lebensmittel ein für diese Art nicht zugelassenes Antibiotikum, dürfen sie nach deutschem Recht gemäß §10 Abs. 1, Nr. 2 des Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB) nicht in den Handel gelangen [92].

Die Gesetzgebung im außereuropäischen Ausland ist mitunter weniger strikt, insbesondere in den USA sind höhere Gehalte (bis zu Faktor 20) an Rückständen

zulässig. Als Beispiele für die Gesetzgebung außerhalb der europäischen Union sind im Folgenden die geltenden Zulassungen und Höchstmengen in den USA und Japan genannt. In den USA sind verschiedene Formulierungen für Tetracycline zugelassen, einen Überblick gibt Tabelle 2-6. Oxytetracyclin ist zur Behandlung von Bienen zugelassen.

Tabelle 2-6: Zulassung von Tetracyclinen (verschiedene Formulierungen) in den USA nach [93]

Tetracyclin	Lebensmittelliefernde Tiere, für deren Behandlung Formulierungen des Wirkstoffes zugelassen sind
Tetracyclin	Rind, Kalb, Geflügel (ohne Legehennen/ Puten), Schwein, Schaf, Pferd
Oxytetracyclin	Rind, Kalb, Geflügel (ohne Legehennen/ Puten), Schwein, Schaf, Fisch, Honigbiene
Chlortetracyclin	Rind, Kalb, Geflügel (ohne Legehennen/ Puten), Schwein, Ente, Schaf

Höchstmengen sind in den USA für die Summe der Wirkstoffe Tetracyclin, Oxytetracyclin und Chlortetracyclin festgesetzt (Tabelle 2-7).

Tabelle 2-7: In den USA geltende Höchstmengen für Tetracycline in Lebensmitteln nach [93]

Wirkstoff	Spezies	Höchstmenge für die Summe von CTC, OTC und Tetracyclin [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	
Tetracyclin, Chlortetracyclin, Oxytetracyclin	Rinder, Milchkühe, Kälber Schweine, Hühner, Truthähne, Fische, Hummer	Muskel	2000
		Leber	6000
		Fett und Niere	12000
		Milch	300

Die in Japan geltenden Höchstmengen für Tetracycline sind in Tabelle 2-8 zusammengefasst. Sie liegen mit Ausnahme von Milch doppelt so hoch wie die in der Europäischen Union festgesetzten. In Japan ist eine vorläufige Höchstmenge von Tetracyclinen in Honig festgesetzt, weitere vorläufige Höchstmengen finden sich für andere Tierarten und essbare Schlachtabfälle [94].

Tabelle 2-8: In Japan geltende Höchstmengen für die Summe aus Tetracyclin, Chlortetracyclin und Oxytetracyclin [94]

Wirkstoff	Spezies	Höchstmenge für die Summe von CTC, OTC und Tetracyclin [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Tetracyclin, Chlortetracyclin, Oxytetracyclin	Rind, Schwein, Schaf, Huhn, Ente, Truthahn	Muskel 200 Leber 600 Niere 1200 Milch 100 Hühnerei 400
Tetracyclin, Chlortetracyclin, Oxytetracyclin	Honig	300 (vorläufig festgelegte Höchstmenge)

Die in Japan geltenden Höchstmengen entsprechen - mit Ausnahme von Honig - den von der Codex Alimentarius Kommission von FAO und WHO als MRLs für Tetracyclin, Chlortetracyclin und Oxytetracyclin vorgeschlagenen MRL-Werten [95].

3 ANALYTIK VON TETRACYCLINRÜCKSTÄNDEN

Für den Nachweis von Tetracyclinrückständen in Lebensmitteln können verschiedenste Verfahren eingesetzt werden. Für eine grobe Einteilung können die folgenden Gruppen unterschieden werden: mikrobiologische und immunochemische Verfahren und chemisch-physikalische. Während bei den mikrobiologischen Verfahren der Rückstand durch die Hemmwirkung auf Bakterien nachgewiesen wird (Hemmstofftest), wird bei immunochemischen Verfahren die Antikörper-Antigen-Erkennung genutzt. Neben Antikörpern kann auch die Erkennung des Analyten durch Rezeptoren zum Nachweis genutzt werden (Rezeptortest). Bei den immunochemischen Verfahren kann zwischen spezifischen und gruppenspezifischen Verfahren unterschieden werden. Mit Hilfe spezifischer Verfahren können einzelne Wirkstoffe selektiv nachgewiesen werden. Bei gruppenspezifischen Verfahren hingegen „erkennt“ der Antikörper oder Rezeptor alle Substanzen einer Wirkstoffklasse, die bestimmte strukturelle Merkmale erfüllen. Somit ist der Nachweis ganzer Wirkstoffklassen möglich. Gerade weil die genannten Verfahren häufig gruppenspezifisch und darüber hinaus leicht handhabbar und kostengünstig sind, werden sie als Screening-Verfahren eingesetzt, um einen ersten Überblick über die Antibiotika-Belastung von Proben zu bekommen.

Um Rückstände von Tierarzneimitteln in Lebensmitteln effektiv nachzuweisen, müssen die Screening-Verfahren durch chemisch-physikalische Methoden ergänzt werden, die eine präzise Quantifizierung erlauben und Aufschluss über die chemische Struktur des Rückstandes geben. Überwiegend werden dazu chromatographische Verfahren eingesetzt, aber auch elektrophoretische Verfahren werden beschrieben. Im Folgenden soll ein Überblick über die jüngsten Entwicklungen und gängigsten Verfahren der Rückstandsanalytik gegeben werden, wobei der Schwerpunkt auf dem Nachweis von Tetracyclinrückständen in Honig liegt.

3.1 Mikrobiologische und immunchemische Verfahren

3.1.1 Hemmstofftests

Hemmstofftests haben aufgrund ihrer geringen Kosten und technisch einfachen Durchführung eine große Bedeutung. Sie nutzen die Sensitivität ausgesuchter Mikroorganismen (Testkeime) gegenüber Antibiotika und anderen Hemmstoffen. Bei Anwesenheit von Hemmstoffen reduzieren oder verhindern diese die Stoffwechselaktivität und damit auch die Vermehrung der Testkeime. Indikatoren für die Vermehrung der Testkeime können Keimdichte oder Trübung der Medien sein (Hemmhofftest). Die Beurteilung der Stoffwechselaktivität kann auch über die vom ungehemmten Testkeim gebildeten Stoffwechselprodukte wie beispielsweise Säuren oder Redoxäquivalente erfolgen. Für die Testprinzipien des Premitest[®] und Delvotests[®] werden die in Abwesenheit von Hemmstoffen im Stoffwechsel des Testkeims gebildeten Säuren genutzt, die einen Umschlag des im Medium enthaltenen Farbindikators bewirken [96-98]. Neben den beiden genannten Tests sind eine Reihe von Tests anderer Hersteller kommerziell erhältlich, die auf diesem Prinzip beruhen, beispielsweise der Cowside-Test [99] oder der Copan Milk Test [100].

Beim Brillantschwarz-Reduktionstest überführen die Testkeime während der Inkubation den Redoxindikator (Brillantschwarz) durch Spaltung zweier Azobindungen in eine gelbe Reduktionsstufe; bei Proben, die Hemmstoffe enthalten, bleibt die ursprüngliche Färbung erhalten (blau) [101, 102]. Auch in die Amtlichen Sammlung der Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB haben Hemmstofftests Einzug gehalten. Hier wird ein Plättchentest vorgeschlagen, bei dem die Probe auf eine Agar-Platte aufgebracht wird, die mit Sporen beimpft ist. Der Agar wird über Nacht inkubiert und anschließend das Bakterienwachstum visuell bewertet. Sind in der Probe Hemmstoffe vorhanden, diffundieren diese in den umliegenden Agar, wo das Bakterienwachstum gehemmt wird (Hemmhofbildung) [103].

Hemmstofftests sind sehr unselektiv; sie zeigen alle Stoffe an, die das Wachstum der Testorganismen oder deren Stoffwechsel beeinträchtigen. Das Ergebnis lässt jedoch keine Unterscheidungen zwischen Antibiotika und anderen Hemmstoffen wie beispielsweise Lysozym zu. Eine Unterscheidung verschiedener Antibiotikaklassen ist

ebenfalls nicht möglich, auch wenn eine bessere Nachweisempfindlichkeit für verschiedene Antibiotika-Klassen durch die Auswahl des Testkeims, des Mediums oder des pH-Wertes erreicht werden kann [104-106]. Nachteilig bei der Verwendung von Hemmstofftests ist ebenfalls, dass nur aktive Antibiotika das Wachstum der Testkeime hemmen und somit Abbauprodukte ohne biologische Aktivität nicht erfasst werden.

3.1.2 Immunochemische Verfahren

Bei den immunochemischen Verfahren werden tetracyclinspezifische Antikörper zum Nachweis und zur Quantifizierung von Tetracyclinen eingesetzt. Beim Vorhandensein von Tetracyclinen in der Probe bildet sich mit dem Antikörper ein Antigen/Antikörper-Komplex, der auf verschiedenen Wegen detektiert werden kann.

Als gängige und kommerziell erhältliche immunochemische Verfahren für den Nachweis von Tetracyclinen sind ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), und SPFIA (Solid-Phase Fluorescence Immunoassay) und RIA (radioimmunoassay) zu nennen. Beim Radioimmunoassay wird für die Detektion des Antikörper-Antigenkomplexes radioaktiv markiertes Tetracyclin als Kompetitor zum Proben-tetracyclin eingesetzt und nach einem Waschschrift die mittels Szintillationsflüssigkeit übermittelte Zählrate für die Radioaktivität ausgewertet. Diese ist umgekehrt proportional zum in der Probe vorhandenen Tetracyclingehalt [107].

Ein SPFIA-Test wird kommerziell unter dem Namen Parallax[®] vertrieben. Das Probenmaterial wird mit fluoreszenzmarkiertem Antikörper inkubiert. Bei diesem Schritt werden Tetracycline an den Antikörper gebunden. Anschließend wird die Lösung in eine Testkartusche gezogen, deren Wände mit Tetracyclin beschichtet sind. Antikörper, die kein Tetracyclin gebunden haben, binden in diesem Schritt an die Tetracycline in der Testkartusche. Nach einem Waschschrift wird die Fluoreszenz angeregt und detektiert [108].

ELISA ist seit vielen Jahren als eine schnelle, spezifische und empfindliche Technik bekannt, die für den Nachweis von Tetracyclinen herangezogen werden kann [109, 110]. Ein kommerzieller ELISA wird von der Firma Biopharm unter dem Namen ridascreen vertrieben [111]. In jüngster Vergangenheit wurden von Zhang et al. und

Pastor-Navarro et al. Arbeiten vorgestellt, in denen neue Haptene für Tetracycline hergestellt und diese für die Gewinnung von Antikörpern eingesetzt wurden. Beide beschreiben die Entwicklung eines ELISA auf der Grundlage dieser Antikörper [36, 37]. Ein ELISA mit kommerziell verfügbaren Antikörpern wurde von Jeon et al. beschrieben [112]. Dieser ELISA unterscheidet sich von den vorangehend beschriebenen dadurch, dass der Sekundärantikörper nicht mit einem Enzym, sondern mit Biotin markiert ist, an das enzymmarkiertes Avidin bindet. Der Test lieferte eine Nachweisgrenze für Tetracyclin in Milch, die bei 0,48 µg/l lag und somit deutlich geringer war als die von Zhang et al. bestimmte 10 µg/l [36] und auch als die des ridascreen-ELISA (1,5 µg/l) [111].

Bei der Quantifizierung von Antibiotika-Rückständen mittels immunochemischer Verfahren ist die Spezifität der Antikörper ein kritischer Faktor. Antikörper binden oftmals auch Substanzen, die mit dem Analyten strukturell verwandt sind (Kreuzreaktivität). Der von Pastor-Navarro et al. verwendete Antikörper für Tetracyclin beispielsweise zeigte Kreuzreaktivität von 91 % gegenüber Rolitetraacyclin, 30% gegenüber Oxytetraacyclin und 10 % gegenüber Chlortetraacyclin [37]. Die Kreuzreaktivität führt zu einer verringerten Spezifität des Tests. Die Kreuzreaktivität gegenüber Tetracyclinen kann sehr unterschiedlich sein, je nach verwendetem Antikörper werden einzelne Tetracycline aufgrund einer sehr geringen Kreuzreaktivität nicht erfasst. So zeigten beispielsweise die von Zhang et al. verwendeten Antikörper nur eine minimale Kreuzreaktivität (<2%) gegenüber Oxytetraacyclin [36].

3.1.3 Rezeptortests

Eine Möglichkeit des gruppenspezifischen Nachweises von Tetracyclinrückständen bietet sich durch den Einsatz gruppenspezifischer Rezeptoren. Beim Charm-Test II wird das bakterielle Ribosom - der natürliche Bindungspartner von Tetracyclin – als Rezeptor eingesetzt [113]. Die Konzentration des in der Probe enthaltenen Tetracyclins wird durch Konkurrenz mit radioaktiv markiertem Tetracyclin und Szintillation bestimmt [114, 115]. Der Charm-Test wird für die Untersuchung von Honig auf Tetracyclinrückstände häufig eingesetzt, hat aber gegenüber den immunochemischen

Verfahren den Nachteil eines hohen apparativen Aufwandes. Darüber hinaus wurde über einen relativ hohen Anteil falsch-positiver Werte berichtet [116].

Ein apparativ wesentlich weniger aufwendiges Verfahren für den Nachweis von Tetracyclinen bietet der Schnelltest Tetrasensor. Dieser nutzt als Rezeptor für Tetracyclin das Tet-Repressor-Operator-System (siehe Abschnitt 2.6, Seite 26). Die flüssige Probe wird mit dem tetracyclinspezifischen Rezeptorprotein TetR gemischt. In die Lösung wird ein Teststäbchen eingetaucht, durch Kapillarwirkung wird die Lösung am Teststäbchen nach oben gesaugt. Am Teststäbchen erfolgt eine Abtrennung von Matrixbestandteilen. Der Bindungspartner (*tetO*) für TetR ist in einer gewissen Höhe auf dem Teststäbchen fixiert, hier wird TetR gebunden, sofern in der Probelösung kein Tetracyclin vorhanden ist. Die Auswertung kann visuell erfolgen, da TetR mit rot gefärbtem, kolloidalem Gold markiert ist und bei Bindung an *tetO* eine rote Bande ergibt. Die Nachweisempfindlichkeit für Tetracyclin in Honig liegt bei 6 – 12 µg/kg [116, 117].

Ein Schnelltest für Tetracycline, Streptogamin und Makrolide nutzt für den Nachweis von Tetracyclin die Ablösung des Tet-Repressors von *tetO* durch Tetracyclin. Die Detektion der Ablösung erfolgt dadurch, dass der Repressor mit fünf Histidinresten markiert ist, an die – wenn keine Ablösung erfolgt – enzymmarkierte Histidin-Antikörper binden, die in einer nachgeschalteten Reaktion mit Tetramethylbenzidin eine Färbung verursachen [118]. Auf demselben Prinzip beruht ein von Weber et al. beschriebenes Verfahren, das im Unterschied zum Schnelltest in Mikrotiterplatten durchgeführt wird [119].

3.2 Physikalisch-chemische Verfahren

Höhere Spezifität für Tetracyclinrückstände besitzen physikalisch-chemische Verfahren, weil ihnen zumeist Trennverfahren vorausgehen. Verschiedenste Techniken sind hier verfügbar, beispielsweise Ionenchromatographie [120], Kapillarelektrophorese [121-123] und Fließinjektion mit Chemilumineszenzdetektion [124-127]. Mit Abstand am wichtigsten sind jedoch HPLC-Verfahren, die mit verschiedenen Methoden der Probenaufarbeitung und verschiedenen Detektionsverfahren wie beispielsweise UV-

Detektion [128, 129], Detektion mit UV-Diodenarraydetektor [130-133], Fluoreszenz-Detektion [134-138], Chemilumineszenz [127] oder Massenspektrometrie [139-149] kombiniert wurde.

Heute werden für einen eindeutigen Nachweis und zur Quantifizierung praktisch nur noch LC-MS/MS-Verfahren eingesetzt. Aufgrund der Vielzahl an publizierten Artikeln zum Nachweis von Tetracyclinen mittels HPLC oder LC-MS/MS soll hier nur anhand aktueller Beispiele ein Überblick gegeben werden.

3.2.1 Extraktion und Clean-up

Vor der Analyse von Lebensmitteln mittels LC-MS erfolgt in aller Regel eine Probenvorbereitung mit dem Ziel der Extraktion und/oder Anreicherung des Analyten aus der Lebensmittelmatrix. Tetracycline stellen aufgrund der stark komplexbildenden Eigenschaften sowie der Instabilität bei sauren oder basischen pH-Bedingungen eine besondere Herausforderung dar. Einen guten Überblick über diese Thematik geben die Review-Artikel von Anderson et al. [150], Oka et al. [151] und Kujawski et al. [152]. Im Folgenden ist das gängige Clean-up-Verfahren für Tetracycline in Honig aufgeführt, für die Aufreinigung anderer Lebensmittelmatrices sei auf die zitierte Literatur verwiesen.

Als Extraktionspuffer wird in den meisten Fällen EDTA-McIlvaine-Puffer eingesetzt, ein Citrat/Phosphatpuffer, der den Chelatbildner Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) enthält (pH =4). Durch Verwendung von EDTA sollen an Metallionen gebundene Tetracycline aus diesen Komplexen freigesetzt werden [135, 153-155]. Vereinzelt werden für die Extraktion aber auch Oxalatpuffer oder Acetatpuffer eingesetzt [140, 156] Den verwendeten Puffern ist ein niedriger pH-Wert (pH 4 – 5) gemeinsam, bei dem Tetracycline fast ausschließlich als nach außen ungeladenes Zwitterion vorliegen.

Für eine Multimethode, mit der mehrere Antibiotikaklassen in Honig nachgewiesen werden können, ist eine Extraktion der Antibiotika mit Wasser und anschließender Aufreinigung des Extraktes beschrieben [145].

Ein Clean-up der Tetracyclinrückstände von Honig wird üblicherweise mittels Festphasenextraktion (SPE) erreicht. Die unpolaren Regionen der Tetracycline erlauben die Aufreinigung an C₈- und C₁₈-Phasen. Diese haben jedoch den Nachteil, dass

aufgrund des Silanol-Gerüsts Tetracycline an nicht derivatisierte Silanolgruppen und Verunreinigungen durch Metallkationen binden und nicht eluiert werden. Die Verwendung von EDTA im Puffer oder die Konditionierung der Kartuschen mit EDTA ermöglicht hier eine Verbesserung der Ergebnisse [155]. Gute Ergebnisse werden auch mit Copolymer-Kartuschen erzielt, die kein Siliziumdioxidgerüst haben. Verbreitet sind beispielsweise Oasis HLB-Kartuschen [135, 140]. Schwache Anionentauscher-Kartuschen auf Polymerbasis wurden erfolgreich für das Clean-up von Tetracyclinen aus Honig eingesetzt [156].

Von Oka et al. und Pena et al. wurden zum Clean-up von Tetracyclin aus Honigen eine doppelte SPE vorgeschlagen, bei der das Eluat der ersten Festphasenextraktion (C_{18} oder Polymerphase) in einem zweiten Schritt über Kationenaustauscher-Kartuschen gereinigt und mit Oxalsäure pH 1,4 eluiert wird [135, 154]. Auch in der Methode nach § 64 LFGB wird ein zweistufiges Clean-up vorgeschlagen, im ersten Schritt erfolgt die Komplexierung der Tetracycline an einer mit Kupfer(II)Ionen beladenen Sepharosesäule; die Elution erfolgt mit EDTA. Im zweiten Schritt wird das Eluat an C_{18} -Kartuschen nachgereinigt [157].

3.2.2 Chromatographische Trennung

Tetracycline werden fast ausschließlich mittels HPLC an RP-Phasen (reversed-phase) getrennt. Ebenso wie bei der SPE führen freie Silanolgruppen und Spuren von Metallkationen an der HPLC-Phase zum Peak tailing, das durch den Zusatz von Komplexbildnern (Oxalsäure) zur mobilen Phase verhindert werden kann. Mobile Phasen mit einem Oxalsäurezusatz führten auch zu den besten Trennungen [151]. Allerdings kann Oxalsäure nicht vollständig verdampft werden und eignet sich daher nicht für die Detektion mittels MS. Beim Einsatz der massenspektrometrischen Detektion muss dies über die Qualität der Trennsäule ausgeglichen werden oder eine Phase eingesetzt werden, die kein Silanolgerüst enthält, so dass auf Oxalsäure verzichtet werden kann. Gängige Fließmittelgemische für die LC-MS zum Nachweis von Tetracyclin sind Mischungen aus Wasser, Ameisensäure und Acetonitril oder Mischungen aus Methanol, Acetonitril und wässriger Trifluoressigsäure [140, 146, 155, 156].

Verschiedene chromatographische Systeme, die zur Trennung von Tetracyclinen verwendet wurden, sind bei Oka et al. und Anderson et al. übersichtlich zusammengefasst [150, 151].

3.2.3 Massenspektrometrische Detektion

Die Detektion soll hier nur anhand der Möglichkeiten zur massenspektrometrischen Detektion von Tetracyclinen in Honig beschrieben werden, da diese in der jüngeren Vergangenheit immer stärker in den Vordergrund tritt.

Verschiedene Ionisierungsverfahren wurden für die Tetracyclinanalytik in Honigen eingesetzt, beispielsweise FAB (fast atom bombardment) [155], APCI (atmospheric pressure chemical ionisation) [158], ESI (electrospray ionisation) [140, 145-149, 156]. ESI hat sich bei den Ionisierungsverfahren zum Nachweis von Tetracyclin in Honig durchgesetzt.

Von Nakazava et al. [158] wurde Oxalsäure in der mobilen Phase für die chromatographische Trennung der Tetracycline eingesetzt. Da diese nicht flüchtig ist, müssen Maßnahmen ergriffen werden, die eine Kontamination der Ionenquelle verhindern. Nakazava et al. erreichten dies durch Zersetzung der Oxalsäure zu CO₂ und Wasser durch das Erhitzen des Nebulizers auf 475 °C.

3.3 Biosensor-Verfahren

Bei der Analytik von Lebensmitteln gewinnen neben den immunchemischen und physikalisch-chemischen Verfahren seit einigen Jahren Biosensorverfahren an Bedeutung [159].

Ein Biosensor setzt sich aus einem für den Analyten spezifischen Bindungspartner und einem Transducer (Messwandler) zusammen. Als Bindungspartner in Biosensoren können Antikörper, Enzyme, Nucleinsäuren, Bakterienzellen, aber auch höhere Organismen (Algen, Nematoden) eingesetzt werden [160, 161]. Der Bindungspartner für den Analyten wird am Transducer immobilisiert. Wird Analyt an den Bindungspartner gebunden, so wird die Bindung – das biologische Signal – je nach Transducer in ein messbares elektrisches, optisches, akustisches oder thermisches Signal umgewandelt [161]. Die Messanordnung erlaubt die Beobachtung von Rezeptor-

Ligand-Wechselwirkungen, ohne dass dafür einer der Bindungspartner markiert werden muss. Biosensoren sind in der Rückstandsanalytik aufgrund der hohen Spezifität und Empfindlichkeit von Bedeutung, die die Detektion eines breiten Spektrums an Analyten in komplexen Matrices ohne aufwendige Probenaufarbeitung erlaubt.

Als automatisierte Verfahren bieten sie den Vorteil, dass große Probenzahlen bewältigt werden können und nach relativ kurzer Zeit ein Ergebnis vorliegt. Zudem können viele Matrices ohne aufwendige Probenaufarbeitung untersucht werden, so dass auch der Einsatz von Biosensoren in der Prozesskontrolle bei der Herstellung von Lebensmitteln möglich ist [162].

3.3.1 Einsatz von Biosensoren zum Nachweis von Tetracyclinen

Verschiedene Biosensoren nutzen für den Nachweis von Tetracyclinen das *tetO* – TetR-System (Kapitel 2.6, Seite 26ff). Kurittu et al. stellten auf einem synthetischen Plasmid Luciferase-Gene, die für die Ausbildung einer Biolumineszenz notwendig sind, unter die Kontrolle des Tetracyclin-Repressor-Operator-Systems. Das Plasmid wurde in *E.coli* transformiert, der als Testkeim Milchproben zugegeben wurde. In Gegenwart von Tetracyclin wird der Repressor vom Operator gelöst, so dass die Luciferase-Gene abgelesen werden können. Dies führt zur Biolumineszenz der Probe [163]. Von Pellinen et al. wurde das System der Expressionskontrolle von Luciferase-Genen durch den Tetracyclin-Repressor-Operator-Komplex in einem zellfreien Extrakt eingesetzt, wodurch die Inkubationszeit deutlich verringert und die Nachweisempfindlichkeit gegenüber den Tests mit Bakterienzellen verbessert werden konnte [164]. Von Hansen und Sørensen wurde über einen Biosensor berichtet, der in gleicher Weise das Repressor-Operator-System für die Regulation der Expression von β -Galactosidase verwendet [165].

Nachteilig bei den oben genannten Tests ist, dass die Proteinbiosynthese des Bakteriums bei hohen Tetracyclin-Konzentrationen gehemmt wird und somit auch die Expression des Reportergens. Proben mit hohem Tetracyclinegehalt können daher ein negatives Ergebnis liefern. Eine Lösung dieses Problems liefern Bahl et al., die ein Plasmid verwenden, das neben dem Repressorsystem und dem Reportergen auch ein Gen für ein ribosomales Schutzprotein enthält, das ebenfalls bei Anwesenheit von

Tetracyclin exprimiert wird und die Hemmung der Proteinbiosynthese am Ribosom verhindert, so dass die Expression des Reportergens unbeeinträchtigt stattfindet [166].

3.3.2 Oberflächenplasmonresonanz in der Rückstandsanalytik von Antibiotika

Auf der Grundlage der Oberflächenplasmonresonanz (surface plasmon resonance, SPR) (Kapitel 4.1) wurden optische Biosensor-Verfahren entwickelt. Zu den Analyten, deren Nachweis mittels Oberflächenplasmonresonanz beschrieben wurde, gehören neben Vitaminen [167-169], Hormonen [170], Mykotoxinen [171, 172], Bakterienzellen [173, 174] und Proteinen [175] auch Tierarzneimittelrückstände. Eine übersichtliche Zusammenstellung der Anwendungen von Biosensoren in der Lebensmittelanalytik findet sich bei Ricci et al. [176].

Im Bereich der Tierarzneimittelrückstände sind SPR-Verfahren für den Nachweis von Tylosin [177], Sulfonamiden [178], β -Lactam-Antibiotika, [179, 180], Aminoglycosiden [181], Chloramphenicol [182], Nicarbazin [183], Ivermectin [184], und Streptomycin [185] beschrieben. Eine Übersicht über kommerziell erhältliche Testkits für Tierarzneimittelrückstände geben Haughey und Baxter [186].

In einer Patentschrift von Granier, in der der Tetrasensor-Schnelltest patentiert ist, wird ein SPR-Verfahren zum Nachweis von Tetracyclin beschrieben [187], das den TetR – *tetO*-Komplex nutzt. Die Probe wird dabei mit einer Mischung aus Repressor und biotinylierter Operator-DNA inkubiert. Bei Anwesenheit von Tetracyclin wird in diesem Schritt der Repressor vom Operator gelöst, wohingegen bei Abwesenheit von Tetracyclin der Repressor-Operator-Komplex bestehen bleibt. Gemäß der im Patent formulierten Erwartungen bindet nur die nicht im Komplex mit dem Repressor vorliegende DNA an das Streptavidin. Es wird jedoch nicht beschrieben, warum die mit dem Repressor im Komplex vorliegende DNA nicht in der Lage sein soll, an die Chipoberfläche zu binden. Aus dem Patent wird darüber hinaus nicht ersichtlich, wie die Chipoberfläche regeneriert werden soll, da hierzu eine Trennung des äußerst stabilen Streptavidin-Biotin-Komplexes (Affinitätskonstante $K_A = 10^{15}$ L/mol) stattfinden müsste [188].

Möller et al. beschreiben ein Verfahren für den Nachweis von Tetracyclinen in Milch und Honig auf der Grundlage der SPR [1], dessen Potential für eine kommerzielle Nutzung in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde (zum Ablauf des Assays siehe Abschnitt 6.2, Seite 116).

4 GRUNDLAGEN DER SPR-MESSUNGEN

4.1 Grundlagen der Oberflächenplasmonresonanz

Um das Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz zu beschreiben, ist es hilfreich, zunächst bei der Totalreflexion von Licht anzusetzen: Trifft ein Lichtstrahl in einem Einfallswinkel, der größer ist als der Grenzwinkel der Totalreflexion, auf eine Grenzfläche zwischen einem optisch dichteren und einem optisch dünneren Medium, so wird der Lichtstrahl an der Grenzfläche in das Medium mit der höheren optischen Dichte (Brechungsindex) zurück reflektiert. Dabei werden vom Lichtstrahl elektromagnetische Wellen in das Medium mit der geringeren optischen Dichte abgegeben. Da die Intensität der elektromagnetischen Welle in senkrechter Richtung zur Grenzfläche exponentiell abnimmt, spricht man hier von einer evaneszenten Welle oder einem evaneszenten Feld [189].

Wird die Grenzfläche mit einer dünnen Metallschicht (<100 nm) beschichtet, kann die p-polarisierte¹ Komponente des evaneszenten Feldes in den Metallfilm eindringen und hier elektromagnetische Oberflächenplasmonwellen² anregen. Diese setzen sich innerhalb der Metallschicht fort, die an das optisch dünne Medium grenzt. Die Oberflächenplasmonen sind- sofern Gold oder andere nichtmagnetische Metalle verwendet werden - auch p-polarisiert und liefern aufgrund der elektromagnetischen Eigenschaften und der Eigenschaft, sich weiter fortzupflanzen, eine Verstärkung der evaneszenten Welle. Oberflächenplasmonresonanz wird auch als „Ladungsdichteschwingung“ bezeichnet.

Damit ein Plasmon durch ein Photon angeregt werden kann, müssen bei der „Transformation“ des Photons zum Plasmon die Energie und das Moment beider erhalten bleiben. Diese Voraussetzung ist erfüllt, wenn die Wellenvektoren von

¹ Als p-polarisiert werden Wellen bezeichnet, deren Polarisationssebene parallel zur Einfallsebene (Oberfläche) ist.

² Mit dem Begriff Plasmon wird ein Quant von elektromagnetischen Wellen des Elektronengases in einer Metallschicht beschrieben. Breiten sich diese Wellen parallel zu einer Oberfläche aus, so spricht man von Oberflächen-Plasmon-Wellen (SP-Wellen).

Plasmon und Photon in Größe, Richtung und Frequenz gleich sind. Dadurch wird eine resonante Absorption durch das evaneszente Feld erlaubt sowie die Anregung eines Plasmons, die eine charakteristische, scharf umgrenzte Abschwächung der Intensität des reflektierten Lichtes bewirkt. Für einen spezifischen Einfallswinkel (SPR-Winkel) und eine definierte Wellenlänge wird die Oberflächenplasmonresonanz als Abnahme der Intensität des reflektierten Lichtes beim SPR-Winkel sichtbar.

Die Anordnung der optischen Einheit eines Biacore Q SPR-Gerätes ist in Abbildung 4-1 schematisch dargestellt.

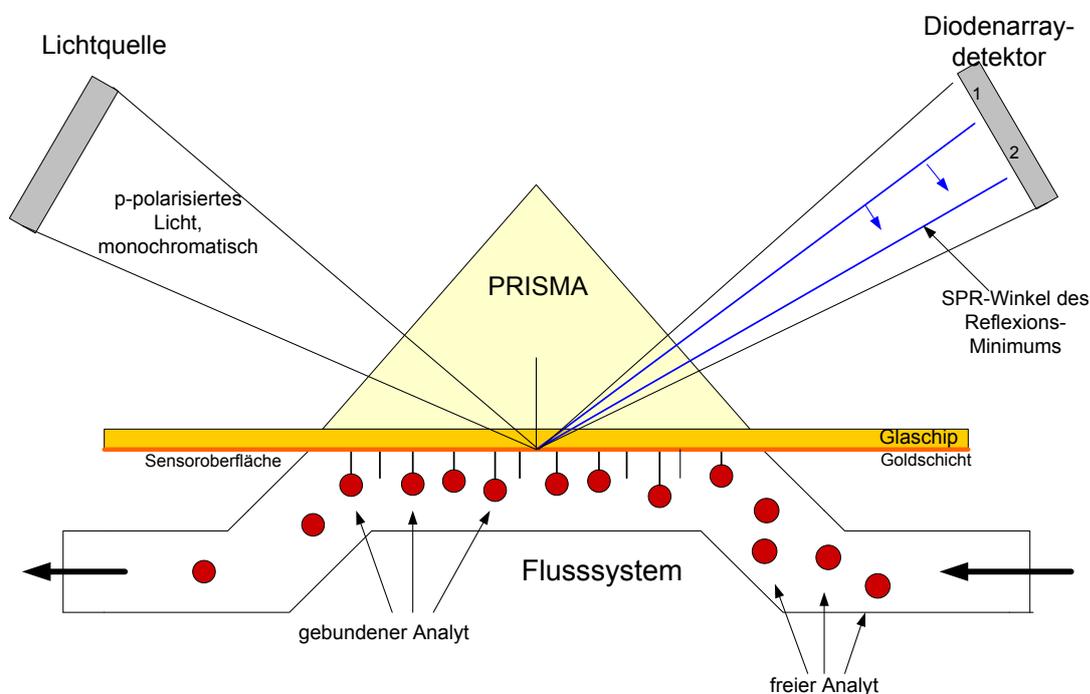


Abbildung 4-1: Anordnung des Messsystems im Biacore Q-Instrument: monochromatisches, p-polarisiertes Licht wird durch ein Prisma auf den Goldfilm des Sensorchips fokussiert. Die Anregung von Oberflächenplasmonen ist in der Abbildung nicht dargestellt, blaue Linien zeigen im reflektierten Licht das Intensitätsminimum durch die Anregung der Plasmonen. Auf der Sensoroberfläche sind die Bindungspartner für den Analyten gebunden. Die Sensoroberfläche grenzt an ein Flusssystem, durch das Puffer, Analyt und Regenerationsreagenzien geschleust werden. Bindet der Analyt an den Bindungspartner, so ändert sich der Brechungsindex an der Sensoroberfläche und damit einhergehend auch der Einfallswinkel, unter dem Oberflächenplasmonen angeregt werden können.

Der Winkel des Intensitäts-Minimums (Θ_{SPR}) hängt von den optischen Eigenschaften des Prismas, Art und Dicke der Metallschicht, Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes und dem Brechungsindex des Mediums über der Goldschicht (innerhalb des

evaneszenten Feldes ab) [190, 191]. Eine Änderung der dielektrischen Eigenschaften in der Umgebung der Metalloberfläche führt zu einer Änderung der Resonanzbedingungen und somit zu einer Verschiebung des SPR-Winkels. Eine solche Änderung wird - sofern alle anderen Parameter (Dicke der Metallschicht, Wellenlänge des Lichtes, Eigenschaften des Prismas) - konstant gehalten werden, durch die Änderung des Brechungsindex in der Umgebung der Metalloberfläche hervorgerufen. Brechungsindexänderungen lassen sich somit anhand der Änderung des SPR-Winkels detektieren. Eine Massenänderung an der Oberfläche ist mit der Änderung des Brechungsindex korreliert. Ändert sich die Masse an der Chipoberfläche, beispielsweise durch Adsorption eines Proteins an der Oberfläche, so vergrößert sich deren Brechungsindex, was zu einer Verschiebung des SPR-Winkels zu größeren Werten führt. Die Verschiebung des SPR-Minimums aufgrund der kovalenten Bindung von Doxycyclinderivaten an der Chipoberfläche ist in Abbildung 4-2 dargestellt.

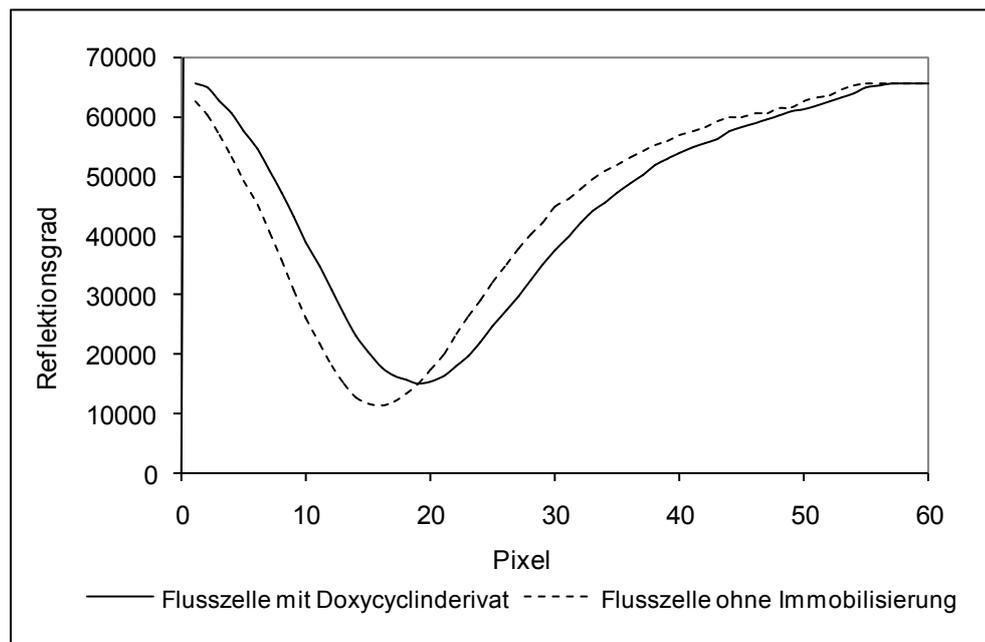


Abbildung 4-2: Verschiebung des SPR-Winkels durch Änderung des Brechungsindex an der Sensoroberfläche, gestrichelte Linie: ursprüngliches Minimum; durchgehende Linie: Minimum nach Brechungsindexänderung durch Immobilisierung eines Doxycyclinderivates

Über die Änderung des Brechungsindex an der Oberfläche wird die Massenänderung an der Oberfläche detektiert. Brechungsindexänderungen können nur innerhalb des evaneszenten Feldes beobachtet werden, dieses ist bis etwa 400 nm (in Abhängigkeit von der Wellenlänge des eingestrahlteten Lichtes) unterhalb der Goldoberfläche noch

vorhanden [192]. Wechselwirkungen, die außerhalb des evaneszenten Feldes stattfinden, werden nicht detektiert.

Die Änderung des SPR-Winkels wird während einer SPR-Analyse kontinuierlich aufgezeichnet, so dass eine Analytik in Echtzeit möglich ist. Der SPR-Winkel wird gegen die Zeit aufgetragen und als „Sensorgramm“ von der Software des Gerätes ausgegeben. Der Winkel wird dabei nicht in Grad angegeben, sondern in sogenannte „Resonance units“ (RU) umgerechnet. 1 RU entspricht einer Winkeländerung von $0,0001^\circ$. Für die meisten Proteine entspricht dies einer Massenänderung von 1 pg/mm^2 an einer 100 nm Carboxymethyl-dextranoberfläche [190, 193].

4.2 Aufbau des SPR-Spektrometers Biacore Q

Das Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz lässt sich für die Analyse von biomolekularen Wechselwirkungen nutzen. In der vorgestellten Arbeit wurde ein Biacore-Q-Gerät verwendet, in dem mit einem Durchflusssystem gearbeitet wird. Dieses System soll zum besseren Verständnis von Versuchsanordnungen und Ergebnissen näher erklärt werden. Schematisch ist der Aufbau des Biacore Q-Gerätes in Abbildung 4-3 wiedergegeben.

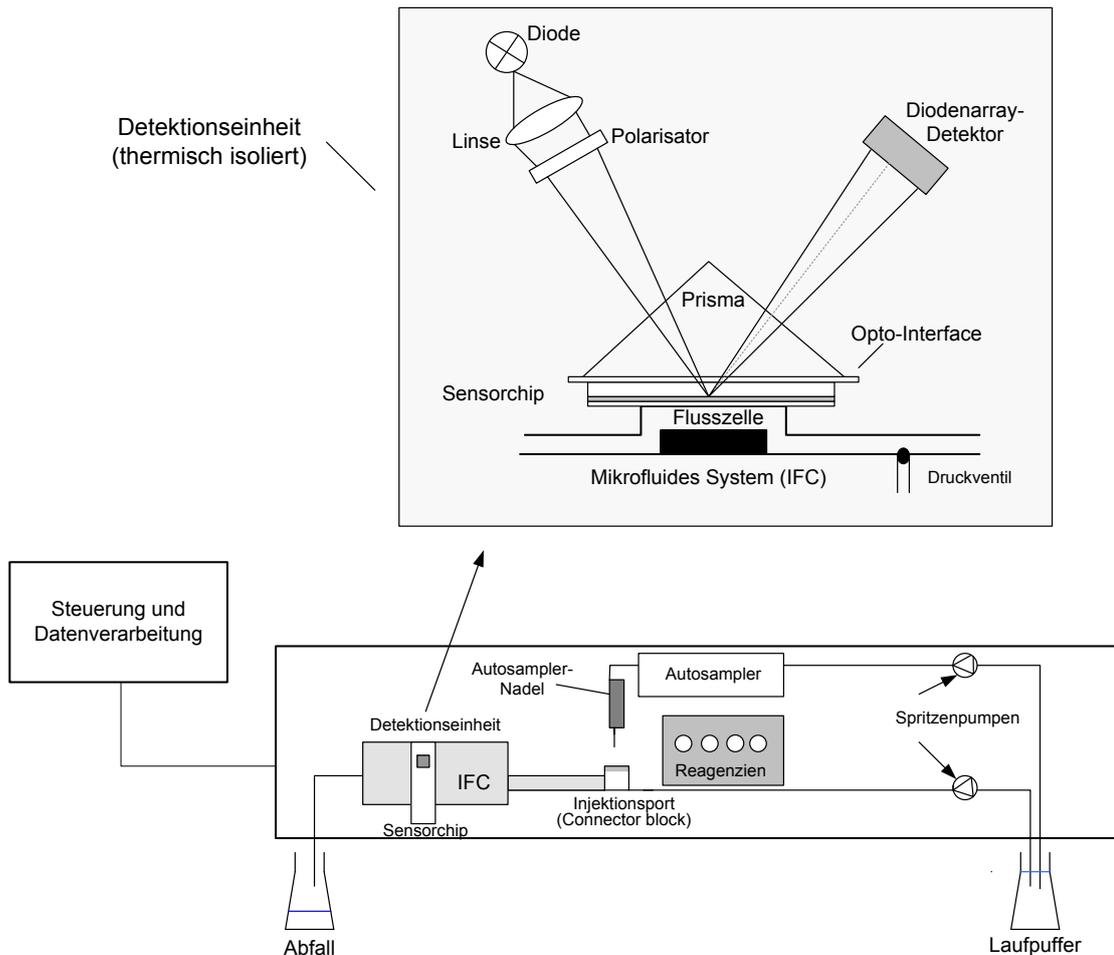


Abbildung 4-3: Schematischer Aufbau des Biacore Q-Gerätes (modifiziert nach [190, 194])

Das Kernstück des Gerätes ist die Detektionseinheit mit dem mikrofluiden System. Der Sensorchip (siehe folgender Abschnitt), auf dem die Analyse stattfindet, wird mit der Glasseite gegen eine dünne Silikonfolie gepresst (Opto-Interface), die wiederum gegen ein Prisma gedrückt wird. Das Silikonpolymer, dessen Brechungsindex auf den des Glasprismas abgestimmt ist, gewährleistet einen genauen optischen Kontakt zwischen dem austauschbaren Sensorchip und den unveränderlichen Bestandteilen des optischen Systems [190]. Eine LED (Light emitting diode) wird als Lichtquelle verwendet, der Lichtstrahl wird in einer Keilform durch das Prisma auf die „Rückseite“ des Goldchips fokussiert. Reflektiertes Licht wird durch einen Diodenarray-Detektor registriert. Die Dioden sind so platziert, dass die Auflösung zwischen den Dioden einer Winkeländerung von $0,1^\circ$ entspricht. Das DAD-Signal wird durch die angeschlossene Datenverarbeitung interpoliert, wodurch die Position des SPR-Winkels mit einer Genauigkeit von 10^{-4}° bestimmt werden kann [190].

Das mikrofluide System, (Integrated μ -Fluidic Cartridge, IFC) ist aus Silikon gefertigt und enthält Kanäle und Ventile, die den Transport von Flüssigkeiten zu der Flusszelle hin und von ihr weg ermöglichen. Der Fluss wird durch pneumatische Ventile reguliert. An der Oberfläche der IFC ist ein Flusszellen-Block mit 4 Kanälen angebracht. Durch das Anpressen eines Sensorchips an diesen Flusszellen-Block („docking“) werden 4 parallel angeordnete Flusszellen mit einem Volumen von 60 nl geformt. Im Biacore Q-Gerät können die Flusszellen nur einzeln angesteuert werden, eine zeitgleiche Messung auf mehreren Flusszellen ist nicht möglich.

Zwei pulsationsfreie Spritzenpumpen versorgen das System mit Laufpuffer oder anderen Reagenzien. Eine Pumpe hält eine kontinuierliche Versorgung der Flusszellen mit Laufpuffer aufrecht, während die andere Pumpe dafür verwendet wird, Proben im Autosampler gegebenenfalls zu mischen und in die IFC zu injizieren. Von der Software werden die Pumpen automatisch nach Bedarf angesteuert.

Der Autosampler mischt - sofern dies erforderlich ist - Proben und Reagenzien und injiziert diese über den Connector-Block in die IFC. Der Connector-Block beinhaltet zwei Eingänge, einen für die Pumpe, die die IFC mit Laufpuffer versorgt und einen weiteren für die Autosamplernadel, um Proben und Reagenzien aufzugeben. Darüber hinaus ist auf dem Connector Block eine Station angebracht, in der die Autosamplernadel nach jeder Injektion von innen und außen mit Puffer gespült wird, um Substanzverschleppung vorzubeugen. Durch den automatischen Probengeber in Kombination mit der Software zur Steuerung ist nach der Bestückung des Autosamplers eine vollautomatische Analyse möglich. Eine Vielzahl von Parametern kann bei der Programmierung des Systems variiert werden, während andere in der Systemroutine verankert sind und nicht beeinflusst werden können. Variabel sind der Fluss des Laufpuffers, die Flussrate während der Injektion, das Injektionsvolumen bzw. die Kontaktzeit des injizierten Analyten und das Mischungsverhältnis bei der Mischung von Reagenzien. Die Flussrate kann nicht in Abhängigkeit von der Kontaktzeit und des Injektionsvolumens variiert werden, einer der Parameter Fließgeschwindigkeit oder Injektionsvolumen muss konstant gehalten werden.

Zu den nicht beeinflussbaren Systemroutinen gehört ein Waschschrift nach Beendigung eines Messzyklus, bei dem alle Flusszellen (auch die, die im Messzyklus nicht angesteuert wurden) nacheinander mit einem hohen Fluss ($>200 \mu\text{l}/\text{min}$) von Laufpuffer durchspült werden. Nach beendeter Analyse schaltet das System automatisch in einen Standby-Modus, bei dem der Fluss des Laufpuffers durch die Flusszellen (Flussrate $5 \mu\text{l}/\text{min}$) aufrecht erhalten wird um ein Austrocknen der Sensorchipoberfläche zu vermeiden.

4.3 Sensorchipoberflächen

Das Kernstück der SPR-Analytik ist der Sensorchip. Der Aufbau eines Sensorchips umfasst die folgenden vier Elemente:

- einen mechanischen Träger (z.B. Glas), der mit einer dünnen Metallschicht (meistens Gold) beschichtet ist, die die Anregung von Oberflächenplasmonen erlaubt
- eine Haftvermittlerschicht, die die Immobilisierungsmatrix an die Goldoberfläche bindet und direkten Kontakt der Reaktionspartner mit der Goldschicht verhindert
- die Immobilisierungsmatrix, an der die Liganden fixiert werden. Sie steht in direktem Kontakt mit Ligand und Probe und beeinflusst die Charakteristik des Biosensors maßgeblich
- immobilisierter Ligand, der an die Immobilisierungsmatrix gebunden ist und selektiv mit dem Analyten wechselwirkt

Exemplarisch ist der Aufbau eines Sensorchips ohne Ligand in Abbildung 4-4 dargestellt.

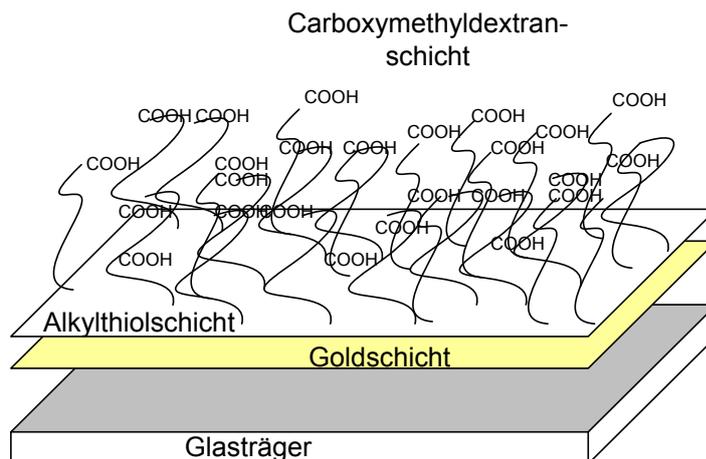


Abbildung 4-4: Schematische Darstellung eines Sensorchips, auf dem Carboxymethyldextran immobilisiert wurde.

Besondere Bedeutung kommt der Haftvermittlerschicht und der Immobilisierungsmatrix zu. Im Idealfall gewährleistet die Haftvermittlerschicht eine stabile Verbindung zwischen der Metallschicht und der Immobilisierungsmatrix und schirmt als dünner Film die Metalloberfläche gegen Probe- und Pufferlösungen ab, um unspezifische Wechselwirkungen der Biomoleküle – beispielsweise Adsorption von Proteinen - mit der Metallschicht zu verhindern. Die Schichtdicken der Haftvermittlerschicht liegen zwischen 2 und 5 nm. Unter 1 nm werden meist nur instabile Beschichtungen erhalten, oberhalb von 10 nm können Quelleffekte auftreten, zudem würde die Empfindlichkeit des Sensors abnehmen, da die Stärke des evaneszenten Feldes exponentiell mit den Entfernung zur Goldschicht abnimmt [195].

Als Haftvermittler auf Goldschichten werden häufig Alkylthiole verwendet, da die Goldschicht ein schwacher Elektronenpaarakzeptor ist, an den Thiole als schwache Elektronenpaardonatoren gebunden werden können. Es können auch Disulfide oder Thioether verwendet werden, die ebenfalls schwache Elektronendonoren sind. Die Haftvermittler sind auf eine stabile Bindung an die Metallschicht optimiert. Um unspezifische Bindung von Biomolekülen an die Haftvermittlerschicht zu verhindern, wird eine weitere Schicht - die Immobilisierungsmatrix - eingesetzt.

Die meisten unspezifischen Wechselwirkungen sind auf elektrostatische Wechselwirkungen, hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen. Um die hydrophoben Wechselwirkungen mit der

Immobilisierungsmatrix minimal zu halten, werden hydrophile Matrices eingesetzt, die optimalerweise einen hohen Grad an Hydratisierung aufweisen. Beispiele für als Immobilisierungsmatrix geeignete Polymere sind modifizierte Polysaccharide (Carboxymethyldextran), Polycarboxylate (beispielsweise Polyacrylsäure) und Polyether (z.B. Polyethylenglycol).

Man unterscheidet anhand der Sensorchipgeometrie zwei Typen von Immobilisierungsmatrices: planare (2D-Schichten) und dreidimensionale (3D) Hydrogele. Planare Oberflächen haben gegenüber Hydrogelen eine verminderte Oberflächenkapazität für die Immobilisierung des Liganden, es kann nur eine einfache Schicht Ligand gebunden werden. Die Dichte der immobilisierten Liganden ist daher relativ gering. Gegenüber Hydrogelen bieten die planaren Oberflächen den Vorteil, dass durch die planare Anordnung von Liganden keine Diffusionsprozesse an der Sensormatrix erfolgen und keine Begrenzungen durch Massentransfer zu erwarten sind [196]. Die Dissoziation des Analyten im Hydrogel ist durch mehrere Bindungsstellen auf mehreren Ebenen gegenüber den planaren Oberflächen erschwert. Dreidimensionale Hydrogele bieten eine größere Oberflächenkapazität für die Immobilisierung aufgrund der Möglichkeit der mehrschichtigen Immobilisierung. Bei Hydrogelen wird ein größeres „Volumen“ des evaneszenten Feldes ausgenutzt als bei planaren Oberflächen, was zu einer Art Signalverstärkung führt. Das für Hydrogele am häufigsten eingesetzte Material ist Carboxymethyldextran. Aufgrund des natürlichen Ursprunges liegt es oft in einer irregulären Struktur vor, was zu heterogenen Bindestellen führen kann. Nachteilig bei der Verwendung von Carboxymethyldextran kann dessen Verzweigung sein (Behinderung der Diffusion des Analyten) und die Eigenschaft, insbesondere im hydrierten Zustand ein relativ großes Volumen einzunehmen, das das nutzbare „Volumen“ des evaneszenten Feldes verringert. Daher werden als Matrix auch synthetische Polycarboxylate eingesetzt, die unverzweigt und aufgrund ihrer Struktur weniger voluminös sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Tetracyclinanalytik mittels *tetO* und TetR (Abschnitt 6.2, Seite 116) sogenannte SA-Chips verwendet. Dabei handelt es sich um Sensorchips mit einer Carboxymethyldextranoberfläche, an die Streptavidin kovalent

gebunden ist. Sie erlauben aufgrund der hohen Affinität von Biotin zu Streptavidin ($K_D=10^{-15}$ M) eine Immobilisierung von biotinmarkierten Bindungspartnern.

Für das indirekt kompetitive Assay-Format zur Tetracyclinanalytik mit Doxycyclin-Derivaten wurden vier verschiedene Sensorchips getestet, die sich in ihrer chemischen Beschaffenheit und Schichtdicke unterschieden. Um Wiederholungen zu vermeiden, wird an dieser Stelle auf Kapitel 6.1.3.1, Seite 69 verwiesen.

4.4 Assayformate

Der Aufbau eines SPR-Assays kann als direktes Assayformat und als indirektes Assayformat (kompetitiv oder nicht-kompetitiv) erfolgen. Beim direkten Assay wird der Bindungspartner für den Analyten (beispielsweise ein Antikörper) auf der Sensorchipoberfläche immobilisiert. Die Probe wird über die Sensorchipoberfläche gegeben. Ist Analyt in der Probe vorhanden, bindet dieser an den Bindungspartner (Rezeptor); die daraus resultierende Massenänderung wird als Erhöhung des Signals detektiert. Bei negativen Proben erfolgt keine Bindung und damit auch keine Signalerhöhung. Limitierend für das direkte Format ist in vielen Fällen das Molekulargewicht des Analyten, bei kleinen Analyten ist oft die Nachweisempfindlichkeit des Systems unzureichend (siehe auch Kapitel 4.1, Seite 45ff).

Die meisten Tierarzneimittel werden daher über ein indirektes Format nachgewiesen, bei dem der Analyt oder ein Analytderivat an der Sensoroberfläche immobilisiert ist. Die Probe wird, bevor sie über die Sensoroberfläche gegeben wird, mit dem Bindungspartner (Rezeptor) für den Analyten inkubiert, wobei im Falle positiver Proben eine Bindung von Analyt an den Rezeptor erfolgt. Die Absättigung von Rezeptor mit Analyt ist dabei abhängig von der Analytkonzentration in der Probe. Nur Rezeptoren, die während des Inkubationsschrittes kein Analyt gebunden haben, können an die immobilisierten Analyten an der Sensoroberfläche binden. Die Bindung des Rezeptors ist bei einer rückstandsfreien Probe maximal und nimmt mit zunehmender Rückstandskonzentration ab, die Signalerhöhung ist umgekehrt proportional zur Analytkonzentration in der Probe. Als Rezeptoren werden meist Antikörper oder andere

Bindeproteine eingesetzt, die – verglichen mit dem Analyten - ein hohes Molekulargewicht haben, so dass hier ein empfindlicher Nachweis erfolgen kann.

Bei beiden in dieser Arbeit verwendeten Assayformaten zur Analytik von Tetracyclinrückständen handelte es sich um indirekte Verfahren. Zur besseren Übersicht werden daher die Verfahren nicht in „indirekt kompetitiv“ und „indirekt nicht-kompetitiv“ unterschieden, sondern lediglich mit „kompetitiv“ und „nicht-kompetitiv“ benannt. Der Aufbau der in dieser Arbeit verwendeten Formate ist in den Kapiteln 6.1 und 6.2 beschrieben.

5 ZIELSETZUNG

In einer vorausgegangenen Arbeit wurde von Möller ein komplexes nicht-kompetitives Screening-Verfahren für den Nachweis von Tetracyclinen entwickelt.

In dieser Arbeit war es ein Ziel, zu prüfen, ob sich ein gleichermaßen leistungsfähiges kompetitives Assayformat zum Nachweis von Tetracyclinen mittels Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie entwickeln lässt. Als spezifischer Bindungspartner für Tetracycline sollte ein aus der Resistenzforschung bekanntes Protein, der Tet-Repressor (TetR) genutzt werden. Dieses war bereits von Möller für den nicht-kompetitiven Screening-Test eingesetzt worden und war durch eine Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Hillen, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg verfügbar. Doxycyclinderivate, die im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Gmeiner, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg zur Verfügung standen, sollten als Kompetitor zu Tetracyclinen in der Probe dienen. Um die Bindung des Rezeptors TetR an die Doxycyclinderivate zu detektieren, sollten die Derivate auf Sensorchips immobilisiert werden, so dass eine Detektion mittels Oberflächenplasmonresonanz möglich wird.

Das kompetitive Assayformat mit Doxycyclinderivaten sollte charakterisiert werden, indem der Einfluss verschiedener Parameter auf die Immobilisierung der Derivate und die anschließende Bindung von TetR an die immobilisierten Derivate untersucht wurde. Die Eignung verschiedener Sensorchipoberflächen für die Verwendung im Assay sollte insbesondere im Hinblick auf den Immobilisierungslevel und unspezifische Wechselwirkungen mit der Chipoberfläche geprüft werden. Hinsichtlich der TetR-Bindung sollten die Spezifität und Stabilität für die verschiedenen Sensorchips sowie die Konkurrenz zwischen Doxycyclinderivaten und Tetracyclinen untersucht werden. Darüber hinaus sollten geeignete Regenerationsbedingungen für die Oberflächen ermittelt werden.

Die Fähigkeit der Doxycyclinderivate, an TetR zu binden, sollte in einem Screeningtest für Tetracycline nach Möller [1] bestimmt und der von underivatisiertem Doxycyclin gegenübergestellt werden. Dies sollte dazu dienen, festzustellen, ob sich die Bindungseigenschaften der Derivate in Lösung von denen immobilisierter Derivate unterscheiden. Die Immobilisierung der Derivate auf verschiedenen Chipoberflächen sollte einen möglichen Einfluss der verschiedenen Spacerlängen der Derivate auf das Bindungsverhalten von TetR zeigen. Ein weiteres Ziel war es, durch die Variation verschiedener Parameter die Robustheit, Anwendbarkeit und Empfindlichkeit des Assays zu steigern und zu prüfen, ob dieser für den Nachweis von Tetracyclinen in Honig eingesetzt werden kann. Der Assay sollte mit dem von Möller entwickelten verglichen werden, und das besser geeignete Verfahren für die Analytik von Tetracyclinrückständen in Honig optimiert und validiert werden.

Parallel zur Entwicklung des kompetitiven Assays sollten Robustheit, Stabilität und Anwendbarkeit dieses von Möller beschriebenen nicht-kompetitiven Screening-Tests für Tetracycline untersucht werden. Ein Schwerpunkt sollte auf der Untersuchung der Lagerstabilität der verwendeten Reagenzien und Sensorchips unter verschiedenen Bedingungen (Temperatur, Lagerdauer) liegen. Die Robustheit des Assays sollte ermittelt werden, indem verschiedene Reagenzienchargen von TetR, *tetO* und Sensorchips untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen wurden. Messungen von Honigproben in einem zweiten Labor sollten die Anwendbarkeit des für Honig optimierten Screeningtests belegen.

Ein weiteres Ziel war die Erhöhung der Empfindlichkeit des Screening-Tests für Honig. In der EU sind Tetracycline nicht für die Behandlung von Honigbienen zugelassen [56]. Verschiedene Mitgliedstaaten der EU haben allerdings Aktionswerte festgelegt, die zwischen 15 µg/kg (Nichtkonformitätsgrenze, Frankreich) und 50 µg/kg (Berichtsgrenze in Großbritannien) liegen [116]. Die Entscheidungsgrenze des von Möller entwickelten Screening-Tests für Tetracyclin in Honig lag bei 14 µg/kg, wobei die Epimere aufgrund der schlechten Kreuzreaktivität nicht erfasst wurden [188]. Zur Verbesserung der Empfindlichkeit sollten die Messparameter für den Test optimiert werden, beispielsweise durch Variation der Injektionsdauer und Fließgeschwindigkeit

während der Injektion. Daneben sollten verschiedene Verfahren zur Probenaufarbeitung auf ihre Eignung zur Abreicherung von störenden Matrixbestandteilen sowie zur selektiven Anreicherung von Tetracyclinen aus Honigproben getestet werden.

6 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

6.1 Kompetitives Assayformat mit Doxycyclinderivaten³

6.1.1 Aufbau des kompetitiven Assayformates und Konzeption der Versuche

Bei dem kompetitiven Assayformat werden Doxycyclinderivate an die Oberfläche eines Sensorchips gebunden. TetR wird als tetracyclinspezifischer Rezeptor mit der Probe gemischt, gegebenenfalls für eine bestimmte Zeitspanne inkubiert und anschließend über den Sensorchip gegeben. In der Probelösung vorhandene Tetracycline besetzen die Bindungsstellen am Rezeptor. Rezeptor, der bereits Tetracyclin gebunden hat, steht damit nicht mehr für eine Bindung an die auf der Chipoberfläche immobilisierten Doxycyclinderivate zur Verfügung. Die TetR-Bindung an der Oberfläche korreliert daher negativ mit der Tetracyclinkonzentration in der Probenlösung. Je mehr Tetracyclin in der Probe vorliegt, desto mehr Bindestellen am Rezeptor werden von „Proben-tetracyclin“ besetzt und desto weniger Rezeptorprotein bindet an die Oberfläche (Abbildung 6-1).

³ Auszüge aus Kapitel 6.1 wurden bereits in [38] Usai, I., *Synthesis of Novel Bioactive Doxycycline Derivatives*. Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, 2008, veröffentlicht.

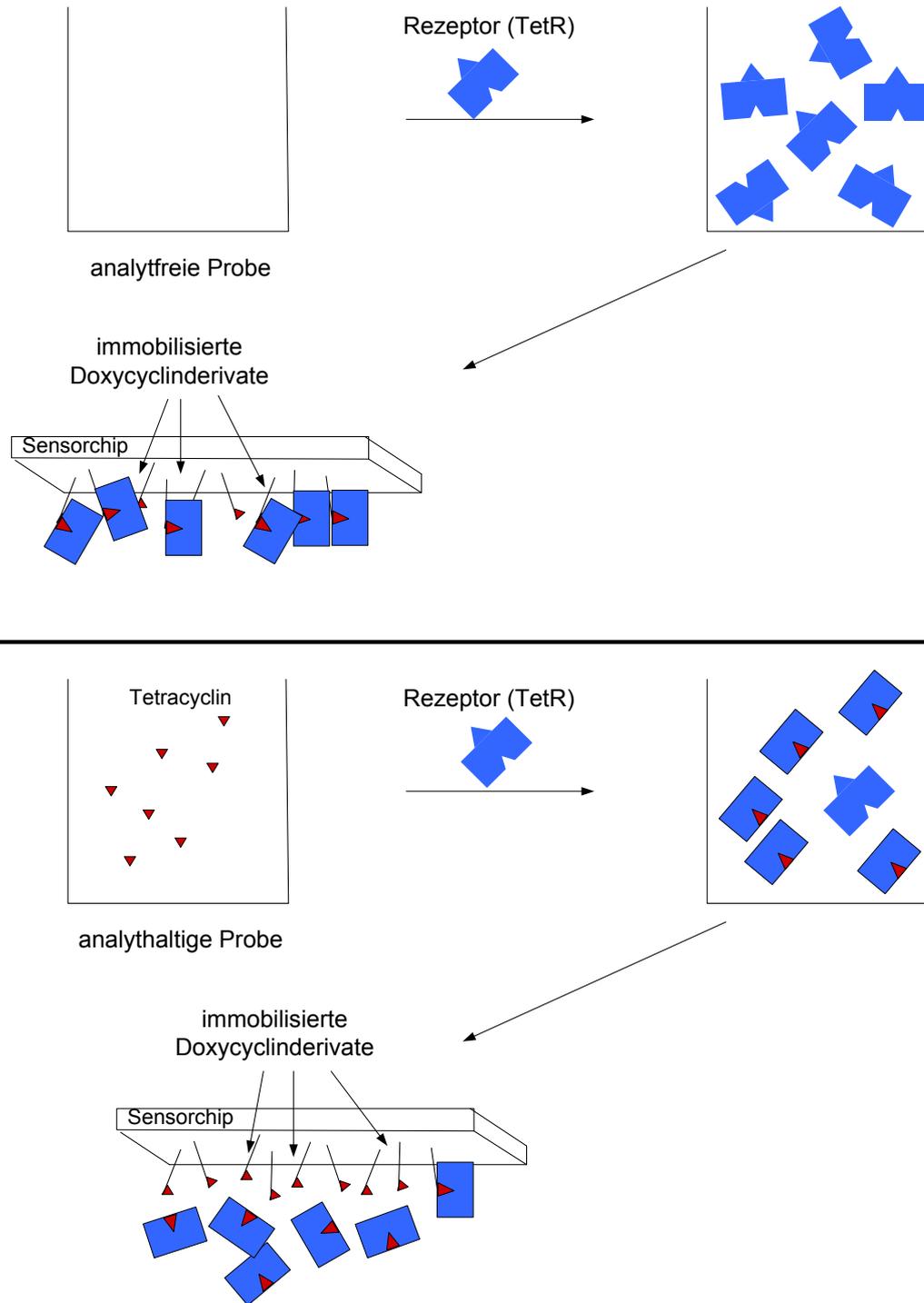


Abbildung 6-1: Schematische Darstellung des kompetitiven Assayformates. Die Probe wird mit dem für die Gruppe der Tetracycline spezifischen Rezeptorprotein (TetR) inkubiert. Bei tetracyclinfreien Proben bleiben die Bindestellen am Rezeptor unbesetzt, so dass dieser an die Doxycyclinderivate auf der Chipoberfläche binden kann. Bei einer tetracyclinhaltigen Probe werden die Bindestellen für Tetracycline bereits während der Inkubation abgesättigt, so dass kein oder weniger Rezeptor an die Sensoroberfläche bindet.

Charakteristika des Sensorgramms

In Abbildung 6-2 ist exemplarisch ein Sensorgramm des kompetitiven Assayformates dargestellt. Im Gegensatz zum nicht-kompetitiven Format umfasst es nur die Injektion von Messlösung, einer Mischung von TetR und Probenlösung, und Regenerationslösungen.

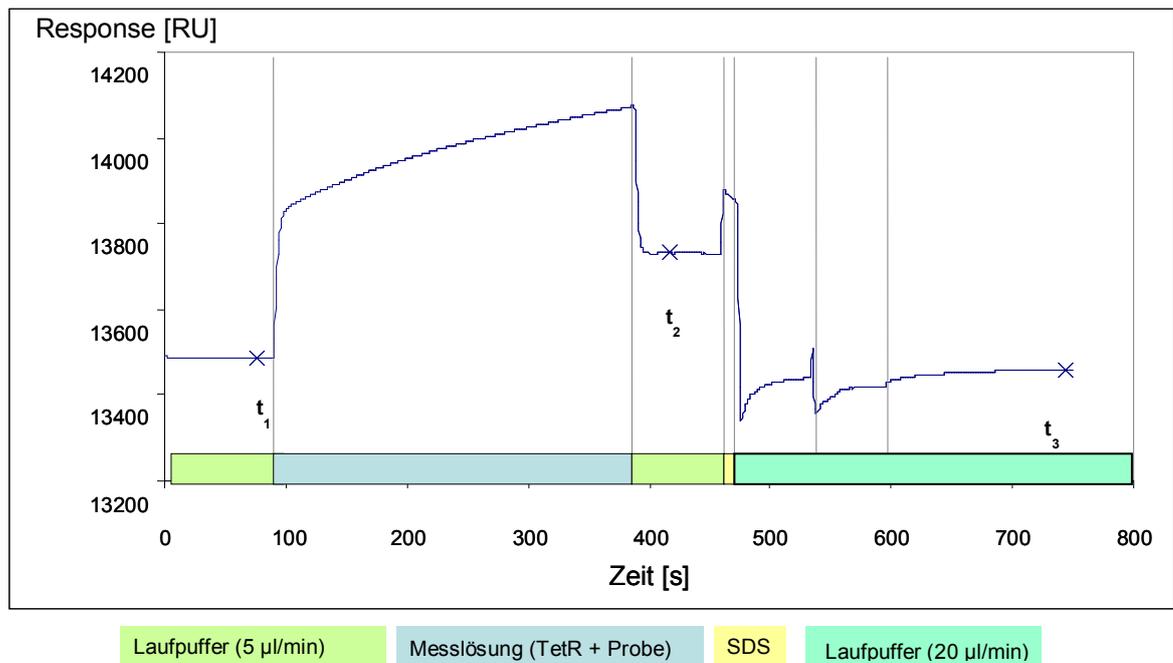


Abbildung 6-2: Verlauf eines Messzyklus im kompetitiven Assayformat. Dargestellt ist die Injektion der Messlösung, gefolgt von der Regeneration. Die Lösungen, die zu den verschiedenen Zeiten über die Flusszelle laufen sind farbig markiert.

Folgende Messpunkte wurden im Sensorgramm gesetzt:

Tabelle 6-1: Lage der Messpunkte in einem Messzyklus des kompetitiven Assay-Formates

Messpunkt	Zeitpunkt
t ₁ (Basislinie)	10 s vor Injektion der Messlösung
t ₂ (TetR-Bindung)	30 s nach Injektion der Messlösung
t ₃ (Regeneration)	120 s nach Probeninjektion

Der Messpunkt t₁ repräsentiert die mit Doxycyclinderivaten belegte Chipoberfläche. Der absolute Response bei t₁ aufgetragen gegen die Nummer des Messzyklus wird im Weiteren als Basislinie bezeichnet. „Basislinie“ bezeichnet keine kontinuierliche Betrachtung eines Signals, sondern eine Folge von Messwerten aufeinander folgender

Zyklen, die zum Zeitpunkt t_1 im Zyklus aufgezeichnet werden. Die Beobachtung des Response an diesem Messpunkt über mehrere Zyklen einer Messreihe zeigt Veränderungen auf der Chipoberfläche an, beispielsweise kann ein Anstieg der Basislinie eine unzureichende Regeneration der Chipoberfläche anzeigen.

Die Bindung von TetR an Doxycyclinderivate wird durch die Differenz der Messwerte zum Zeitpunkt t_2 und t_1 definiert und im Folgenden auch mit „TetR-Bindung“ bezeichnet. Wird TetR gebunden, so steigt das Signal zwischen t_1 und t_2 proportional zur Menge des gebundenen TetR an. Der relative Response, gemessen zwischen t_1 und t_2 , wird in ΔRU angegeben. Dieser Anstieg fällt durch Konkurrenz des Tetracyclins einer „positiven“ Probelösung geringer aus. Bei der Injektion einer Lösung zeigt sich eine sprunghafte Signaländerung, die durch die Änderung des Brechungsindex an der Oberfläche hervorgerufen wird, sofern sich die Brechungsindices der injizierten Lösung und des Laufpuffers unterscheiden (Bulk-Effekt). Eine Änderung des Signals, die durch eine Massenänderung an der Chipoberfläche hervorgerufen wird, zeigt sich erst, wenn nach der Injektion der Lösung wieder Laufpuffer über die Oberfläche fließt.

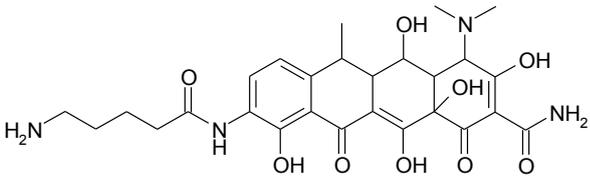
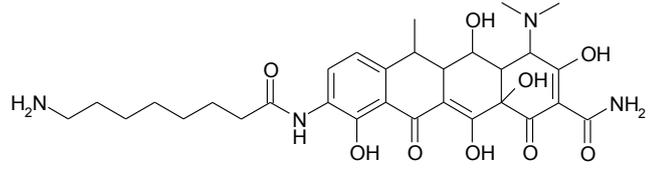
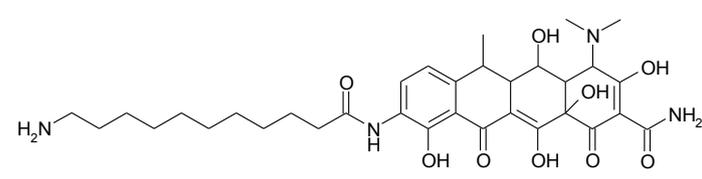
Zum Abschluss des Messzyklus wird die Chipoberfläche regeneriert, dabei sollte alles noch gebundene TetR sowie gegebenenfalls Matrixbestandteile aus der Probe von der Chipoberfläche abgelöst werden. Die Regeneration wird durch das Signal zum Messpunkt t_3 beschrieben. Das Signal sollte am Ende des Messzyklus wieder auf den Level kommen, der zu Beginn des Zyklus bestand. Eine Signaldifferenz zwischen t_3 und t_1 innerhalb desselben Zyklus kann daher zur Beurteilung der Regenerationskraft der verwendeten Lösungen herangezogen werden. Die Differenz zwischen den Messwerten zum Zeitpunkt t_3 und t_1 wird in dieser Arbeit synonym mit dem Begriff „Regeneration“ bezeichnet.

Die Parameter Basislinie, TetR-Bindung, Ablösung von TetR durch Probe und Regeneration wurden für diese Arbeit für jeden Messzyklus / jede Messreihe aufgezeichnet und bewertet.

Ausgangsbedingungen für die Entwicklung des kompetitiven Assays

Es sollte ein kompetitiver Assay zum Nachweis von Tetracyclinen auf der Basis der Oberflächenplasmonresonanz entwickelt werden. Als spezifischer Rezeptor für Tetracycline stand das Repressorprotein TetR zur Verfügung (zur Expression und Reinigung des Proteins siehe Kapitel 6.7, Seite 215, sowie Kapitel 2.6.1). Als Kompetitor zu freien Tetracyclinen in Lösung standen drei verschiedene Doxycyclinderivate zur Verfügung. Tabelle 6-2 zeigt Strukturformeln und Bezeichnungen der Derivate. Die Synthese der Derivate wurde von Dr. Igor Usai, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführt und in Literatur [38] beschrieben.

Tabelle 6-2: Struktur und Bezeichnung der verwendeten Doxycyclinderivate nach [38]

Spacerlänge (C-Atome)	Bezeichnung	Struktur
5	IU 58	 <p style="text-align: center;">9-(5-Aminopentanamido)-Doxycyclin</p>
8	IU 91	 <p style="text-align: center;">9-(8-Amino-octanamido)-Doxycyclin</p>
11	IU 95	 <p style="text-align: center;">9-(11-Amino-undecanamido)-Doxycyclin</p>

Als Basis für die Immobilisierung der Derivate standen vier verschiedene, kommerziell erhältliche Sensorchipoberflächen zur Verfügung. Einen Überblick über die

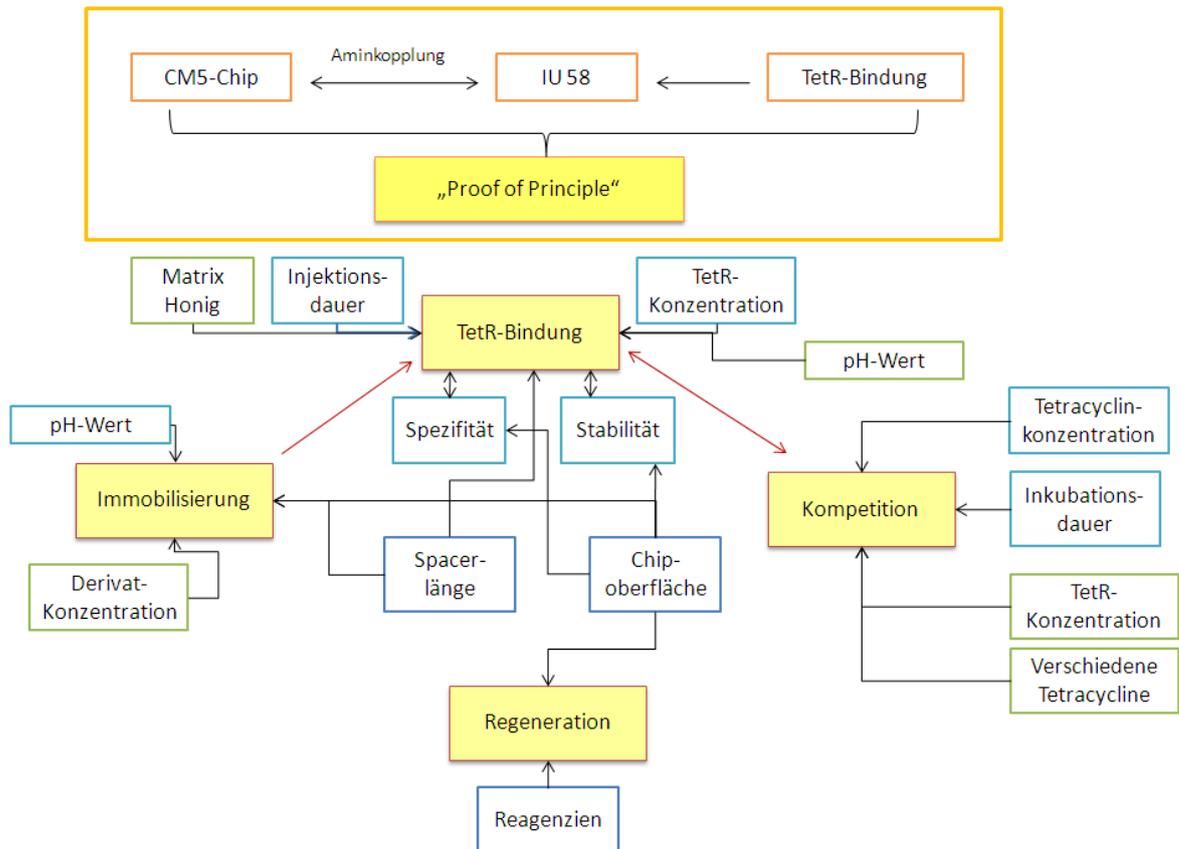
verwendeten Chiptypen gibt Tabelle 6-3, eine genauere Beschreibung findet sich in 6.1.3.1.

Tabelle 6-3: Verwendete Sensorchips und deren Merkmale

Bezeichnung	Oberflächenmaterial	Schichtdicke	Haftungsvermittler zur Goldschicht
CMTEG	Carboxymethyliertes Tetraethylenglycol	<5nm	nicht bekannt
CMDP	Carboxymethyl-dextran	<5 nm	thiolmodifiziertes, kationisches Oligomer
CM5	Carboxymethyl-dextran	100 nm	Alkylthiol
HC1000m	Polycarboxylat, lineares Hydrogel	1000 nm	nicht bekannt

Konzept der Studien zum kompetitiven Assay

Zunächst sollte überprüft werden, ob das beschriebene kompetitive Assayformat mit Doxycyclinderivaten durchführbar ist („**proof of principle**“). Das Assayformat sollte dann charakterisiert werden, indem systematisch untersucht wurde, ob und in wie weit verschiedene Einflussgrößen die Vorgänge **Immobilisierung der Derivate**, **TetR-Bindung** an die Derivate, **Kompetition mit Tetracyclinen** in der Probe und **Regeneration** der Chipoberfläche beeinflussen. Anhand der dabei erzielten Ergebnisse, sollten nach Auswahl geeigneter Testbedingungen (Chipoberfläche, Regeneration, Immobilisierungsbedingungen) weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die Empfindlichkeit des Assays zu erhöhen und Lebensmittelmatrices einzubeziehen. Einen Überblick über die in dieser Arbeit untersuchten Parameter und deren wechselseitige Beziehungen gibt die folgende Abbildung.



6-3: Übersicht über die untersuchten Einflussgrößen auf die Schritte Immobilisierung, TetR-Bindung, Konkurrenz und Regeneration. Blau umrahmt sind Parameter, die zur Charakterisierung des Assayformates untersucht wurden. Grün umrahmt sind die Parameter, die nach Auswahl geeigneter Bedingungen nur auf CM5-Chips untersucht wurden.

6.1.2 Beweis der Möglichkeit des kompetitiven Assayformates mit Doxycyclinderivaten

Für das Funktionieren des beschriebenen kompetitiven Assays (siehe Kapitel 6.1.1) müssen drei wesentliche Voraussetzungen erfüllt sein: 1) Es muss möglich sein, die Doxycyclinderivate permanent an die Oberfläche eines Sensorchips zu binden. 2) Die immobilisierten Derivate müssen für die Bindetasche am TetR sterisch zugänglich sein, was in Anbetracht der Größenunterschiede zwischen Derivat und TetR und der relativ großen Nähe zur Chipoberfläche, sowie der Derivatisierung der Zielstruktur nicht als selbstverständlich vorausgesetzt werden kann. 3) Erfolgt eine Bindung von Rezeptor an die Oberfläche, muss geprüft werden, ob eine Konkurrenz mit freiem Tetracyclin aus der Lösung stattfindet, und ob dies von der Konzentration des Tetracyclins in der Messlösung abhängt.

Für erste Versuche wurden das Derivat IU 58 und Sensorchips mit Carboxymethyl-dextranoberfläche (CM5) ausgewählt. Die Immobilisierung sollte mittels Aminkopplung erfolgen (siehe 6.1.3). IU 58 wurde in Boratpuffer pH 8,5 gelöst (1 mg/ml) und nach der Aktivierung der Carboxymethyl-dextranoberfläche mit EDC/NHS injiziert. Der Signalverlauf wurde am Gerät verfolgt. Es wurde ein deutlicher Signalanstieg während der Injektion des Derivates beobachtet, der zeigt, dass Derivat gebunden wurde. Die erste Voraussetzung für den Assay ist damit erfüllt, eine Immobilisierung von IU 58 mittels Aminkopplung ist möglich.

Durch Injektion einer TetR-Lösung wurde getestet, ob die immobilisierten Derivate sterisch für die Bindung des Rezeptors zur Verfügung stehen. Das ansteigende Signal während der Injektion zeigte die Bindung von TetR an die immobilisierten Derivate.

Tabelle 6-4: Eckdaten zu Immobilisierung und TetR-Bindung, IU 58 1 mg/ml gelöst in Boratpuffer pH 8,5; Injektionsdauer 30 Minuten. Injektion TetR 1 μ M in Laufpuffer, 80 μ l. Flussrate 5 μ l/min.

Derivat	Aktivierungslevel⁴	Immobilisierungslevel⁵	TetR-Bindung⁶
IU 58	164 RU	488 RU	825 RU

Um zu prüfen, ob Tetracyclin aus der Lösung mit den Derivaten um die Bindestellen am TetR konkurriert, wurde TetR mit Tetracyclinlösungen in verschiedenen Konzentrationen versetzt und die Mischung injiziert.

⁴ Aktivierungslevel: Signalerhöhung durch EDC/NHS-Aktivierung des CM5-Chips

⁵ Immobilisierungslevel: Signalerhöhung durch Kopplung des Doxycyclinderivates an den aktivierten Chip

⁶ TetR-Bindung: Signalerhöhung durch Bindung von TetR an das Doxycyclinderivat

Tabelle 6-5: Signal der Bindung von TetR in Abhängigkeit der Tetracyclinkonzentration in der Probelösung, TetR-Konzentration in der Probelösung 1 μ M, Injektionsvolumen der Probelösung 50 μ l bei einem Fluss von 5 μ l/min

Tetracyclinkonzentration in der Messlösung [ng/ml] (TetR 1 μM)	Signal [ΔRU]
0 ng/ml	345
20 ng/ml	339
100 ng/ml	322
200 ng/ml	289
500 ng/ml	219
1000 ng/ml	124

Tabelle 6-5 zeigt den Zusammenhang zwischen gemessenem Signal und Tetracyclinkonzentration. Je mehr Tetracyclin in der Messlösung vorliegt, desto weniger Rezeptor bindet an die Chipoberfläche. Dies wird durch die geringeren Signale bei höheren Tetracyclinkonzentrationen belegt. Es wurde gezeigt, dass der beschriebene **kompetitive Assay mit immobilisierten Doxycyclinderivaten grundsätzlich durchführbar** ist und sich entsprechend den theoretischen Annahmen verhält, die vorab getroffen wurden.

6.1.3 Immobilisierung von Doxycyclinderivaten

Tetracycline tragen am A-Ring eine Carbonsäureamid-Funktion, die theoretisch für eine Kopplung zur Verfügung steht. Sie liegt jedoch im Pharmacophor des Moleküls. Bei einer Kopplung über die Amidfunktion ist daher zu erwarten, dass Tetracyclin durch sterische Hinderung für die Bindetasche des TetR nicht mehr zugänglich ist, woraus eine Abschwächung der Bioaktivität oder sogar der Verlust des TetR-Bindevermögens folgt. Daher muss an einer anderen Position des Moleküls ein Spacer angebracht werden, der eine Aminogruppe zur Kopplung trägt und sowohl einen ausreichenden Abstand zur Chipoberfläche gewährleistet, als auch sterische Interferenzen minimiert. Es wurden Doxycyclinderivate eingesetzt, die einen Spacer am C9-Atom, außerhalb des Pharmacophors tragen (Strukturen der Derivate siehe Kapitel 6.1.1). Eine kovalente Bindung der Derivate an die Chipoberfläche kann über eine Aminkopplung mittels 1-Ethylen-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS)

erfolgen. Der Reaktionsmechanismus der Aminkopplung ist schematisch in Abbildung 6-4 dargestellt.

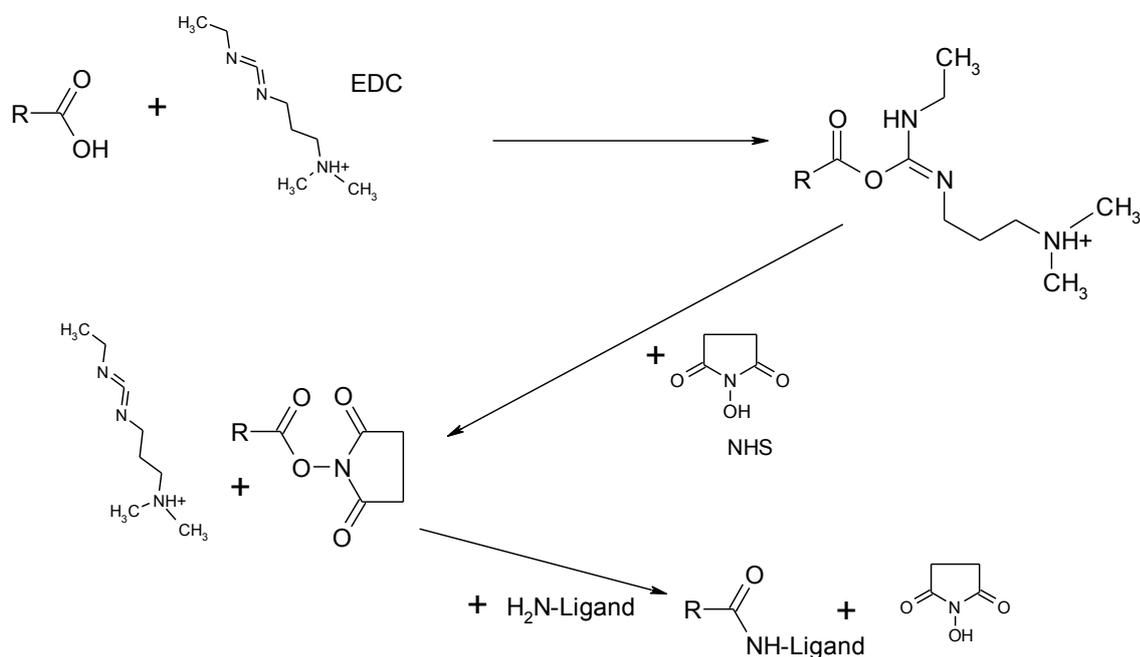


Abbildung 6-4: Reaktionsschema der Aktivierung der Carboxylgruppe mit EDC/NHS und der Kopplung des Liganden

Die Carboxylgruppen des Carboxymethyldextrans oder Polycarboxylats werden mit Hilfe einer Mischung aus EDC und NHS in reaktive N-Hydroxysuccinimidester überführt. In einem zweiten Schritt erfolgt die nucleophile Verdrängung der NHS-Ester durch primäre Aminogruppen des Liganden, es resultiert die kovalente Bindung des Liganden an die Oberfläche. Nach der Reaktion nicht umgesetzte NHS-Ester werden durch Injektion von Ethanolamin zu Amiden umgesetzt [197, 198].

Kenndaten des Immobilisierungsschrittes sind der Aktivierungslevel und der Immobilisierungslevel. Der Aktivierungslevel errechnet sich als Signaldifferenz zwischen dem Messpunkt „Basislinie“ vor der ersten Injektion und dem Messpunkt nach der Injektion des Gemisches EDC/NHS. Der Aktivierungslevel ist ein Maß für die Bildung von NHS-Estern an der Oberfläche. Über den Immobilisierungslevel - der Signaldifferenz zwischen dem Messpunkt „Basislinie“ und dem Messpunkt nach der abschließenden Injektion von Ethanolamin - lässt sich die Menge des an die Oberfläche gebundenen Derivates abschätzen.

Das Ausmaß der Immobilisierung hängt von einer Reihe Faktoren ab. Zu nennen sind hier beispielsweise die Chipoberfläche, pH-Wert des Kopplungspuffers, Ligandkonzentration, Reaktionszeiten, Beschaffenheit des Liganden. Für die Charakterisierung von wesentlichen Einflussgrößen auf den Immobilisierungsschritt wurde der Einfluss der Parameter Chipoberfläche, Beschaffenheit des Liganden (Spacerlänge am Derivat), pH-Wert und Derivatkonzentration untersucht.

6.1.3.1 Chipoberflächen

Der Einfluss der Chipoberfläche auf die Immobilisierung wurde geprüft. Dazu wurden vier verschiedene Sensorchips getestet, deren Oberflächenmaterial und Schichtdicke variierten. Tabelle 6-3 (Kapitel 6.1.1) gibt einen Überblick über die verwendeten Chip-typen.

Die CMTEG- und CMDP-Chips besitzen eine monomolekulare Oberflächenschicht, die auch als „planar“ bezeichnet wird. Die CM5- und HC1000m-Chips besitzen einen dreidimensionalen Aufbau der Oberfläche. Bei diesen erlaubt die Flexibilität der Polymerketten eine relativ freie Beweglichkeit der immobilisierten Liganden im Hydrogel. Polycarboxylatchips weisen gegenüber CM5-Chips laut Herstellerangaben eine niedrigere Ladungsdichte für negative Ladungen auf [199] und sollen sich daher insbesondere für Anwendungen eignen, bei denen Probleme durch unspezifische Bindungen von Proteinen aus der Matrix auftreten.

Bei der Aktivierung der Oberfläche mit EDC/NHS wurden auf CM5-Chips Aktivierungslevel von ca. 150 RU erzielt, wohingegen die Aktivierung von CMDP und HC1000m-Chip ein Signal von nur 30 - 40 RU lieferte und somit deutlich geringer war. Insbesondere für den HC1000m-Chip waren aufgrund der großen Schichtdicke und damit verbundenen höheren Oberflächenkapazität wesentlich höhere Aktivierungslevel erwartet worden.

Tabelle 6-6: Aktivierungs- und Immobilisierungslevel bei der Immobilisierung von IU 95 auf 4 verschiedenen Chiptypen und verschiedener Aktivierung

	CMTEG	CMDP	CM5	HC1000m
Aktivierung mit EDC/Sulfo-NHS [ΔRU]	446	164	--	1405
Aktivierung mit EDC/NHS [ΔRU]	193	40	161	34
Immobilisierung nach Aktivierung mit EDC/Sulfo-NHS [ΔRU]	833	511	--	4586
Immobilisierung nach Aktivierung mit EDC/NHS [ΔRU]	636	351	2362	7134

Neben der Wahl des pH-Wertes wirkte sich auch die Wahl der Aktivierungsreagenzien auf die Immobilisierung aus. Alternativ zur Aktivierung mit EDC/NHS kann die Aktivierung mittels EDC/Sulfo-NHS (N-Hydroxysulfosuccinimid) durchgeführt werden. Diese bietet sich besonders bei planaren Oberflächen an [199]. Sulfo-NHS-Ester tragen einen Sulfonsäurerest und sind daher deutlich polarer als NHS-Ester. Mit dem Sulfonsäurerest tragen Sulfo-NHS-Ester im Vergleich zu NHS-Estern eine zusätzliche Ladung, so dass bei der Immobilisierung mit Sulfo-NHS gegenüber NHS veränderte Bedingungen vorliegen. Sulfo-NHS-Ester zeigen gegenüber NHS-Estern eine geringere Hydrolyseempfindlichkeit in wässrigen Lösungen [200].

Die Aktivierung der Carboxylatgruppen mit EDC/Sulfo-NHS führte auf allen Oberflächen zu höheren Aktivierungsleveln. Dabei lagen die Aktivierungslevel bei planaren Chips um etwa Faktor 2 – 4 höher, beim HC1000m-Chip um Faktor 41 höher, was den Einfluss der Schichtdicke widerspiegelt.

Es fällt auf, dass auf dem HC1000m-Sensorchip der höhere Aktivierungslevel nicht zu einem höheren Immobilisierungslevel führte: Der Aktivierungslevel mit Sulfo-NHS war zwar ca. 41fach höher als mit NHS, der Immobilisierungslevel lag allerdings um ca.

2500 RU unter dem, der bei der Aktivierung mit NHS erzielt wurde. Dieses Phänomen kann darauf zurückzuführen sein, dass Carboxylat-Hydrogele bei einer zu hohen Aktivierung aufgrund der moderaten Hydrophobie der NHS-Ester unlöslich werden und auf der Chipoberfläche kollabieren können [201].

Der Aktivierungslevel, der auf der Chipoberfläche erhalten wird, erlaubt keine generelle Aussage über die zu erwartende Höhe des Immobilisierungslevels. So führte ein Aktivierungslevel von ca. 40 RU auf der CMDP-Oberfläche zu einem Immobilisierungslevel von 351 RU, auf der HC1000m-Oberfläche zu 7134 RU. **Die Schichtdicke der Oberfläche beeinflusst den Immobilisierungslevel wesentlich stärker als der Aktivierungslevel.**

Die Immobilisierungslevel variierten unter vergleichbaren Bedingungen auf den verschiedenen Sensorchips stark und waren erwartungsgemäß mit der Dicke der Oberflächenschicht korreliert. Aufgrund der größeren Oberflächenkapazität von dreidimensionalen gegenüber planaren Chipoberflächen wurden auf den CM5- und HC1000m-Chips deutlich höhere Immobilisierungslevel erhalten. Die höchsten Immobilisierungslevel wurden auf dem HC1000m-Chip erzielt, die niedrigsten auf dem CMDP-Chip, so dass für das Erzielen eines hohen Immobilisierungslevels möglichst große Schichtdicken verwendet werden sollten. Ein hoher Immobilisierungslevel führt nur zu einer entsprechend hohen TetR-Bindung, wenn keine sterischen Effekte auftreten und eine Zugänglichkeit der immobilisierten Derivate für TetR gewährleistet ist. Die Größe des Rezeptorproteins TetR könnte sich diesbezüglich nachteilig auswirken: an planaren Oberflächen können sterische Hinderungen auftreten, in Folge dessen könnte weniger Rezeptor gebunden werden, als freie Bindungsstellen zur Verfügung stehen. Auch in der HC1000m-Schicht könnten Probleme auftreten, da die Schicht sehr dick ist und die Diffusion des TetR in der Schicht behindert sein kann.

Für den Assay haben sich CM5-Chips als am geeignetsten erwiesen (siehe dazu Kapitel 6.1.7.1, Seite 104), da sie sowohl eine relativ hohe Oberflächenkapazität haben als auch - anders als die HC1000m-Oberfläche - die Zugänglichkeit der Derivate für die

Rezeptorproteine gewährleisten. Darüber hinaus überzeugten sie aufgrund der geringen unspezifischen Bindung störender Substanzen (siehe dazu 6.1.4.2).

6.1.3.2 Einfluss der Spacerlänge am Derivat auf die Immobilisierung

Die verwendeten Doxycyclinderivate unterscheiden sich in der Spacerlänge um jeweils 3 C-Atome: IU 58 trägt eine Alkankette von 5 C-Atomen, IU 91 eine von 8 C-Atomen und IU 95 eine von 11 C-Atomen (Tabelle 6-2). Die Derivate unterscheiden sich in Molekulargewicht, Größe und physikochemischen Eigenschaften wie Dielektrizitätskonstante, Hydrophobie und Polarisierbarkeit. Für den Assay ist die Länge des Spacers in zweierlei Hinsicht kritisch: Der Spacer muss sowohl einen ausreichenden Abstand der Doxycyclinstruktur von der Chipoberfläche gewährleisten, darüber hinaus sollte das derivatisierte Doxycyclin noch gut in die Bindetasche des TetR passen. Für die Immobilisierung ist zunächst nur der erste Aspekt wichtig, die TetR-Bindung wird in Abschnitt 6.1.4 diskutiert.

Zur Untersuchung des Einflusses der Spacerlänge auf den Immobilisierungslevel wurden auf den verschiedenen Sensorchips auf verschiedenen Flusszellen die Derivate immobilisiert. Die Ergebnisse der Immobilisierung sind in Tabelle 6-7 zusammengestellt.

Tabelle 6-7: Aktivierungs- und Immobilisierungslevel der Doxycyclinderivate auf verschiedenen Chipoberflächen. Aktivierung mit EDC/Sulfo-NHS, Ausnahme CM5-Chip: Aktivierung mit EDC/NHS, Kontaktzeit Aktivierungslösung 7 Minuten mit 5 µl/min. Konzentration Doxycyclinderivat je 0,5 mg/ml in HBS-EP-Puffer pH 7,4, Kontaktzeit 30 Minuten bei 5 µl/min

Chip	Aktivierungs- / Immobilisierungslevel IU 58 [Δ RU]		Aktivierungs- / Immobilisierungslevel IU 91 [Δ RU]		Aktivierungs- / Immobilisierungslevel IU 95 [Δ RU]	
	CMTEG	397	711	426	820	446
CMDP	206	358	210	398	164	511
CM5	156	477	170	1050	161	2362
HC1000m	nicht auswertbar*	2606	1406	3919	1405	4586

*aufgrund von Luftblasen in der Messzelle

Auf dem CM5-Chip waren bei der Aktivierung der verschiedenen Flusszellen eines Sensorchips vergleichbare Aktivierungslevel erzielt worden. Daher wird angenommen,

dass die unterschiedlichen Immobilisierungslevel nicht auf unterschiedliche Aktivierungslevel sondern vielmehr auf die Länge des Spacers am Derivat zurückzuführen sind. Es wurden höhere Signale für die Immobilisierung erhalten, je länger der Spacer war. Auch beim HC1000m-Chip wurden bei vergleichbaren Aktivierungsleveln deutlich höhere Signale für IU 91 und 95 gegenüber IU 58 erzielt.

Auf dem CMDP-Chip liefert der geringere Aktivierungslevel bei IU 95 einen höheren Immobilisierungslevel gegenüber IU 91 und IU 58. Auf dem CMTEG-Chip waren die Unterschiede zwischen den Immobilisierungsleveln gering und könnten auf die entsprechenden verschiedenen Aktivierungslevel zurückzuführen sein. Möglicherweise lag die Konzentration der Derivate bei der Immobilisierung so hoch, dass bei den dünnen Schichten an der Grenze zur Sättigung gearbeitet wurde. Dies kann die nur geringen Unterschiede in den Immobilisierungsleveln auf der CMTEG-Oberfläche erklären.

Für die Immobilisierung der Derivate (Tabelle 6-8) wurden Lösungen mit der gleichen Konzentration (je 0,5 mg/ml) verwendet, also mit etwas unterschiedlichen Molaritäten. In Tabelle 6-8 sind exemplarisch für den CM5-Chip die zugehörigen Molaritäten gezeigt.

Tabelle 6-8: Immobilisierungslevel auf CM5-Chip, Berücksichtigung der unterschiedlichen Molekulargewichte der Derivate

Derivat	Molekulare Masse [g/mol]	Konzentration [mM]	Injizierte Menge [nmol]	Immobilisierungslevel [ΔRU]	TetR-Bindung [ΔRU]
IU 58	558,6	0,89	0,134	477	356
IU 91	600,7	0,83	0,125	1050	668
IU 95	642,7	0,78	0,117	2362	447

Die geringen Unterschiede in den eingesetzten Molaritäten sind gegenüber dem Einfluss der Spacerlänge vernachlässigbar. Der Immobilisierungslevel verdoppelte sich etwa zwischen IU 58 und IU 91, die Immobilisierungslevel von IU 91 und IU 95 unterschieden sich ebenfalls um den Faktor 2. Der höhere Immobilisierungslevel könnte auf eine veränderte Reaktivität der Aminofunktion am Spacer zurückzuführen sein, oder

auf die bessere sterische Zugänglichkeit. Die Ergebnisse decken sich mit der Erwartung, dass sich Derivate mit längerer C-Kette als Spacer besser für den Assay eignen sollten als solche mit kürzerem Spacer. Ein längerer Spacer verändert die Moleküleigenschaften des Doxycyclinderivates, sowohl was die Flexibilität angeht, als auch die Hydrophobie und die Hydratisierung. Eine bessere Immobilisierbarkeit der Derivate mit längerem Spacer kann daher auf sterische Effekte (weniger sterische Hinderung bei der Kopplungsreaktion), aber auch auf die Moleküleigenschaften zurückzuführen sein.

6.1.3.3 Einfluss des pH-Wertes auf den Immobilisierungslevel

Auf Chips des Typs CM5 wurde der Immobilisierungslevel in Abhängigkeit vom pH-Wert des Kopplungspuffers untersucht, dazu wurde IU 58 in verschiedenen Puffern (pH-Werte 4,5; 7,4 und 8,5) gelöst und anschließend auf eine mit EDC/NHS aktivierte Sensorchipoberfläche injiziert. Nach Deaktivierung der Sensoroberfläche mit Ethanolamin wurde TetR injiziert, um den Immobilisierungslevel zur TetR-Bindung in Bezug zu setzen und einen Eindruck über die Verfügbarkeit der immobilisierten Derivate zu erhalten. Der untersuchte pH-Bereich ist wegen der Stabilität der Doxycyclinderivate limitiert, da Epimerisierungen im sauren pH-Bereich und Isomerisierungen bei alkalischen pH-Werten vermieden werden sollten.

Tabelle 6-9; Immobilisierungslevel in Abhängigkeit vom pH-Wert der Derivatlösung, getestet auf CM5-Chips mit IU58; Aktivierung der Oberfläche mittels EDC/NHS, Kontaktzeit Derivat 30 min, Deaktivierung der Oberfläche mittels Ethanolamin

pH-Wert	Immobilisierungslevel [ΔRU]	TetR-Bindung [ΔRU]
4,5 (Acetatpuffer)	3064	174
7,4 (HBS-EP-Puffer)	674	997
8,5 (Boratpuffer)	515	825

Es fällt zunächst auf, dass der pH-Wert der Derivatlösung den Immobilisierungslevel beeinflusst (Tabelle 6-9). Bei saurem pH wurde in diesem Versuch ein etwa 5-6fach höheres Signal erhalten als in den Versuchen bei pH 7,4 oder 8,5. Dem steht allerdings eine nur geringe Bindung von TetR gegenüber. Obwohl auch in anderen Versuchen bei

der Immobilisierung von Doxycyclinderivaten Immobilisierungslevel von bis zu 2000 RU erhalten wurden (siehe auch Tabelle 6-7), scheint dieser Messwert bei pH 4,5 sehr hoch zu sein. Möglicherweise handelt es sich bei dem Messergebnis um einen Ausreißer. Ein Blindversuch, in dem der Acetatpuffer ohne Derivat über eine aktivierte Sensoroberfläche gegeben wurde, zeigte eine Signaldifferenz von 104 RU; so dass der Puffer alleine nicht der Grund für den hohen Immobilisierungslevel sein kann. Auf eine Wiederholung der Immobilisierung bei pH 4,5 wurde verzichtet, da diese im Hinblick auf die Ermittlung geeigneter Bedingungen für den Assay aufgrund der schlechten TetR-Bindung wenig zielführend schien. Die Immobilisierungslevel bei pH 7,4 und pH 8,5 unterschieden sich um etwa 150 RU. Bei pH 7,4 wurde im Vergleich zu pH 8,5 der höhere Immobilisierungslevel und auch die höhere TetR-Bindung erhalten.

Wenn man voraussetzt, dass der Immobilisierungslevel einen Masseneffekt an der Oberfläche abbildet und keine anderen physikochemischen Veränderungen stattfinden, dann lässt sich aus dem Ergebnis erkennen, dass der pH-Wert die Bindung des Derivates in hohem Maße beeinflusst. Eine Berechnung der Menge des gebundenen Derivates anhand des Immobilisierungslevels ist nicht zulässig, da bei der SPR-Messung der absolute Response üblicherweise mit einem Protein als Bezugswert berechnet wird. Der Brechungsindex kleiner Moleküle kann allerdings stark davon abweichen, somit stimmen die erhaltenen Ergebnisse nicht mit der Massenänderung überein, die bei der Immobilisierung eines Proteins erhalten würde [198, 202].

Durch den pH-Wert wird die Ladungsverteilung am Derivat und an der Chipoberfläche beeinflusst. Dies kann man bei der Immobilisierung von Proteinen nutzen: Durch Wahl eines geeigneten pH-Wertes, der auf den isoelektrischen Punkt des Proteins abgestimmt ist, kann erreicht werden, dass Protein und Chipoberfläche gegensätzlich geladen sind und eine elektrostatische Anziehung resultiert. Die Effizienz der Immobilisierung kann dadurch deutlich gesteigert werden. Bei kleinen Molekülen - wie dem verwendeten Doxycyclinderivat - stehen nur sehr wenige Ladungsträger zur Verfügung. Eine elektrostatische Aufkonzentration des Derivates an der Chipoberfläche kann unter den gewählten Bedingungen nicht postuliert werden.

Der pH-Wert wirkt sich nicht nur auf die Immobilisierung der Derivate aus, sondern auch auf deren Verfügbarkeit an der Oberfläche. Dies zeigt ein Vergleich der TetR-Bindung der bei unterschiedlichem pH-Wert immobilisierten Oberflächen (Tabelle 6-9). Unter der Annahme, dass der hohe Immobilisierungslevel eine Massenänderung und damit die Bindung von Derivat widerspiegelt, wurde bei pH 4,5 mehr Derivat immobilisiert, allerdings bei der folgenden Injektion von Rezeptor weniger gebunden. Dies kann durch sterische Effekte an der Oberfläche bedingt sein: Die Immobilisierungsdichte von Derivaten an der Oberfläche könnte bereits so hoch sein, dass die Bindung von TetR sterisch behindert wird. Eine weitere mögliche Begründung könnte in der Epimerisierung der Derivate bei pH 4,5 liegen. Diese würde jedoch nur die geringere TetR-Bindung erklären, nicht aber den höheren Immobilisierungslevel.

Die Beobachtungen zeigen, dass es sinnvoll ist, den optimalen pH-Wert für die Immobilisierung für jeden Liganden in Abhängigkeit von der verwendeten Chipoberfläche empirisch zu ermitteln. Hierbei können Analyteigenschaften und Chipoberfläche limitierende Faktoren sein. Alle folgenden Immobilisierungen wurden bei pH 7,4 durchgeführt, um eine möglichst hohe TetR-Bindung zu erreichen.

6.1.4 TetR-Bindung

TetR hat eine hohe Affinität zu freien Tetracyclinen (Bindungskonstante 10^9 M^{-1} [86]). Durch die Derivatisierung von Doxycyclin zum einen und die Fixierung der Derivate auf der Chipoberfläche zum anderen kann die Affinität des TetR stark sinken, da sterische Effekte sowie die Beschaffenheit der Chipoberfläche die Bindung TetR-Doxycyclinderivat beeinflussen.

Die Bindung von TetR an die mit Doxycyclin derivatisierte Oberfläche ist eine essentielle Voraussetzung für das Funktionieren des Assays. Da die Bindung von Tetracyclinen an TetR in physiologischer Umgebung (Bakterienzelle) als Magnesiumkomplex erfolgt [86, 203], wird erwartet, dass die Bindung nur in Anwesenheit zweiwertiger Metallkationen zustande kommt. Darüber hinaus wird angenommen, dass die Parameter Konzentration von TetR, Anwesenheit und Konzentration von Tetracyclin in der Messlösung und auch der pH-Wert der Lösung die Bindung beeinflussen.

Die TetR-Bindung sollte stabil, spezifisch und reproduzierbar sein. Weiterhin sollte es möglich sein, sie in einem Regenerationsschritt vollständig zu lösen.

6.1.4.1 Einfluss der Spacerlänge am Doxycyclinderivat auf die TetR-Bindung

Doxycyclinderivate in Lösung

Um den Einfluss der Spacerlänge des Derivates auf die Bindungsfähigkeit von TetR zu untersuchen, wurden die Derivate in Lösung als Proben im nicht-kompetitiven Assayformat (siehe Kapitel 6.2, Seite 116ff) gegen Doxycyclin als Referenz gemessen.

Als freie Moleküle in Lösung reagieren die Doxycyclinderivate als Liganden mit dem Rezeptorprotein TetR und rufen die Konformationsänderung hervor, die für die Ablösung des TetR von *tetO* notwendig ist.

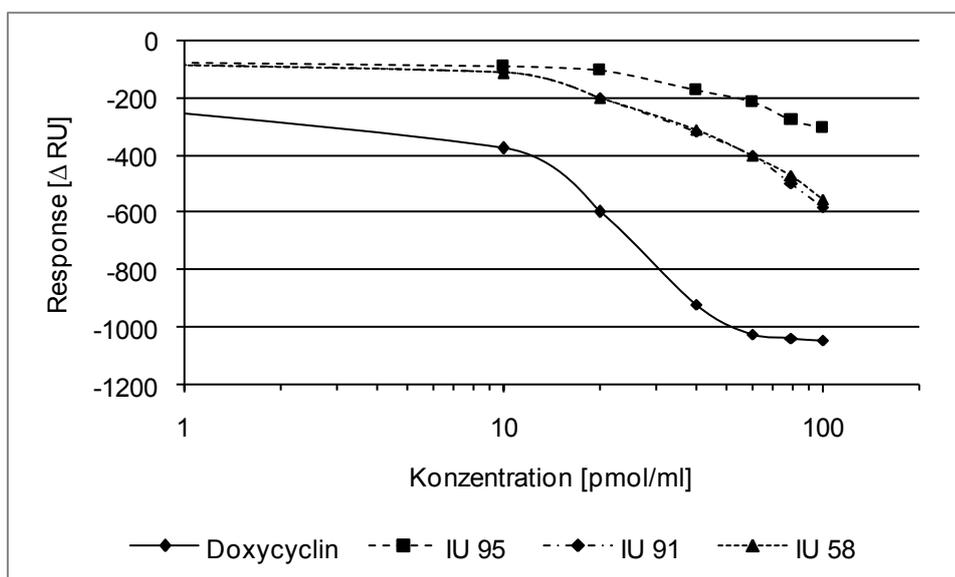


Abbildung 6-5: Ablösung von TetR durch Doxycyclinderivate verglichen mit der Ablösung von TetR durch Doxycyclin, bei verschiedenen Konzentrationen der Derivate [pmol/ml] im nicht-kompetitiven Assay-Format

Für Doxycyclin wurde ein Arbeitsbereich von etwa 800 RU ermittelt. IU 58 und IU 91 verhielten sich in der Messung nahezu identisch und zeigen etwa 50% der Aktivität, die für das underivatisierte Doxycyclin beobachtet wird (Abbildung 6-5). IU 95 - das Derivat mit dem längsten Alkylspacer - reagiert mit nur 25% der Aktivität von Doxycyclin. Es ist festzustellen, dass die vorgenommene **Derivatisierung von Doxycyclin die Bindungsfähigkeit für TetR herabsetzt**. Die **Abnahme der Fähigkeit, an TetR zu binden, ist von der Länge der Kohlenstoffkette am Spacer abhängig**, wobei sich die Länge negativ auswirkt. Die Bindungsfähigkeit ist bei IU 95,

dem Derivat mit 11-C-Atomen in der Spacerkette ist am schlechtesten, wohingegen zwischen IU 91 und IU 58 kein Unterschied beobachtet wurde. Der Spacer wirkt sich negativ auf die Bindungsfähigkeit an TetR aus. Dies ist abgesehen vom Volumen wahrscheinlich auf eine erhöhte Hydrophobie und veränderte Hydratisierung des Moleküls zurückzuführen. Bei der Bindung von Magnesium-Tetracyclinkomplexen in der Bindetasche des TetR spielt insbesondere die Hydratisierung eine große Rolle, daneben ist zu berücksichtigen, dass sich bei underivatisierten Tetracyclinen die Bindetasche des TetR wie eine Schiebetür hinter dem gebundenen Tetracyclin schließt [88]. Dies ist wahrscheinlich bei den Derivaten weniger gut möglich, so dass diese schlechter in die Bindetaschen des TetR passen.

Die Länge des Spacers am Derivat beeinflusst nicht nur die Immobilisierung (siehe Absatz 6.1.3.2), sondern ist auch für die TetR-Bindung bedeutend. Dabei treten zwei Effekte in Konkurrenz: Wird der Spacer verlängert, so wird bei immobilisierten Derivaten dadurch der Abstand der Doxycyclinstruktur von der Chipoberfläche vergrößert. Gleichzeitig bewirkt ein längerer Spacer jedoch die Veränderung der Eigenschaften des Doxycyclins hinsichtlich Hydrophobie und Hydratisierung und damit auch die Rezeptor-Ligand-Erkennung. Bei den in Lösung durchgeführten Messungen wurde der letztgenannte Effekt untersucht, der erstgenannte wurde im Folgenden ebenfalls untersucht.

Immobilisierte Doxycyclinderivate

Auf der Sensorchipoberfläche kann ein längerer Spacer eine bessere Flexibilität und Zugänglichkeit für TetR bewirken, so dass der Einfluss der Spacerlänge bei immobilisierten Doxycyclinderivaten untersucht wurde. Die TetR-Bindung an die verschiedenen Derivate wird durch beide Eigenschaften – die Zugänglichkeit und die Bindungsfähigkeit – beeinflusst.

Tabelle 6-10: TetR-Bindung an verschiedene Doxycyclinderivate auf CM5 und CMDP-Chip, TetR 1 μ M, Injektionsvolumen 40 μ l, Fluss 5 μ l/min. CM5-Chip aktiviert mit EDC/NHS, CMDP-Chip aktiviert mit EDC/Sulfo-NHS

Chip	Derivat	injizierte Menge [nmol]	Immobilisierungslevel [Δ RU]	TetR Bindung [Δ RU]
CM5	IU 95	0,117	2362	447
	IU 91	0,125	1050	668
	IU 58	0,134	477	356
CMDP	IU 95	0,117	511	229
	IU 91	0,125	398	185
	IU 58	0,134	258	140

IU 95 und 91 zeigen gegenüber IU 58 eine höhere TetR-Bindung auf den Chipoberflächen (Tabelle 6-10). Die TetR-Bindung bildet jedoch die Summe verschiedener Effekte ab: neben Unterschieden in den Bindungscharakteristiken der Derivate müssen hier auch die verschiedenen Immobilisierungslevel berücksichtigt werden, die aufgrund der verschiedenen Spacerlänge erhalten wurden (siehe Seite 72).

Auf dem CM5-Chip lag der Immobilisierungslevel von IU 91 doppelt so hoch wie der von IU 58, und führte korrespondierend dazu zu einem doppelt so hohen Signal für die TetR-Bindung. IU 95 hingegen zeigte einen fünffachen Immobilisierungslevel verglichen mit IU 58. Wird das Molekulargewicht hier berücksichtigt, so ergibt dies eine etwa 4,6fach größere Anzahl immobilisierter Derivatmoleküle. An die Chipoberfläche wurde jedoch nur 1,26fach mehr TetR gebunden; dies entspricht einer Abnahme auf etwa 30% ($1,2/4,6$) im Vergleich zu IU 58. Diese Abnahme stimmt mit der Größenordnung überein, die für die Bindungsaktivität von IU 95 gegenüber IU 58 in Lösung beobachtet wurde. Eine Sättigung der Oberfläche tritt bei etwa 1000 RU auf, wie in Tabelle 6-12, Seite 105 gezeigt ist. Über diesen Wert hinaus ist keine weitere TetR-Bindung zu erwarten. Es ist jedoch festzuhalten, dass die in Tabelle 6-10 dargestellten Messwerte nicht im Bereich der Sättigung liegen und somit die geringere TetR-Bindung an IU 95 nicht durch Sättigung der Oberfläche hervorgerufen wird.

Die Ergebnisse zeigen, dass ein **längerer Spacer in der CM5-Matrix die Zugänglichkeit der Doxycyclinstruktur für TetR nicht verbessert**. Dagegen beeinträchtigt der Spacer mit 9 CH₂-Gruppen die Erkennung des Liganden durch den Rezeptor unabhängig davon, ob das Derivat in Lösung vorliegt oder immobilisiert ist. Die Derivate in der CM5-Matrix verhalten sich demnach analog denen in Lösung. Dies ist auf die hohe Flexibilität zurückzuführen, die aufgrund der langen Dextranketten des Hydrogels besteht und durch den längeren Spacer nicht mehr verbessert wird.

Dagegen scheint für **Derivate auf der dünn-schichtigen CMDP-Oberfläche ein längerer Spacer vorteilhaft zu sein**. Trotz der schlechteren Erkennung von IU95 durch TetR unterschied sich das Verhältnis von TetR-Bindung zum Immobilisierungslevel nicht signifikant von denen für IU 91 und 58 (Tabelle 6-10). Die schlechtere Erkennung von IU 95 gegenüber IU 58 und 91 wird auf der planaren Oberfläche offensichtlich durch sterische Effekte kompensiert. Das Bindungsverhalten der auf der planaren Oberfläche immobilisierten Derivate gegenüber TetR war für alle drei Derivate vergleichbar.

Berechnet man die Verhältnisse von TetR-Bindung zu Immobilisierungslevel, so wird deutlich, dass die Bindungsausbeute umso schlechter ist, je dicker die Oberfläche ist. Eine Ursache der schlechteren Bindung an IU 95 auf dem CM5-Chip könnte darin liegen, dass durch die Immobilisierung einer sehr großen Menge IU 95 durch die Menge der Alkylspacer eine höhere Hydrophobie der Oberfläche vorliegt, die sich negativ auf die TetR-Bindung auswirkt. Unabhängig von der Hydrophobie wurde von Edwards et al. beschrieben, dass die sterische Hinderung der Rezeptorbindung in einer schlechteren Assoziation resultiert, wenn im Hydrogel eine hohe Ligandendichte vorliegt [204]. Übereinstimmend damit fanden auch Fischer et al. die schlechtesten Bindungsverhältnisse zwischen Calmodulin und einem daran bindenden Peptid bei der höchsten Ligandendichte [196].

Der HC1000m- und CMTEG-Chip wurde nicht in die Betrachtung einbezogen, da auf beiden Chips zu einem großen Teil unspezifische Bindung detektiert wurde (HC1000m)

oder keine spezifische TetR-Bindung erfolgte (CMTEG) (siehe Abschnitt 6.1.4.2, Seite 81).

6.1.4.2 Spezifität der Bindung / unspezifische Wechselwirkungen an verschiedenen Chipoberflächen

Es sollte geprüft werden, ob die beobachtete Bindung von TetR spezifisch an die immobilisierten Doxycyclinderivate erfolgt oder ob es sich um eine unspezifische Bindung an die Chipoberfläche handelt, da ein Signalanstieg während der Injektion keinen Rückschluss auf die Art der Bindung zulässt. Zu diesem Zweck wurde TetR in An- und Abwesenheit von Magnesiumionen im Puffer injiziert und die erhaltenen Signaldifferenzen verglichen.

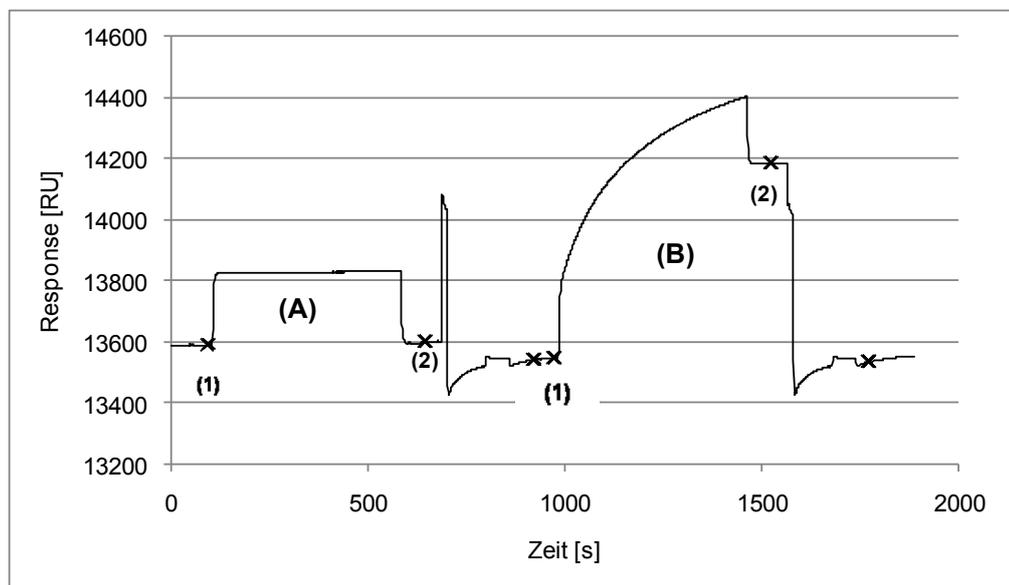


Abbildung 6-6: Injektion von TetR in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von Magnesiumionen, TetR 1 μ M, 40 μ l bei 5 μ l/min, exemplarisch für IU 91 auf CM5-Chip; (1) und (2): Messpunkte vor und nach der Injektion, aus denen Δ RU berechnet wird

Abbildung 6-6 zeigt den erwarteten Verlauf der Messung: Bei der Injektion von TetR ohne Mg^{2+} (A) ist lediglich eine Änderung des Brechungsindex sichtbar, der durch die Anwesenheit von TetR in der injizierten Lösung zustande kommt. Das Signal ist während der Injektion flach, zeigt keinen Anstieg und fällt nach Ende der Injektion wieder auf die Basislinie. Wird TetR mit Mg^{2+} injiziert (B), zeigt sich ein deutlicher Anstieg des Signals, und das Signal fällt nach der Injektion nicht wieder auf die Basislinie zurück sondern bleibt auf dem Level, der die Bindung von TetR anzeigt.

Für die Bindung von TetR an Tetracycline, also auch an die Doxycyclinderivate an der modifizierten Chipoberfläche ist die Anwesenheit von zweiwertigen Metallkationen erforderlich, da TetR aufgrund der Struktur der Bindetasche Tetracycline nur als Metallkomplex bindet (siehe auch Abschnitt 2.6.3). Das in Abwesenheit von Mg^{2+} bei der Injektion von TetR ermittelte Signal zeigt daher die unspezifische Bindung an der Sensoroberfläche an. Dies ist ein Vorteil gegenüber Antikörper/Antigen-Systemen, bei denen die unspezifische Bindung im Regelfall nur auf der Chipoberfläche eines unbelegten Chips bestimmt werden kann.

Abbildung 6-7 zeigt die Ergebnisse der Messungen auf den verschiedenen Chips.

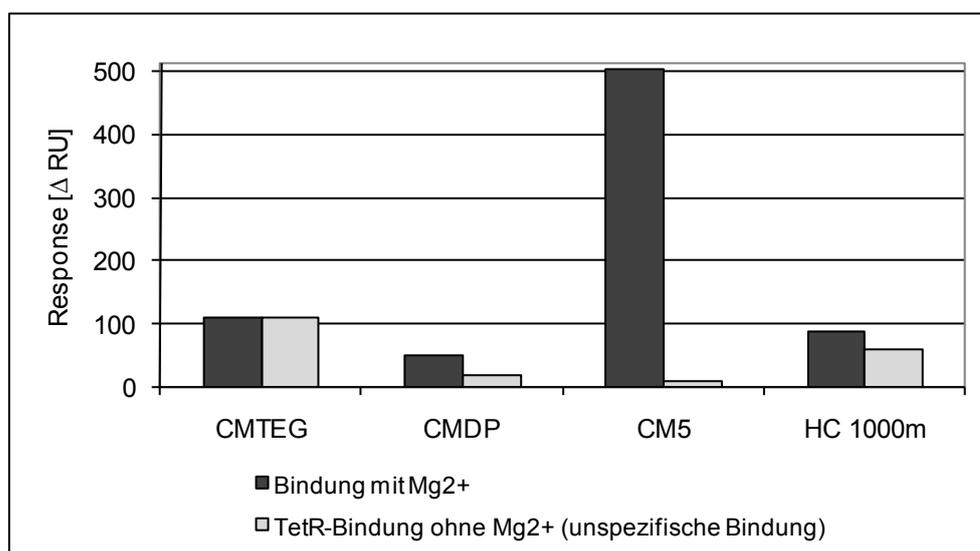


Abbildung 6-7: Bindung von TetR in Anwesenheit von Magnesiumionen (spezifische Bindung) und Anteil der unspezifischen Bindung an der TetR-Bindung, exemplarisch für IU 95

Nur auf dem CM5-Chip wurde das erwartete Bindungsverhalten beobachtet: Bindung von TetR nur in Anwesenheit von Mg^{2+} . Wird auch ohne Magnesiumionen TetR gebunden, zeigt dies die unspezifische Bindung des Proteins an die Chipoberfläche.

Auf dem CMTEG-Chip wurden vergleichbare Signale für die TetR-Bindung in An- und Abwesenheit von Magnesiumionen beobachtet. Dies zeigt, dass keine spezifische Bindung von TetR an die immobilisierten Doxycyclinderivate erfolgt und die beobachtete Bindung eine rein unspezifische an die Chipoberfläche ist. Der CMTEG-Chip zeichnet sich durch eine extrem dünne Schichtdicke aus. Wahrscheinlich wird TetR an die Goldschicht oder den Haftungsvermittler gebunden [199]. Bei planaren

Sensoroberflächen können durch eine raue Topologie der Oberfläche sogenannte „pinhole defects“ auftreten, also Stellen, an denen die Goldoberfläche blank liegt und lokal für unspezifische Bindungen zur Verfügung steht [201]. Möglicherweise trägt dies auch zur unspezifischen Bindung von TetR bei. Beim CMDP-Chip wurde insgesamt relativ wenig TetR spezifisch gebunden. Der Anteil unspezifischer Bindung betrug etwa 30%. Da die Dextranschicht beim CMDP-Chip sehr dünn ist, wird erwartet, dass weniger unspezifische Wechselwirkungen mit dem Dextran stattfinden als beispielsweise am CM5-Chip. Allerdings ist das Dextran kovalent an ein thiolmodifiziertes, kationisches Oligomer als Haftungsvermittler gebunden, so dass aufgrund der geringen Schichtdicke dieser Haftungsvermittler oder auch – bei unvollständiger Bedeckung - die darunter gelegene Goldschicht die Bindungscharakteristik beeinflussen kann und möglicherweise unspezifische Wechselwirkungen begünstigen kann.

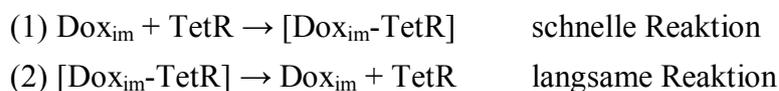
Bei den beiden planaren Oberflächen wirkt sich zudem negativ aus, dass die unspezifische Bindung in unmittelbarer Nähe zur Oberfläche stattfindet. Eine Bindung, die in den ersten 10 nm Abstand zur Metallschicht stattfindet, kann in einem bis zu dreimal größeren Signal führen als dieselbe Bindung in 300 nm Abstand zur Metallschicht. Die geringere unspezifische Bindung des CMDP-Chip gegenüber dem CMTEG-Chip kann dadurch begründet sein, dass Carboxymethyldextran in einer brush-Konformation aufgebracht werden kann, wohingegen CMTEG in einer sogenannten „loop“-Konformation aufgebracht ist, die wesentlich mehr Kontakt der Probenlösung zur Goldoberfläche ermöglicht [199].

Verglichen mit dem CM5- und CMDP-Chip zeigt der HC-Chip die höchste unspezifische Bindung von Rezeptorprotein. Beim CM5-Chip beträgt die unspezifische Bindung <2% der TetR-Bindung, beim CMDP-Chip 20 – 35%. Während bei der Messung auf dem CMDP-Chip eine relativ hohe unspezifische Bindung durch die dünne Schicht beziehungsweise die darunter liegende Alkylthiolschicht oder sogar die Goldschicht des Chips bedingt sein kann, ist dies beim HC-Chip nicht der Fall. Vielmehr ist es nahe liegend, dass hier die Schichtdicke für die unspezifische Bindung ursächlich ist. Beim HC1000m-Chip können die Schichtdicke sowie die Dichte des Hydrogels nachteilig sein. Detektiert wird eine Änderung der Volumenkonzentration

von TetR im Hydrogel, wobei diese auch auftritt, wenn TetR in das Hydrogel diffundiert und nicht an die Derivate bindet. Nach der Injektion des TetR ohne Mg^{2+} sollte das Signal allerdings wieder auf den Wert der Basislinie abfallen, was auf dem HC-Chip nicht beobachtet wurde. Denkbar ist, dass das TetR nach Ende der Injektion durch den Laufpuffer nicht gut aus der Schicht gespült werden kann, weil die Schicht zu dick ist und somit allein durch die veränderte Volumenkonzentration im Hydrogel eine Bindung „vorgetäuscht“ wird. Um dies zu belegen, wurde TetR in An- und Abwesenheit von Mg^{2+} injiziert und nach der Injektion die Dissoziation der TetR-Bindung für eine Stunde aufgezeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Injektion von TetR mit Magnesiumionen das gebundene TetR langsamer dissoziierte als das ohne Magnesiumionen unspezifisch gebundene, was diese These stützt. **TetR zeigte die geringste unspezifische Bindung mit dem CM5-Chip.**

6.1.4.3 Stabilität der Bindung an verschiedenen Chipoberflächen

Neben der Spezifität der TetR-Bindung ist auch die Stabilität eine wichtige Größe für die Charakterisierung des Assays. Die Stabilität wird von zwei Reaktionen beeinflusst, der Bindung und der Dissoziation:



Der Komplex zwischen immobilisiertem Doxycyclin und TetR ist ein Resultat der Reaktion (1) und dissoziiert analog Reaktion (2), in der TetR durch den Laufpuffer kontinuierlich aus der Flusszelle entfernt wird. Sofern Reaktion (2) nicht langsam und reproduzierbar erfolgt, wirkt sich eine instabile TetR-Doxycyclinderivat-Bindung nachteilig auf die Reproduzierbarkeit von Messungen aus. Ausmaß und Geschwindigkeit der Dissoziation wurden daher bestimmt.

Dazu wurde nach einer Injektion von TetR das Signal über eine Stunde lang aufgezeichnet. Dabei wird durch den Laufpuffer (Fluss 5 $\mu\text{l}/\text{min}$) abgelöstes TetR kontinuierlich aus der Flusszelle transportiert. Der Abfall des Signals wird als Dissoziation von TetR aufgezeichnet.

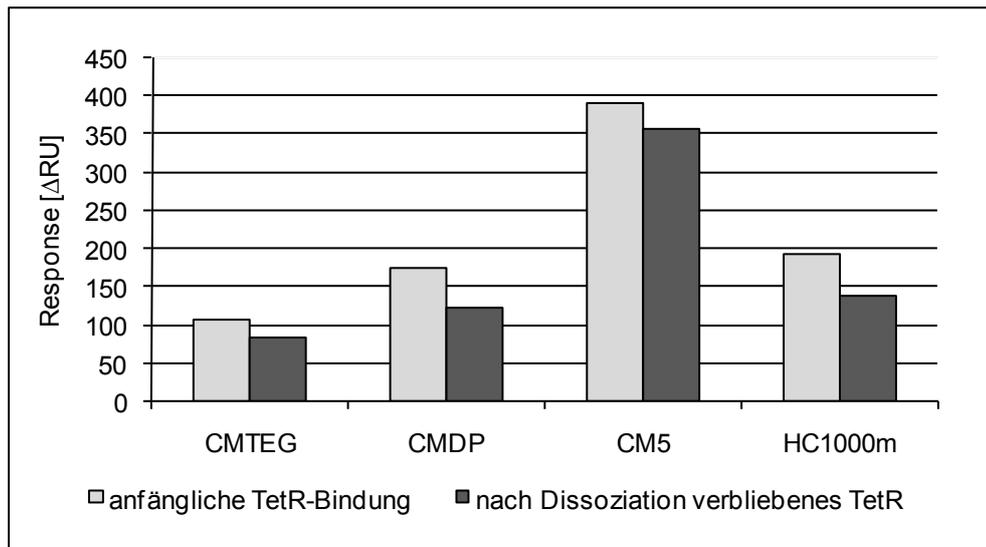


Abbildung 6-8: Dissoziation von TetR innerhalb von 60 Minuten, Vergleich der Ausgangs-TetR-Bindung mit dem nach 60 Minuten noch gebundenen TetR auf verschiedenen Chipoberflächen am Beispiel IU 95

Je nach Chipoberfläche dissoziieren innerhalb einer Stunde zwischen 9 und 30% des gebundenen TetR. Die Bindung von TetR an die Doxycyclinderivate ist auf dem CM5-Chip am stabilsten. Auf allen Chipoberflächen zeigte die Dissoziation einen exponentiell abfallenden Verlauf (Abbildung 6-9).

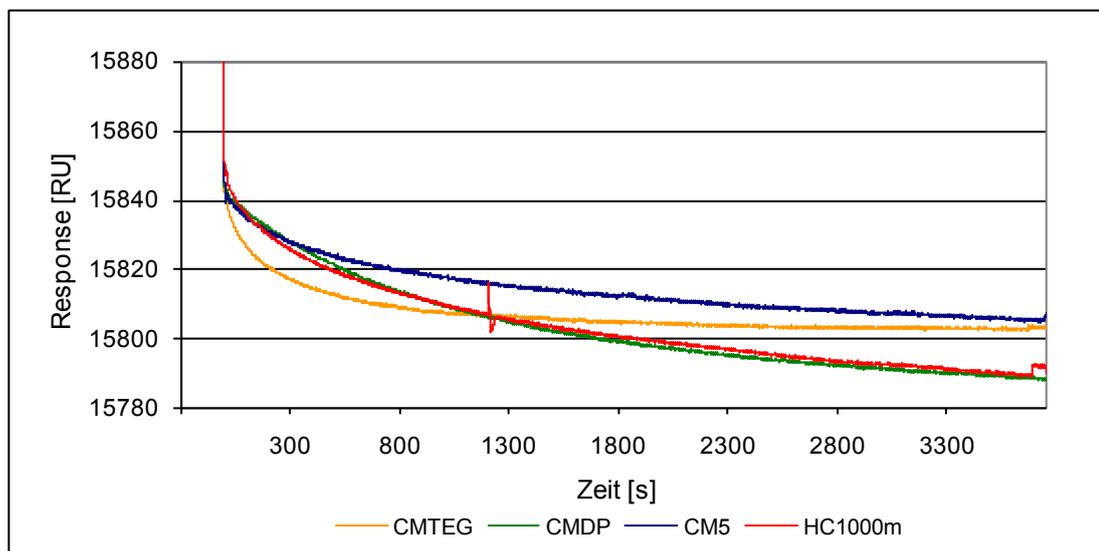


Abbildung 6-9: Signalverlauf für die Dissoziation von TetR auf verschiedenen Chipoberflächen am Beispiel IU 95, Signal normiert auf Level am Ende der TetR-Injektion

Die CM5-Oberfläche erwies sich hinsichtlich der TetR-Bindung als am besten für die Entwicklung eines Assayformates geeignet. Zum einen wurde hier das meiste

TetR gebunden und zum anderen dissoziierte davon am wenigsten im Zeitraum von einer Stunde.

Für die Kinetik der Dissoziation spielen neben der Dicke der Hydrogelschicht auch der Massentransport zwischen Lösung und Gel sowie im Hydrogel, Diffusions- und Verteilungskoeffizienten, sowie die Verteilung des immobilisierten Rezeptors eine wesentliche Rolle [205]. Planare Oberflächen zeigen gegenüber Hydrogelen eine veränderte Kinetik, da Diffusionsprozesse nicht durch Massentransport limitiert sind. Dies mag als Erklärung für die unterschiedlich schnelle Dissoziation desselben Bindungstyps auf verschiedenen Sensorchips dienen [196].

Die Bindung kann trotz Dissoziationsraten von bis zu 30% in 60 Minuten auf allen Chipoberflächen als für das Assayformat hinreichend stabil betrachtet werden, da die Messpunkte 30 sec oder 60 sec nach Ende der Injektion gesetzt werden.

6.1.4.4 Abhängigkeit des Signals von der TetR-Konzentration

Im kompetitiven Assay wird die Konzentration von Tetracyclinen dadurch bestimmt, dass bei Anwesenheit von Tetracyclinen weniger TetR an der Chipoberfläche bindet. Gemessen wird in diesem Fall die Konzentration des TetR, dessen Bindestellen unbesetzt geblieben sind. Die Abhängigkeit des Signals von der eingesetzten TetR-Konzentration sollte daher zunächst ohne Tetracyclin auf den einzelnen Chipoberflächen geprüft werden.

Für die Messungen wurden Rezeptorproteinkonzentrationen von 0,1 bis 3 μM verwendet.

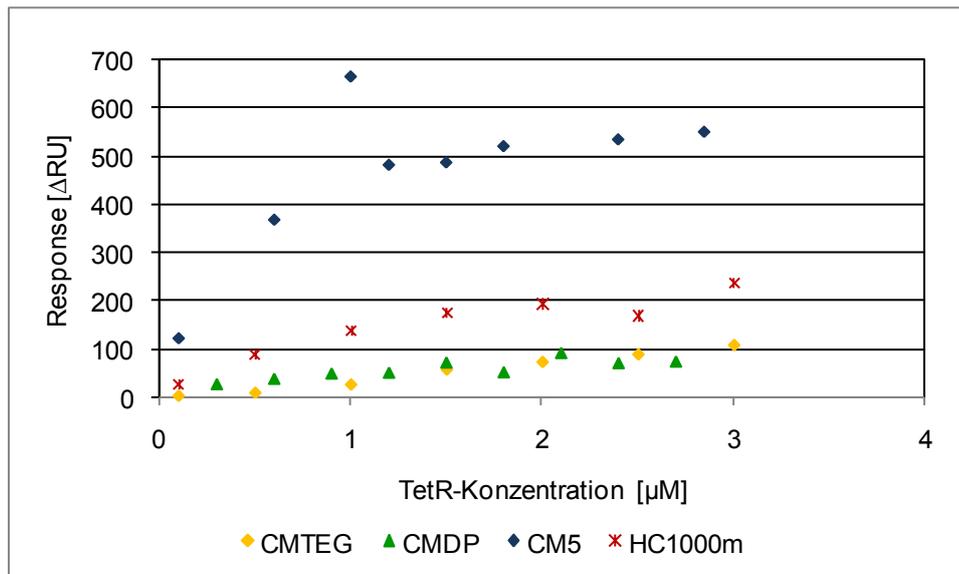


Abbildung 6-10: Signal in Abhängigkeit der TetR-Konzentration auf verschiedenen Chipoberflächen, exemplarisch für IU 91 (Mittelwerte aus zwei Injektionen), Injektionsvolumen 25 μ l bei 5 μ l/min

Auf allen Chipoberflächen war eine Abhängigkeit des Signals von der TetR-Konzentration zu beobachten. Je höher die TetR-Konzentration war, desto mehr TetR wurde gebunden. Ein linearer Zusammenhang zwischen Signal und TetR-Konzentration wurde auf dem CMTEG-Chip und HC1000m-Chip bis etwa 3 μ M TetR beobachtet. Beim CMDP und CM5-Chip dagegen, flachten die Kurven bereits bei etwa 2 μ M ab. Im Vergleich der Sensorchips fällt der CM5-Chip deutlich durch einen hohen Arbeitsbereich auf. Für alle Derivate zeigte er den größten Arbeitsbereich. Im Bereich oberhalb von ca. 2 μ M TetR scheint allerdings eine Sättigung der Oberfläche erreicht zu werden, was das Abflachen der Kurve zeigt. Die planaren Chipoberflächen zeigen einen sehr geringen Arbeitsbereich und sind daher für den Einsatz in diesem Assay ungeeignet.

Für die HC1000m- und CMTEG-Oberfläche – beispielhaft ausgewählt für die Extrema der Schichtdicken und weil auf diesen Oberflächen eine hohe unspezifische Bindung detektiert wurde - wurde geprüft, ob die Abhängigkeit des Signals von der TetR-Konzentration magnesiumabhängig ist. In beiden Fällen war eine Abhängigkeit auch in Abwesenheit von Magnesiumionen gegeben (exemplarisch in Abbildung 6-11 dargestellt).

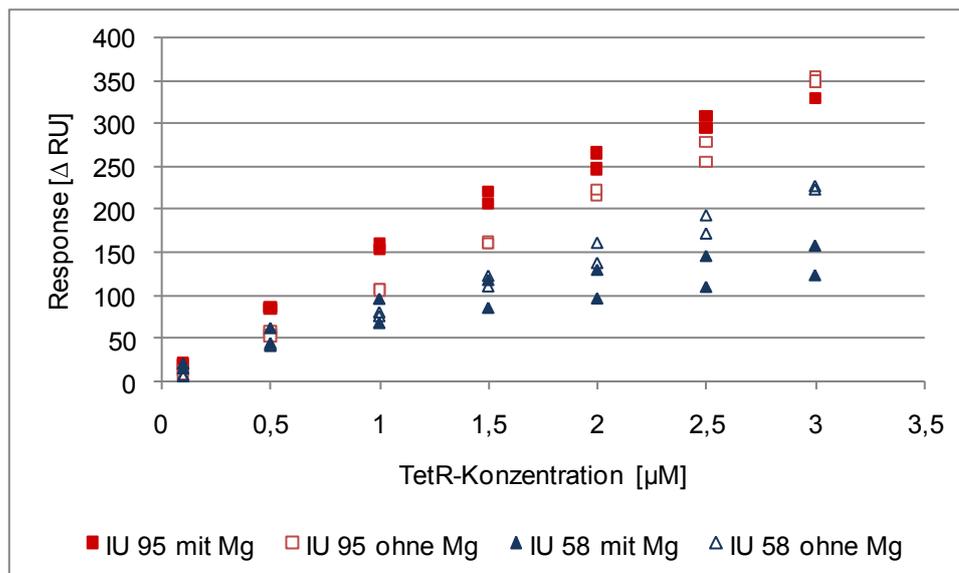


Abbildung 6-11: Abhängigkeit des Signals von der TetR-Konzentration auf HC1000m-Chip in Anwesenheit (ausgefüllte Symbole) und Abwesenheit (nicht gefüllte Symbole) von Magnesiumionen, exemplarisch für IU 95 und IU 58. Injektionsvolumen 25 μ l, Fluss 5 μ l/min

Die unspezifische Bindung zeigte auf beiden Chips eine lineare Abhängigkeit von der TetR-Konzentration. Im Fall von IU 58 wurden für die Injektionen ohne Magnesiumionenzusatz sogar höhere Messwerte erzielt, also eine höhere unspezifische Bindung als die spezifische beobachtet. Die Konzentrationsabhängigkeit der unspezifischen Bindung lässt sich dadurch erklären, dass bei höheren Proteinkonzentrationen auch mehr Protein zur Verfügung steht, das unspezifisch an die Oberfläche binden kann. Bis zu einer TetR-Konzentration von 3 μ M ist die Chipoberfläche nicht gesättigt. Im Gegensatz dazu flachen die Kurven in Abbildung 6-11 bei höheren Konzentrationen ab, was auf eine Sättigung der für spezifische Bindungen zur Verfügung stehenden Oberfläche hindeutet.

6.1.4.5 Injektionsdauer (Kontaktzeit)

Es wurde geprüft, wie sich die Variation der Kontaktzeit (Injektionsdauer) auf die TetR-Bindung auswirkt. Dazu wurde die TetR-Bindung in Abhängigkeit von Flussrate und Kontaktzeit bestimmt. Technisch war es nicht möglich, Kontaktzeit und Flussrate gleichzeitig zu variieren, jeweils ein Parameter von beiden musste konstant gehalten werden.

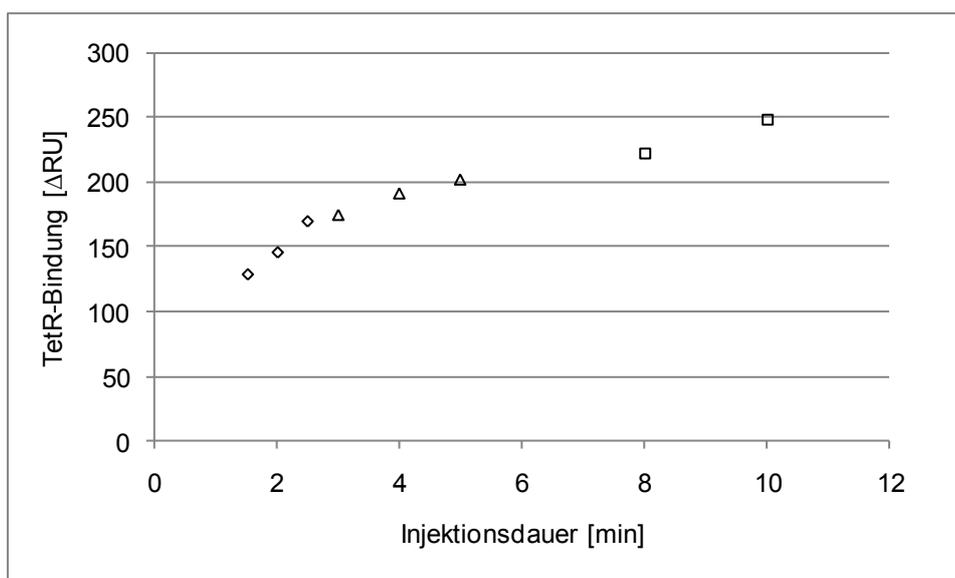


Abbildung 6-12: Injektion von TetR 1 μM , Response aufgetragen gegen Kontaktzeit, CM5-Chip, IU 58 bei Flussraten von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Quadrate), 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Dreiecke) und 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Rauten)

Es besteht eine deutliche Abhängigkeit des Signals von der Kontaktzeit TetR/Derivat. Je länger die Kontaktzeit, desto höher ist der Response (Abbildung 6-13). Dies war zu erwarten, da eine längere Injektionsdauer synonym mit einer längeren Kontaktzeit zur Oberfläche ist, so dass auch die Absolutmenge TetR, die mit der Oberfläche in Kontakt kommt, größer ist. Ein Einfluss der Flussrate ist nicht zu erkennen. Niedrige Flussraten bieten den Vorteil, dass auch bei geringen Injektionsvolumina eine lange Kontaktzeit zwischen Analyt und Oberfläche besteht. Bei sehr niedrigen Flussraten (5 $\mu\text{l}/\text{min}$ ist das Minimum an Fluss, das seitens des Geräteherstellers empfohlen wird) können sich durch die laminare Strömung an der Oberfläche in der Flusszelle Zonen ausbilden, in denen kein oder nur noch ein minimaler Fluss herrscht [206]. Ist dies der Fall, gelangen bei der Injektion die Analytmoleküle nur noch durch Diffusion durch diese „ruhende“

Zone zur Oberfläche. Je geringer die Flussrate ist, desto breiter wird die ruhende Zone [201], so dass bei sehr geringen Flussraten die Diffusion der limitierende Schritt ist.

Aus Abbildung 6-12 geht hervor, dass auch beim Fluss von $5 \mu\text{l}/\text{min}$ der Einfluss der längeren Kontaktdauer den Einfluss von möglichen „ruhenden“ Zonen deutlich überwiegt. Ein weiterer Aspekt, der hier eine Rolle spielen könnte, ist eine schnellere physikalische Ablösung von TetR von der Oberfläche bei schnelleren Flussraten, die hier zu niedrigeren Signalen führen.

Im Experiment, das der folgenden Abbildung zugrunde liegt, wurde die Injektionsdauer bei konstanter Flussrate variiert:

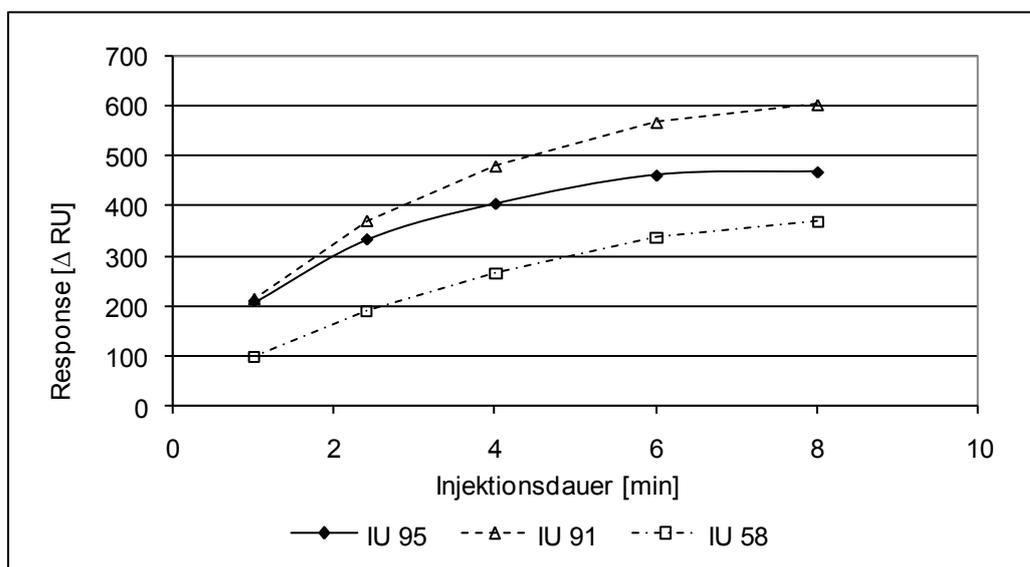


Abbildung 6-13: Response (TetR-Bindung) in Abhängigkeit der Injektionsdauer (Injektionsvolumen), Fluss $5 \mu\text{l}/\text{min}$, CM5-Chip,

Hält man die Flussrate konstant, wird der Einfluss der Injektionsdauer noch deutlicher: Da die Injektionsdauer bei einem konstanten Fluss dem injizierten Volumen proportional ist, werden höhere Signale bei längeren Kontaktzeiten beobachtet, wie Abbildung 6-13 zeigt.

6.1.5 Detektion von Tetracyclinen

6.1.5.1 Konkurrenz von Tetracyclin um die Bindestellen am TetR

Beim kompetitiven Assayformat wird die Konzentration von Tetracyclinen indirekt durch die Bindung nicht mit Tetracyclin gesättigten Rezeptors bestimmt. Die Einflüsse auf die TetR-Bindung, die in 6.1.4 beschrieben wurden, gelten daher auch hier. Hinzu kommt jedoch Tetracyclin als weiterer Faktor. Es wurde geprüft, ob eine Konkurrenz von freiem Tetracyclin in Lösung mit dem fixierten Doxycyclinderivat um die Bindestellen am TetR stattfindet. Für CM5-Chips wurde die Konkurrenz bereits in 6.1.2 beschrieben (siehe Tabelle 6-5 Seite 67).

Für die Messungen wurde TetR mit Tetracyclinlösung gemischt und anschließend über die Sensoroberflächen gegeben. Das erhaltene Signal wurde mit TetR-Reagenzienblanks verglichen, um eine Abnahme der Bindung bei Zugabe von Tetracyclin erkennen zu können.

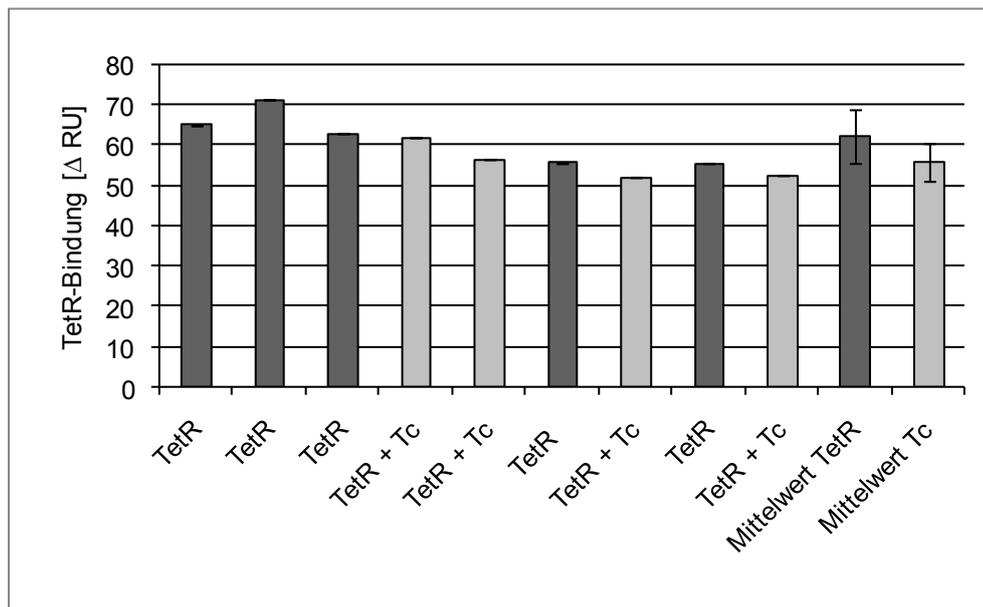


Abbildung 6-14: Injektion von TetR und TetR-Tetracyclin-Mischungen zum Nachweis der Konkurrenz von freiem Tetracyclin mit immobilisierten Doxycyclinderivaten. TetR 1,5 μM, Tetracyclin 5000 ng/ml Messlösung, CMTEG-Chip

Auf dem CMTEG-Chip bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Messlösungen, die Tetracyclin enthalten und denen, die tetracyclinfrei sind (Abbildung 6-14). 5000 ng/ml Tetracyclin konnte nicht von einer Leerprobe unterschieden werden, es fand

keine detektierbare Konkurrenz statt. Die Ergebnisse, die bei der Bestimmung der unspezifischen Bindung von TetR an die CMTEG-Oberfläche erhalten wurden, ließen dies bereits vermuten, da auf dem CMTEG-Chip das Ausmaß von spezifischer und unspezifischer Bindung gleich groß war (Kapitel 6.1.4.2, Seite 81). Dies würde unabhängig von der Tetracyclinkonzentration in der Lösung zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Die CMTEG-Oberfläche ist für die Entwicklung eines kompetitiven Assayformates zum Nachweis von Tetracyclinen nicht geeignet. Auf HC1000m- und CMDP-Chip konnte die Konkurrenz mit Tetracyclin detektiert werden; Abbildung 6-15 zeigt, am Beispiel des HC1000m-Chips, dass in Anwesenheit von Tetracyclin deutlich weniger TetR gebunden wird.

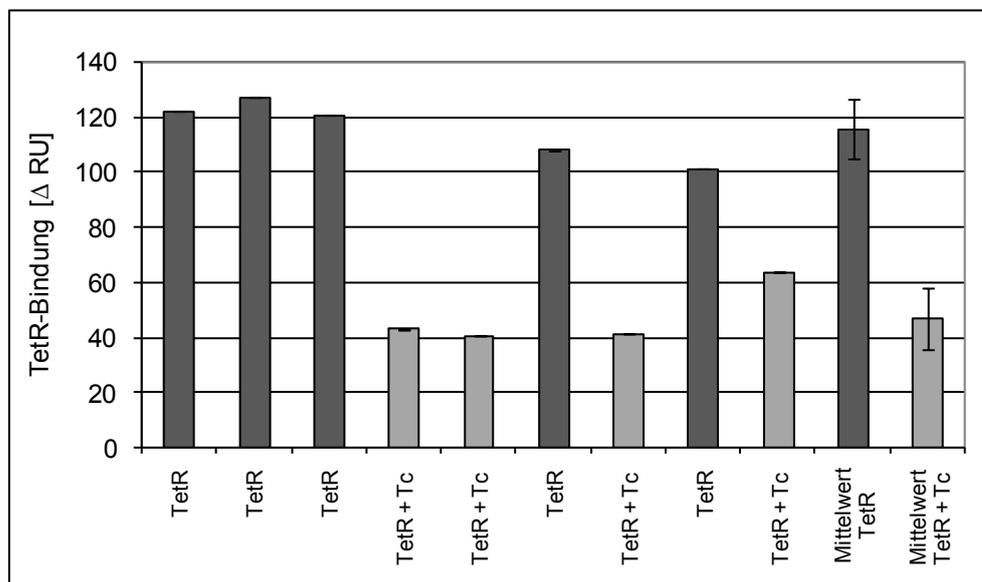


Abbildung 6-15: TetR-Bindung in An- und Abwesenheit von Tetracyclin; exemplarisch für IU 91, TetR 1,5 μ M, Tetracyclin 5000 ng/ml in der Messlösung, HC 1000m-Chip

Um zu prüfen, ob es sich um einen spezifischen Effekt handelt, wurde die Messung ohne Magnesiumsulfat im Laufpuffer wiederholt.

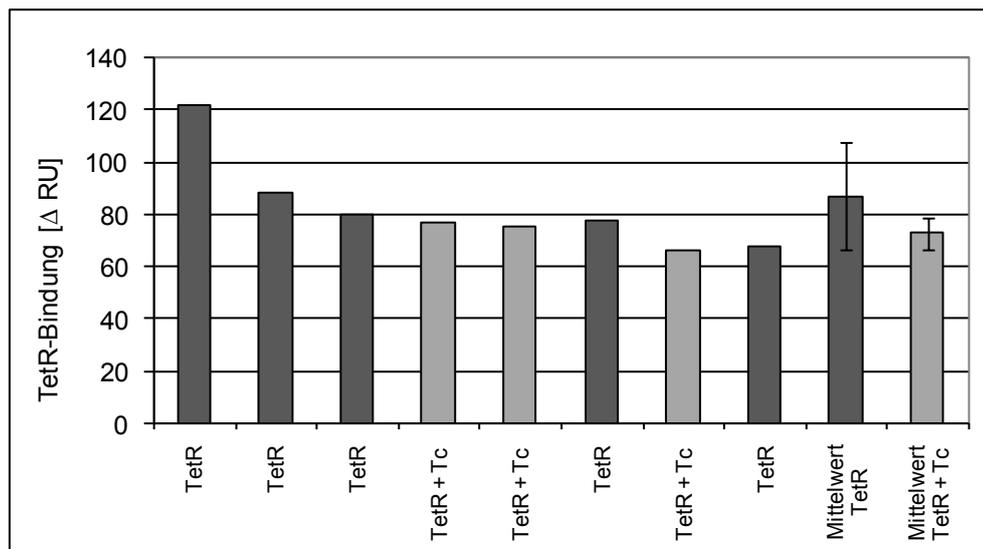


Abbildung 6-16: TetR-Bindung in An- und Abwesenheit von Tetracyclin ohne Mg^{2+} ; exemplarisch für IU 91, TetR 1,5 μM , Tetracyclin 5000 ng/ml in der Messlösung, HC 1000m-Chip

Zwischen Lösungen mit und ohne Tetracyclin bestand kein signifikanter Unterschied in der Höhe des erhaltenen Signals (Abbildung 6-16). Die Konkurrenz von freiem Tetracyclin ist erwartungsgemäß magnesiumabhängig und auf allen Chips mit Ausnahme des CMTEG-Chips vorhanden.

6.1.5.2 Konzentrationsabhängigkeit

Der Assay soll im optimalen Fall neben einer qualitativen Aussage (Tetracyclin vorhanden / nicht vorhanden) auch eine quantitative Aussage ermöglichen. Für CM5-Chips wurde die Konzentrationsabhängigkeit bereits in 6.1.2 beschrieben (siehe auch Abbildung 6-19). Auf dem HC1000m und CMDP-Chip wurde das Signal der TetR-Bindung in Abhängigkeit von der Tetracyclinkonzentration aufgezeichnet (Abbildung 6-17 und Abbildung 6-18).

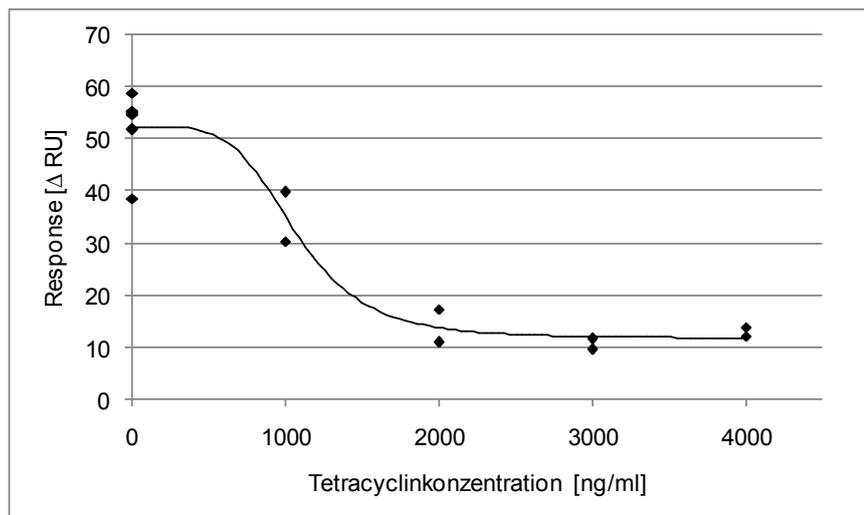


Abbildung 6-17: Abhängigkeit der TetR-Bindung von der Tetracyclinkonzentration auf CMDP-Oberfläche, exemplarisch für IU 95, Flusszelle 1, TetR 1,5 μ M

Auf dem CMDP-Chip zeigte sich eine Abhängigkeit des Signals von der Tetracyclinkonzentration, wobei der Arbeitsbereich (Tetracyclinkonzentration 500 – 1500 ng/ml) mit einer Differenz von ca. 100 RU klein war (Abbildung 6-17). Dies deckt sich mit den Ergebnissen, die bei der Untersuchung der TetR-Bindung in Abhängigkeit der TetR-Konzentration ohne Tetracyclin erhalten wurden, auch hier wurde ein geringer Arbeitsbereich festgestellt (siehe 6.1.4.4). Betrachtet man zudem die Streuung der Messwerte um 0 ng/ml Tetracyclin, wird deutlich, dass diese bereits ca. 20 RU umfasst. Die Streuung der weiteren Messpunkte war zwar geringer, aber auch hier wurde eine verhältnismäßig hohe Unpräzision festgestellt.

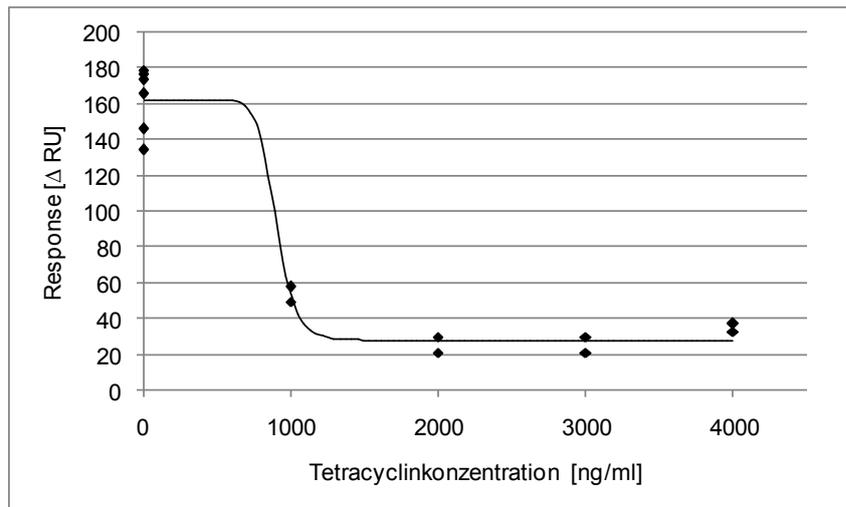


Abbildung 6-18: Konzentrationsabhängigkeit der TetR-Bindung von der Tetracyclinkonzentration, Injektionsdauer 5 min bei 5 μ l/min, TetR 1,5 μ M; HC1000m-Chip, IU 95, Flusszelle 1

Für den HC1000m-Chip zeigt Abbildung 6-18, dass im Bereich bis 2000 ng/ml Tetracyclin Konkurrenz stattfindet (Abnahme des Signals bei höheren Tetracyclinkonzentrationen). Im Bereich oberhalb von 2000 ng/ml Tetracyclin zeigte sich in mehreren Messungen ein geringer Anstieg des Signals.

Bei zunehmender Tetracyclin-Konzentration sollte weniger Rezeptorprotein gebunden werden bis hin zu dem Punkt, an dem alle Bindestellen des Rezeptors mit Analyt aus der Probenlösung gesättigt sind und kein Rezeptor mehr an die Oberfläche bindet. TetR bindet – wie in 6.1.4.2 gezeigt – in nicht unerheblichem Maße unspezifisch an die Oberfläche. Daher war nicht zu erwarten, dass bei hohen Tetracyclinkonzentrationen kein Rezeptor bindet, sondern vielmehr, dass oberhalb der Tetracyclinkonzentration, bei der alle Bindestellen des TetR besetzt sind, TetR nur unspezifisch an die Oberfläche gebunden wird; bei konstanter TetR-Konzentration sollte die unspezifische Bindung ebenfalls konstant sein.

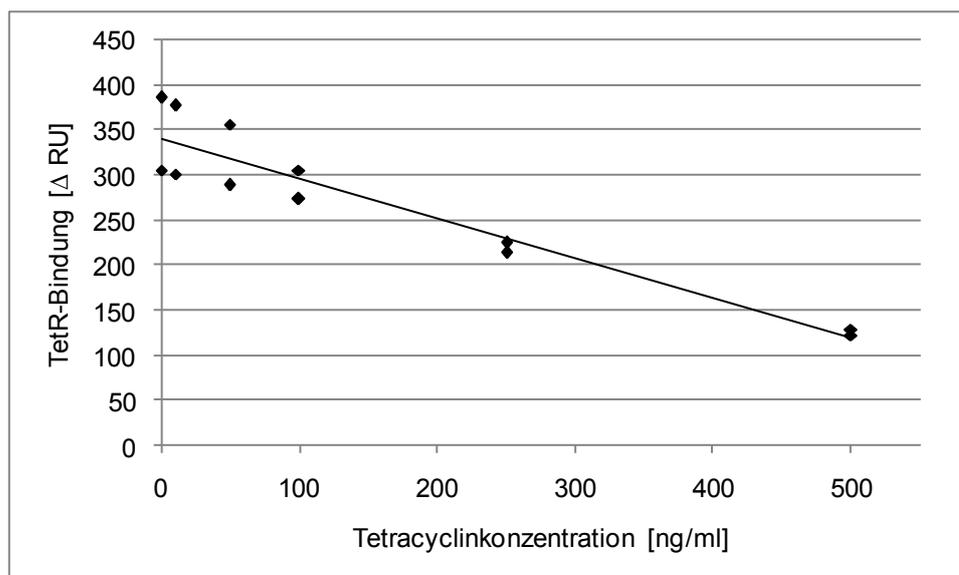


Abbildung 6-19: Abhängigkeit der TetR-Bindung von der Tetracyclinkonzentration, TetR 1 μ M; CM5-Chip, exemplarisch für IU 58, Injektionsdauer 5 min bei 5 μ l/min

Die Kalibrierkurven, die auf dem CM5-Chip erhalten wurden, zeigten gegenüber den auf HC1000m- und CMDP-Oberfläche bestimmten einen Arbeitsbereich von >200 RU bei Konzentrationen von 0 – 500 ng/ml (Abbildung 6-19). Bei 500 ng/ml Tetracyclin war die maximale Hemmung noch nicht erreicht, da bei dieser Konzentration an allen Derivaten noch TetR gebunden wurde. Der Arbeitsbereich kann demnach zu höheren Tetracyclin-Konzentrationen hin noch erweitert werden, ist aber naturgemäß durch die maximale TetR-Bindung in Abwesenheit von Tetracyclin limitiert. Die Ausweitung des Messbereiches wurde nicht angestrebt, da der Assay im optimalen Fall eine zuverlässige Ja/Nein-Entscheidung bei niedrigen Tetracyclinkonzentrationen liefern soll. Beim Vergleich von Kalibrierkurven auf den mit verschiedenen Derivaten belegten Flusszellen eines Sensorchips zeigte sich, dass sich der geringere Immobilisierungslevel von IU 58 im Arbeitsbereich der Kalibrierkurve niederschlug. Für die beiden Derivate mit längeren Spacern wurden Kalibrierkurven mit einem größeren Arbeitsbereich als dem von IU 58 erhalten.

Auf allen Sensoroberflächen zeigte sich eine relativ große Streuung der Messwerte (Abbildung 6-17, Abbildung 6-18 und Abbildung 6-19). Es handelte sich hierbei nicht um eine zufällige Streuung, sondern um eine geringere TetR-Bindung bei der zweiten Injektion einer Probe in einer Mehrfachmessung, die für alle Derivate beobachtet wurde. Dieses Phänomen wird in Abschnitt 6.1.8 diskutiert.

Aufgrund der hohen Unpräzision und der geringen Empfindlichkeit (geringe Differenz zwischen den Signalen am höchstem und niedrigsten Messpunkt) und nicht zuletzt aufgrund der hohen unspezifischen Bindung des Rezeptorproteins ist es nicht möglich, CMDP- oder HC1000m-Chips in diesem System für den Nachweis von Tetracyclintrückständen einzusetzen.

6.1.5.3 Inkubationsdauer TetR- Tetracyclin

Es wurde geprüft, ob die Inkubationsdauer von TetR mit Tetracyclinlösungen vor der Injektion in die Flusszelle die TetR-Bindung beeinflusst. TetR- und Tetracyclinlösung wurden manuell gemischt und nach einer definierten Inkubationsdauer (Inkubation bei Raumtemperatur) injiziert. Im Gerät sind der Injektion noch diverse Spülschritte vorgeschaltet, so dass sich die Inkubationsdauer um 2 Minuten verlängert und die angegebenen Inkubationszeiten resultieren.

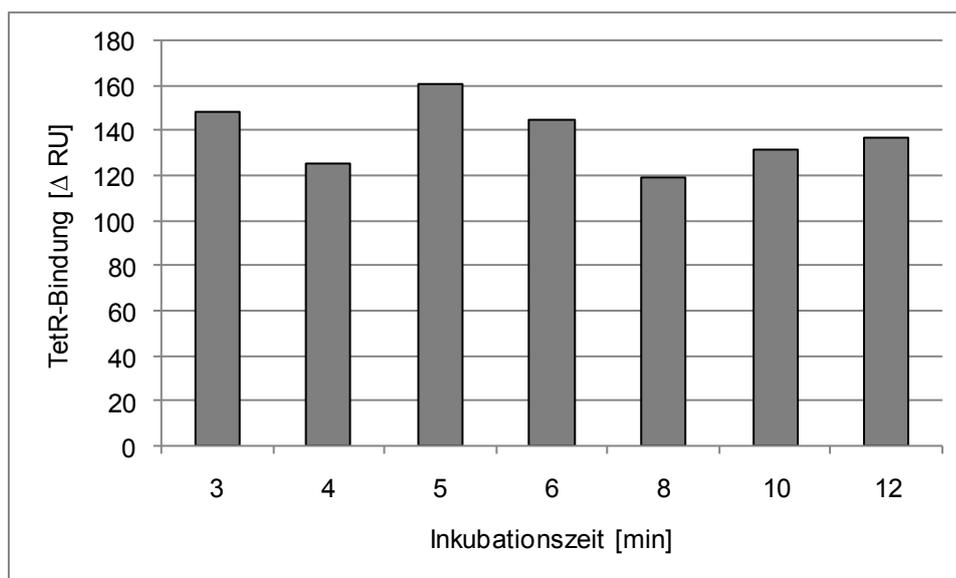


Abbildung 6-20: Abhängigkeit der Bindung von TetR von der Inkubationszeit mit Tetracyclinlösung; TetR 1 μ M, Tetracyclin 500 ng/ml; IU 95, CM5-Chip

Die erhaltenen Signale lagen innerhalb der Unpräzision, die für dieses System beobachtet wurde. Es ist kein Trend hinsichtlich einer optimalen Inkubationsdauer zu erkennen (Abbildung 6-20). Das lässt darauf schließen, dass die Zeit, die das Gerät zum Mischen der Proben und für das Spülen vor der Injektion aufbringt, für die Reaktion ausreicht. Die Bindung von Tetracyclin an TetR verläuft schnell, was sich auch an der Herkunft des TetR als bakterielles Resistenzprotein erklären lässt. In die Bakterienzelle eindringendes Tetracyclin muss von TetR gebunden werden, bevor es an sein Target in

der Zelle (Ribosom) gelangt. Handelte es sich um eine langsame Reaktion, würde Tetracyclin zum Ribosom gelangen und dort die Proteinbiosynthese stoppen und es würde keine Resistenz des Bakteriums vorliegen.

6.1.6 Regeneration der Oberfläche

Bei jedem Messzyklus wird Rezeptor an der Oberfläche gebunden, der vor der folgenden Messung wieder entfernt werden muss. Die Oberfläche muss „regeneriert“ werden. Erfolgt keine Regeneration oder ist diese nur unvollständig, kumuliert Rezeptorprotein an der Oberfläche, so dass bei späteren Messzyklen weniger freie Bindungsstellen für TetR verfügbar sind. Dies wirkt sich negativ auf die Reproduzierbarkeit von Messungen aus. Verschiedene Regenerationsreagenzien wurden für alle Oberflächen systematisch getestet.

6.1.6.1 Reagenzien

Der systematische Test von Regenerationslösungen nach Andersson [207] basiert auf der Annahme, dass verschiedene Wechselwirkungen zu einer Bindung von Protein an die Oberfläche führen. Neben ionischen Wechselwirkungen durch verschiedene Ladungen können unpolare Wechselwirkungen zu einer Bindung führen oder Wechselwirkungen auftreten, die durch saure oder basische Bedingungen begünstigt werden. In einem Schema von Andersson werden Lösungen mit verschiedenen Eigenschaften kombiniert, so dass sehr unterschiedliche Bedingungen für die Regeneration geschaffen werden. Im Wesentlichen werden zur Charakterisierung der Regenerationsreagenzien die folgenden Attribute verwendet:

- Ionisch (I)
- Unpolar (U)
- Chelatbildner (C)
- Detergenzien (D)
- Saures Regenerationsreagenz (A)
- Basisches Regenerationsreagenz (B)
- SDS

Die Lösungen werden nach folgendem Schema gemischt, wobei w jeweils für einen wässrigen Teil steht:

Iww	IDw	ICw
Uww	UDw	UCw
Dww	DCw	
Cww		

Saure und basische Regenerationsreagenzien wurden zunächst nicht getestet, da eine Epimerisierung oder ein Abbau der Derivate an der Oberfläche unter sauren oder basischen Bedingungen zu erwarten gewesen wäre [11] und dies vermieden werden sollte. Die Kombination IUw konnte nicht getestet werden, da sie eine aggressive Mischung ist, die die Chipoberfläche angreifen kann.

SDS ist als Regenerationslösung nicht im Schema enthalten, wurde aber, da bereits von Möller erfolgreich für die Ablösung von TetR eingesetzt, ebenfalls getestet [188]. Für den Test wurden jeweils 5 Injektionen von TetR mit anschließender Regeneration mit einer der Kombinationen vorgenommen und das Verhalten von Basislinie und erneuter TetR-Bindung beobachtet.

6.1.6.2 Regeneration der verschiedenen Chipoberflächen

Es wurde geprüft, mit welchen Reagenzien sich die verschiedenen Chipoberflächen am besten regenerieren lassen, indem die von Andersson vorgeschlagenen Reagenzien in fünf aufeinanderfolgenden Zyklen als Regenerationsreagenzien verwendet wurden. Das Verhalten von Basislinie und TetR-Bindung innerhalb der 5 Zyklen wurde unter den verschiedenen Chipoberflächen verglichen (Tabelle 6-11).

Tabelle 6-11: Schematische Darstellung des Verhaltens von Basislinie / TetR-Bindung in fünf aufeinanderfolgenden Messzyklen auf verschiedenen Chipoberflächen; Symbole: ↑ = steigend, ↓ = fallend, ↔ = bleibt unverändert

Regenerationslösung	HC 1000m	CM5	CMTEG	CMDP
Cww	↑/↓	↑/↓	↑/↓	↑/↓
Iww	↑/↓	↑/↓	↔↑/↔↑↓	↑/↓
Dww	↑/↓	↑/↓	↑/↓	↑/↓
Uww	↑/↔↑	↓/↑	↑/↔↑	↑/↑↔
ICw	↔/↔	↓/↑	↔/↔↑	↔/↑
IDw	↑/↓	↑/↓	↔/↔	↑/↓
DCw	↑/↓	↑/↓	↑/↓	↑/↓
UDw	↑/↓	↑/↑	↑/↔	↑/↑↔
UCw	↑/↓	↑/↔	↑/↔	↑/↓
SDS	↓/↔	↔/↔	↔/↔	↑/↔

Bei den meisten Regenerationsreagenzien wurde auf den verschiedenen Oberflächen eine unvollständige Regeneration beobachtet (Anstieg der Basislinie einhergehend mit abnehmender TetR-Bindung im Verlauf mehrerer Messzyklen), oder sogar die Bindung von Komponenten aus der Regenerationslösung, beispielsweise bei den Lösungen, die unpolare Reagenzien enthielten. Für die Regeneration der Oberflächen kamen nur SDS und ICw, auf dem CMTEG-Chip zusätzlich IDw und Iww in eine engere Auswahl.

Vergleich des Regenerationsverhaltens auf den einzelnen Chipoberflächen

Spezifisch gebundenes TetR sollte sich auf allen Oberflächen mit denselben Reagenzien ablösen lassen, da es sich auf allen Oberflächen um denselben Bindungstyp handelt. Die unspezifische Bindung von TetR, die auf den verschiedenen Oberflächen verschieden stark auftritt, könnte aufgrund der verschiedenen Chipeigenschaften jedoch auf unterschiedliche Bindungsarten zurückzuführen sein, und damit auch Unterschiede im Regenerationsverhalten zeigen. Aus Tabelle 6-11 wird jedoch ersichtlich, dass das Regenerationsverhalten auf allen Chipoberflächen recht ähnlich war. Es war jedoch nicht möglich, zu unterscheiden, ob das während der Regeneration abgelöste TetR

spezifisch oder unspezifisch gebunden war, so dass sich keine weiteren Aussagen treffen lassen, inwieweit einzelne Regenerationsreagenzien für bestimmte Oberflächen besonders geeignet sind.

Vergleich der Reagenzien SDS und ICw

Auffällig ist, dass neben der Regeneration mit SDS lediglich bei der Regeneration mit einer Kombination aus Ionisch/Chelatbildner in den Messungen eine relativ stabile Basislinie kombiniert mit höheren TetR-Bindungen erhalten wurde. Interessant ist diese Kombination aus zweierlei Gründen: Es ist bekannt, dass für die Bindung TetR-Tetracyclin zweiwertige Metallkationen benötigt werden, da Tetracycline als Metallkomplex an TetR binden [86]. Demnach wäre zu erwarten, dass die TetR-Bindung durch die Chelatisierung von Magnesiumionen mit EDTA (Cww) regeneriert werden kann, was aber offensichtlich nicht der Fall ist. Es ist denkbar, dass durch die Abschirmung des Magnesiums in der Bindetasche des TetR, EDTA das bereits gebundene Tetracyclin nicht durch Komplexieren des Magnesiums lösen kann.

Hohe Ionenstärken beeinflussen die Faltung und Tertiärstruktur eines Proteins. Es ist also vorstellbar, dass die hohe Ionenstärke zu einer partiellen „Auffaltung“ des TetR führt, welche die Bindetasche mit dem Tetracyclinkomplex so positioniert, dass das Magnesium für EDTA wieder zugänglich ist, so dass die Bindung gelöst werden kann.

Gegen diese Theorie spricht allerdings, dass die Mischung ICw 0,6 mol/l Magnesiumchloridhexahydrat enthält, hingegen nur 6,7 mmol/l EDTA, so dass der Theorie nach das enthaltene Magnesium alle komplexierenden Stellen des EDTA besetzt und somit die komplexierende Wirkung in der Regenerationslösung nicht mehr „aktiv“ sein dürfte.

Eine weitere Erklärung für die Regeneration mit ICw könnte der pH-Wert dieser Lösung von pH-Wert von 4,1 sein. Durch diesen niedrigen pH-Wert kann sich die Ladungsverteilung auf der Oberfläche und auch am TetR sowie am immobilisierten Derivat ändern, auch auf diesem Effekt könnte die Regeneration beruhen. Für CM5-Chips wurde daher auch die saure Regenerationslösung nach Andersson getestet (pH). Allerdings konnte hier keine vollständige Regeneration erzielt werden, so dass nicht allein der niedrige pH-Wert der Lösung für die Regeneration verantwortlich sein kann.

Einfluss der Regeneration mit ICw auf die Bindung von TetR in folgenden Zyklen

Bei der Regeneration mit ICw wurde bei mehreren Chiptypen beobachtet, dass die Regenerationslösung den Assay über die Regeneration der Oberfläche hinaus beeinflusst. Beispielsweise wurde auf CMTEG- und CMDP-Chip im direkten Vergleich von Regeneration mit SDS und ICw bei relativ konstanter Basislinie jeweils eine ansteigende und signifikant höhere TetR-Bindung nach der Regeneration mit ICw erhalten. Bei CM5 und HC1000m-Chip trat dieses Verhalten nicht auf.

Offenbar wurde bei den planaren Sensorchips die Chipoberfläche durch die Regeneration mit ICw so aktiviert, dass im nächsten Zyklus mehr TetR gebunden werden kann. Auffallend ist, dass damit in aller Regel ein Anstieg der Basislinie einhergeht, der sich durch die Akkumulation von TetR auf der Chipoberfläche erklärt. In diesem Fall wird allerdings erwartet, dass weniger TetR an die Oberfläche binden kann, da schon Bindestellen besetzt sind. Möglich ist allerdings, dass durch die Aktivierung mit ionischer Regenerationslösung aufgrund einer veränderten Ladungsverteilung an der Oberfläche in den darauffolgenden Zyklen mehr TetR unspezifisch gebunden wird. Da ein großer Teil unspezifischer Bindung durch ionische Wechselwirkung hervorgerufen wird, kann - sofern die Chipoberfläche und das bindende Protein geladen sind - das Ausmaß der elektrostatischen Wechselwirkung durch Änderung der Ionenstärke beeinflusst werden. Eine hohe Ionenkonzentration schirmt die geladenen Gruppen ab und hat einen vom pH-Wert unabhängigen Abstoßungseffekt auf hydrophile und geladene Immobilisierungsmatrices, weil die Bildung von Ionenpaaren die Ladungen neutralisiert [201]. Möglicherweise führt der Abstoßungseffekt zu einer „Aktivierung“ der Oberfläche. Es wäre jedoch zu erwarten, dass dieser Effekt bei dreidimensionalen Sensorchips stärker auftritt, da bei planaren Oberflächen aufgrund der geringen Schichtdicke eine Quellung der Immobilisierungsmatrix durch Abstoßung nicht zu erwarten ist. Da der Effekt jedoch insbesondere bei den zweidimensionalen Chips auftrat, muss auch in Betracht gezogen werden, dass die geringe Schichtdicke oder gegebenenfalls die unter der Schicht befindliche Alkylthiol - oder sogar die Goldschicht - durch das Regenerationsreagenz so verändert werden kann, dass in den darauffolgenden Zyklen mehr Protein unspezifisch gebunden werden kann.

Vor- und Nachteile der Regeneration mit SDS

Durch die Injektion von SDS wird wahrscheinlich eine Denaturierung von TetR und somit eine Ablösung von der Chipoberfläche bewirkt. Die Regeneration mit SDS bot den Vorteil gegenüber ICw, dass das in vorangehenden Zyklen auf der Oberfläche kumulierte TetR zu einem großen Teil wieder abgelöst werden konnte. Bei der Regeneration mit SDS auf CM5-Chips besteht der Nachteil, dass es sich in Dextranoberflächen einlagert und erst langsam wieder ausgewaschen wird, was eine längere Stabilisierungsdauer nach der Regeneration erforderlich macht oder eine Injektion von Puffer, um das SDS aus der Oberfläche schneller auszuwaschen. Das Signal zeigt typischerweise nach der Injektion von SDS einen Abfall unter die Basislinie und darauf folgend einen langsamen Anstieg des Signals bis zum Level der Basislinie (Abbildung 6-21).

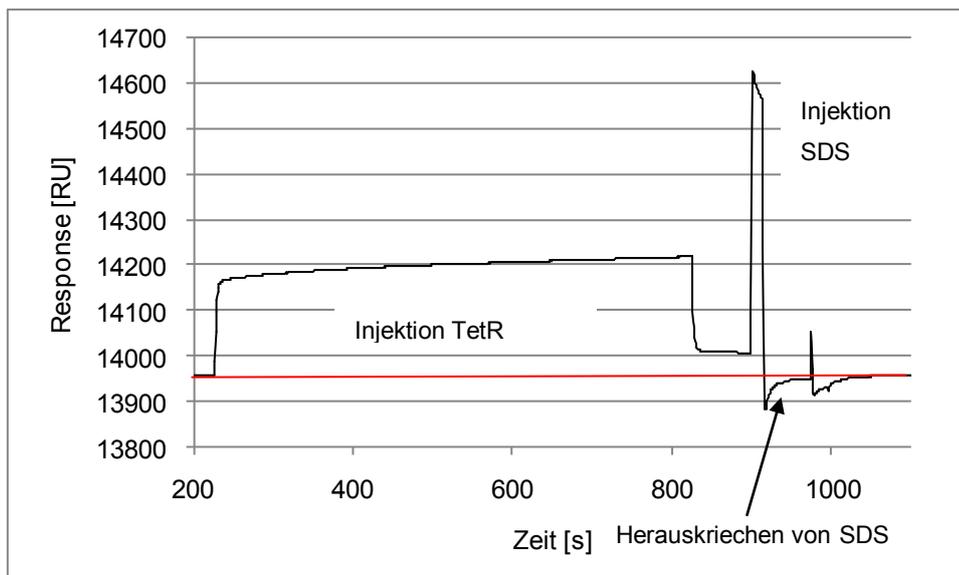


Abbildung 6-21: Regeneration der Chipoberfläche mit SDS nach der Injektion von TetR; "Herauskriechen" des in die Carboxymethyldextranmatrix eingelagerten SDS auf einem CM5-Chip, rote Linie: Niveau der Basislinie zu Beginn des Messzyklus, das nach der Regeneration mit SDS wieder erreicht wird

Das langsame „Herauskriechen“ von in die Dextranschicht eingelagertem SDS wurde nur auf Chips der Typen CM5 und CMTEG beobachtet.

Abschließend lässt sich herausstellen, dass **lediglich auf dem CM5-Chip die Chipoberfläche unproblematisch mit SDS** (0,2% in Laufpuffer, 5 μ l bei 20 μ l/min) **regeneriert** werden konnte. Auf allen anderen Chips reichten auch höhere SDS-Konzentrationen und deutlich längere Kontaktzeiten (0,5% SDS, 90 sec) nicht für eine

vollständige Regeneration aus. Die Regenerationslösungen nach Andersson erwiesen sich als unzureichend.

6.1.7 Optimierung des Assays für CM5-Chips

Nach der Charakterisierung des Assayformates hinsichtlich der Einflussgrößen auf Immobilisierung, TetR-Bindung, Konkurrenz mit Tetracyclinen und Regeneration sollte das Assayformat unter den besten ermittelten Bedingungen weiter charakterisiert sowie im Hinblick auf die Untersuchung von Lebensmitteln und auf die Empfindlichkeit optimiert werden.

6.1.7.1 Auswahl der Chipoberfläche für die Optimierung

Aus den Kapiteln 6.1.4.2 und 6.1.5 wird deutlich, dass einzig die CM5-Oberfläche geeignet ist für eine Optimierung des Assayformates. Die anderen Oberflächen zeigten eine hohe unspezifische Wechselwirkung beziehungsweise nur geringer Arbeitsbereiche bei der Kalibrierung und schlechte Regenerationseigenschaften. Auf dem CM5-Chip wurde die höchste spezifische Bindung von TetR an die Doxycyclinderivate gemessen, die Stabilität der TetR-Bindung war hier ebenfalls am höchsten. Abbildung 6-23 zeigt im Vergleich zu Abbildung 6-17 und Abbildung 6-18, dass auf CM5-Chips wesentlich geringere Tetracyclinkonzentrationen erfasst werden können als auf CMDP- oder HC1000m-Chip, auch aus diesem Grund erwies sich der CM5-Chip von den getesteten Chips als beste Oberfläche. Im Folgenden wurde das Assayformat auf CM5-Chips weiter charakterisiert.

6.1.7.2 Abhängigkeit des Immobilisierungslevels von der Derivatkonzentration

Der Immobilisierungslevel auf CM5-Chips wurde in Abhängigkeit der Derivatkonzentration untersucht. Dazu wurden am Beispiel des Derivates IU 58 verschieden stark konzentrierte Lösungen des Derivates (0,1 bis 1 mg/ml) zur Immobilisierung von CM5-Chips verwendet.

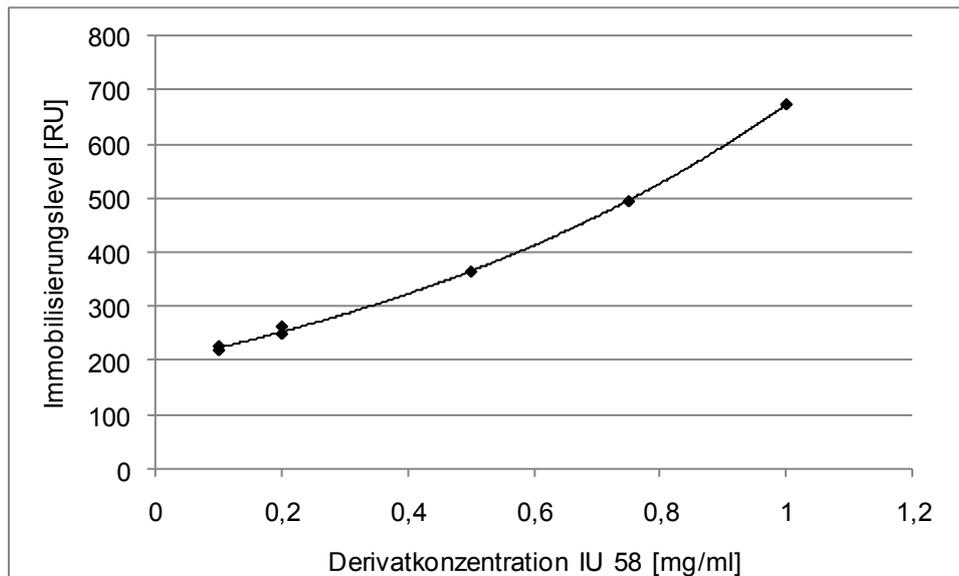


Abbildung 6-22: Abhängigkeit des Immobilisierungslevels von der Konzentration IU 58, Immobilisierung bei pH 7,4; CM5-Oberfläche, aktiviert mit EDC/NHS (35 µl; Fluss 5 ml/min), Injektionsvolumen Derivatlösung 150 µl bei 5 µl/min

Es bestand im untersuchten Bereich eine Abhängigkeit des Immobilisierungslevels von der Derivatkonzentration; je höher die Konzentration, desto mehr Derivat wurde immobilisiert. Wie bereits in 6.1.3.3 gezeigt, ist der Immobilisierungslevel ohne die dazugehörige TetR-Bindung wenig aussagekräftig. Im Folgeexperiment wurde daher die TetR-Bindung an die frisch immobilisierten Oberflächen bestimmt (Tabelle 6-12).

Tabelle 6-12: Gegenüberstellung von Derivatkonzentration (IU 58), Immobilisierungslevel und TetR-Bindung, CM5-Chip

Konzentration IU 58 [mg/ml]	Immobilisierungslevel [Δ RU]	TetR-Bindung 1,0 µM [Δ RU]
0,1	227	33
0,1	220	17
0,2	251	90
0,2	264	187
0,5	365	959
0,75	495	999
1,0	674	997

Wie Tabelle 6-12 zeigt, änderte sich bei Konzentrationen über 0,5 mg/ml zwar der Immobilisierungslevel, die TetR-Bindung hingegen nahm nicht wesentlich zu. Durch die Erhöhung der Derivatkonzentration konnte kein Gewinn hinsichtlich der TetR-Bindung erreicht werden. Dieses Phänomen ist dadurch zu erklären, dass oberhalb von 0,5 mg/ml Derivat mehr Derivat immobilisiert wird, aber bereits bei 0,5 mg/ml die Dichte des immobilisierten Derivates in der Hydrogelmatrix so hoch ist, dass zusätzlich immobilisierte Derivatmengen sterisch nicht für das Rezeptorprotein zugänglich ist.

Die Derivatkonzentration von 0,5 mg/ml ist ausreichend für eine maximale TetR-Bindung.

6.1.7.3 Untersuchung der Empfindlichkeit in Abhängigkeit der TetR-Konzentration

Bei einem indirekt-kompetitiven Assay ist die Konzentration des Bindungspartners, um dessen Bindungsstellen Analyt und oberflächenfixierter Analyt konkurrieren, kritisch für die Empfindlichkeit des Assays.

Es wurden Kalibrierkurven bei unterschiedlichen TetR-Konzentrationen (0,6 und 1 μM) aufgenommen, um eine TetR-Konzentration zu ermitteln, bei der eine gute Empfindlichkeit bei einem ausreichend großen Arbeitsbereich erzielt wird.

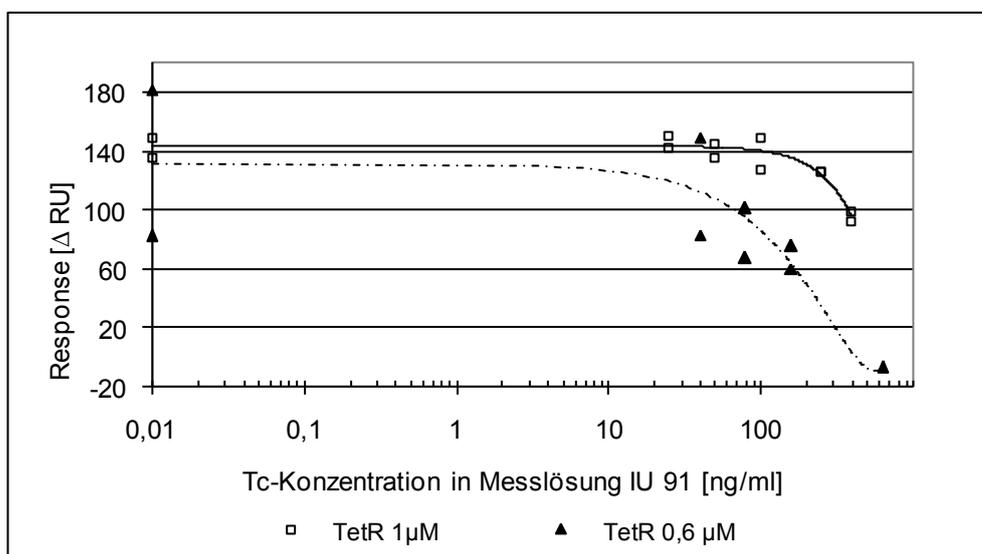


Abbildung 6-23: Kalibrierkurven bei TetR = 0,6 und 1 μM , CM5-Chip, IU 91

Die Kalibrierkurve, die mit 0,6 μM TetR aufgenommen wurde, zeigte einen größeren Arbeitsbereich als die Kalibrierkurve mit 1 μM TetR, obwohl die absolute TetR-Konzentration in der Messlösung geringer war (Abbildung 6-23). Bei der Messreihe mit

0,6 μM TetR wird – wie erwartet – bei geringeren Tetracyclinkonzentrationen bereits weniger TetR gebunden als in der Messreihe mit 1 μM TetR bei der vergleichbaren Konzentration. Allerdings wurde eine höhere Unpräzision der Messwerte beobachtet. Wird wenig TetR angeboten, reichen geringe Tetracyclinmengen zur Absättigung von TetR, somit wird schon bei geringen Tetracyclinkonzentrationen wenig TetR an die Oberfläche gebunden. Besteht ein großes Angebot an Rezeptorprotein, ist eine hohe Tetracyclinkonzentration erforderlich, damit eine Änderung der TetR-Bindung detektiert werden kann. **Die Empfindlichkeit des Assays kann demnach durch die angebotene TetR-Konzentration beeinflusst werden.**

Eine Steigerung der Empfindlichkeit durch Einsatz geringerer TetR-Konzentrationen ist durch die Verringerung des Arbeitsbereiches limitiert. In einer Messung mit 0,4 μM TetR betrug der Arbeitsbereich der Kalibrierkurve 22 RU, ein Bereich, der aufgrund der hohen Unpräzision und dem Trend zu geringerer TetR-Bindung nicht mehr ausgewertet werden kann.

6.1.7.4 Matrixeinflüsse

Anhand der Matrix Honig wurde geprüft, wie anfällig das System für unspezifische Wechselwirkungen ist. Mischhonig (Honig1) wurde im Verhältnis 1:10 in Laufpuffer verdünnt, mit TetR gemischt und injiziert.

Tabelle 6-13: Vergleich der erhaltenen Signale für die TetR-Bindung in Honig und in Puffer, Mischhonig, Verdünnung 1:10 TetR 0,6 μM in der Messlösung

Derivat	Blank Puffer [ΔRU]	Blank Honig [ΔRU]	50 ng TC / ml Puffer [ΔRU]	50 ng TC / ml Honig [ΔRU]
IU 95	137	141	149	142
IU 91	133	112	119	96
IU 58	43	75	44	73

Die Tetracyclinkonzentration war bei der Messung zu gering gewählt, so dass keine detektierbare Hemmung der TetR-Bindung stattfand. Es bestand kein Unterschied zwischen Blank und Tetracyclinlösung, was sowohl für den Puffer als auch für die Honigmatrix galt. Ein Vergleich der Signale, die bei der Injektion von Honig und Puffer

erhalten wurden, zeigt, dass diese für IU 95 in derselben Größenordnung liegen; hier sind ebenfalls keine Beeinträchtigungen des Systems durch Matrixbestandteile zu erkennen (Tabelle 6-13). Bei IU 91 lag das Signal für den Blank und die dotierte Honiglösung unter dem des Blanks für den Puffer. Dies deutet darauf hin, dass keine Bestandteile der Honigmatrix unspezifisch an die Chipoberfläche gebunden wurden.

Bei IU 58 lag der Reagenzienblindwert mit Honig höher als der in Puffer, was auf eine unspezifische Bindung von Matrixkomponenten hinweisen könnte. Es ist jedoch unklar, warum diese nur bei einem Derivat auftreten sollte.

Die Sensorgramme zeigten für alle Derivate hinsichtlich der injizierten Honigmatrix außer einem veränderten Brechungsindex keine Auffälligkeiten, auch die Regeneration war hinreichend und die Basislinie stabil, so dass davon auszugehen ist, dass die Injektion von Honigmatrix bei der Verwendung von SDS kein Problem darstellt. Für IU 95 konnte dies in Tabelle 6-13 gezeigt werden.

6.1.7.5 pH-Wert

Der pH-Wert im System wirkt sich sowohl auf die Ladungsverteilung an der Chipoberfläche als auch auf die Ladungsverteilung am TetR aus, so dass ein geeigneter pH-Wert des Puffers für die TetR Bindung gefunden werden sollte, der möglicherweise auch eine bessere Stabilität oder Reproduzierbarkeit bietet. Es wurde sowohl der pH-Wert des Laufpuffers variiert, als auch der pH-Wert des Puffers, in dem TetR verdünnt wurde, und diese verschieden kombiniert. Während der Injektion von TetR ist der Fluss von Laufpuffer unterbrochen, so dass in der Lösung der pH-Wert der Probe dominiert.

Tabelle 6-14: pH- Einfluss: Variation der pH-Werte von Laufpuffer und Puffer, in dem TetR gelöst ist, Auswirkung auf die TetR-Bindung. TetR-Bindung angegeben als Mittelwert aus Fünffachinjektion (A1, A2) oder Siebenfachinjektion (B1, B2)

Kombination	pH-Wert Laufpuffer	pH-Wert TetR	TetR- Bindung [ΔRU]	Standardabweichung der TetR-Bindung [ΔRU]
A1	6	6	95	1
A2	6	7,4	57	2
B1	7,4	7,4	134	14
B2	7,4	6	148	0

Bei gleichem pH-Wert des Laufpuffers (Vergleich Lösungen A1 mit A2 und B1 mit B2) wurde jeweils bei der Kombination mit TetR in Puffer pH 6 mehr TetR gebunden, zwischen B1 und B2 sind die Unterschiede jedoch nicht signifikant. Bei der Kombination B2 wurde eine absolut höhere TetR-Bindung erzielt als bei A2, obwohl B2 zeitlich nach A2 gemessen wurde und im Allgemeinen ein Trend zu abnehmender TetR-Bindung bei späteren Messungen beobachtet wurde. Bei Laufpuffer pH 7,4 wurde generell eine höhere TetR-Bindung erzielt als bei pH 6. **Die TetR-Bindung wird demnach vom pH-Wert des Laufpuffers beeinflusst.** Die folgenden Messungen wurden daher weiterhin bei pH 7,4 durchgeführt.

Weitere Kombinationen ergeben sich theoretisch, wenn man Tetracyclin als dritte Komponente hinzunimmt und den pH-Wert der Puffer variiert, in denen TetR und Tetracyclin gelöst sind. In diesem Fall kann jedoch aufgrund der Konkurrenz mit Tetracyclin die maximale TetR-Bindung nicht als Maßstab herangezogen werden. Die Erkennung von Tetracyclin durch TetR kann bei nicht-physiologischen pH-Werten vom pH-Wert beeinflusst sein; zudem beeinflusst der pH-Wert die Bindung von TetR an die Oberfläche. Da sich diese Effekte additiv verhalten, können aus der TetR-Bindung in der SPR-Messung keine Rückschlüsse auf die einzelnen Effekte getroffen werden.

6.1.7.6 Messungen mit verschiedenen Tetracyclinen

TetR bindet die verschiedenen Tetracycline mit unterschiedlicher Affinität. Die Affinität nimmt in der Reihe Anhydrotetracyclin>Doxycyclin>Tetracyclin ab [208].

Um zu prüfen, ob sich die verschiedenen Affinitäten im kompetitiven Assay widerspiegeln, wurden Kalibrierkurven mit verschiedenen Tetracyclinen aufgenommen, bei der TetR und Tetracyclinlösung erst gemischt und dann injiziert wurden (Messlösung: TetR 1 μ M, TC-Konzentrationen von 0-640 ng/ml). Die Tetracyclinkonzentration wurde so gewählt, dass bei der höchsten Tetracyclin-Konzentration in der Messlösung TetR noch nicht mit Tetracyclin gesättigt ist.

Tabelle 6-15: Abhängigkeit der TetR-Bindung von der Art des Tetracyclins und dessen Konzentration, Messlösung: TetR 1 μ M, Tetracyclin in den angegebenen Konzentrationen, Injektionsvolumen 25 μ l bei 5 μ l/min; TC = Tetracyclin, Doxy= Doxycyclin, ATC = Anhydrotetracyclin

Konzentration [ng/ml]	IU 58 Response [Δ RU]			IU 91 Response [Δ RU]			IU 95 Response [Δ RU]		
	TC	Doxy	ATC	TC	Doxy	ATC	TC	Doxy	ATC
0	67	67	67	129	129	129	165	165	165
40	59	72	74	106	120	126	185	152	156
160	41	36	54	97	101	112	132	147	126
400	51		60	77	84	25	101	111	105
640	18	29	47	45	40	69	73	71	83

Tabelle 6-15 zeigt eine Abhängigkeit der TetR-Bindung von der Tetracyclinkonzentration. Dabei wurden keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Tetracyclinen festgestellt. Die verschieden hohe Affinität der einzelnen Tetracycline zu TetR konnte in der Messung nicht gezeigt werden.

„Nachgeschaltete“ Konkurrenz

Das kompetitive Assayformat kann so konzipiert werden, dass Injektion von Rezeptorprotein und Probelösung zeitlich getrennt erfolgt. Anders als bisher erfolgt dabei keine Vorinkubation von Probe mit TetR, sondern eine „nachgeschaltete“ Konkurrenzreaktion, in der das in einem ersten Schritt an die Oberfläche gebundene TetR durch Injektion einer tetracyclinhaltigen Probenlösung wieder abgelöst wird. Dabei laufen folgende Reaktionen ab:

- (1) [Derivat-TetR] \rightarrow Derivat + TetR
- (2) Tc + TetR \rightarrow [Tc-Derivat] (Entfernung durch den Laufpuffer)

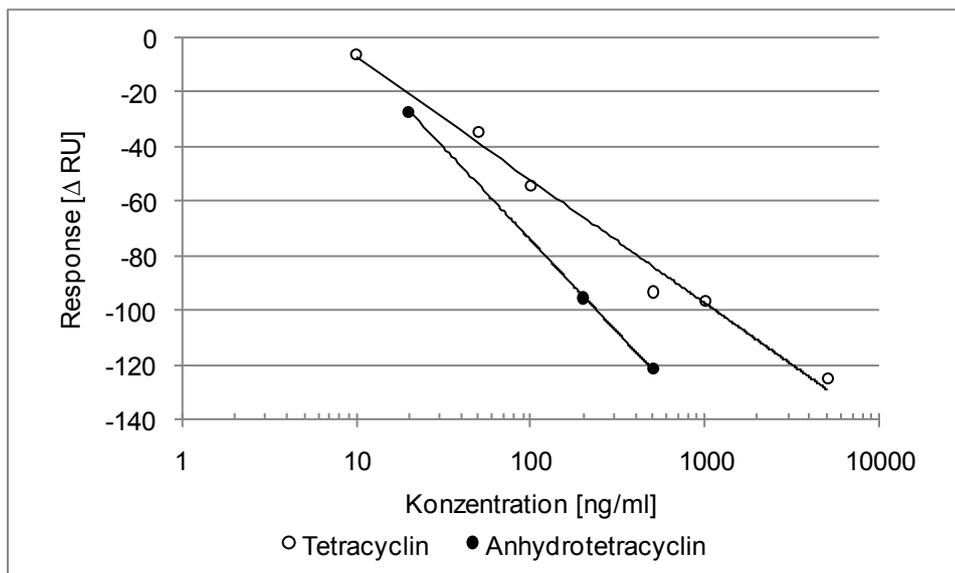


Abbildung 6-24: Ausmaß der Ablösung von TetR durch nachträgliche Injektion von Tetracyclin und Anhydrotetracyclin, TetR-Injektion 40 μ l; TetR 1 μ M; Injektion von Tetracyclin 60 Minuten

In Abbildung 6-24 wird deutlich, dass die Messwerte die erwarteten Affinitäten abbilden: So löst beispielsweise Anhydrotetracyclin bei einer Konzentration von 500 ng/ml etwa die Menge TetR ab, die Tetracyclin bei der 10fachen Konzentration ablöst. Doxycyclin löste bei 1000 ng/ml 112 RU TetR ab und damit mehr als Tetracyclin. Weiterhin zeigt dieses Ergebnis, dass TetR eine höhere Affinität zu underivatisiertem, freien Tetracyclin hat als zu den an der Oberfläche fixierten Doxycyclinderivaten. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus Kapitel 6.1.4.1 und lässt folgern, dass beide Reaktionen (1) und (2) rasch erfolgen.

Die Ablösung von TetR folgte einem exponentiellen Verlauf, anfangs wurde viel TetR, später geringere Mengen gelöst. Es wurde getestet, ob sich Kalibrierkurven für nachträglich injiziertes Tetracyclin aufzeichnen lassen, wenn eine kürzere Injektionszeit gewählt wird (15 min), da eine Injektionsdauer von 60 Minuten bei der Verwendung des Assays möglicherweise unnötig lang ist.

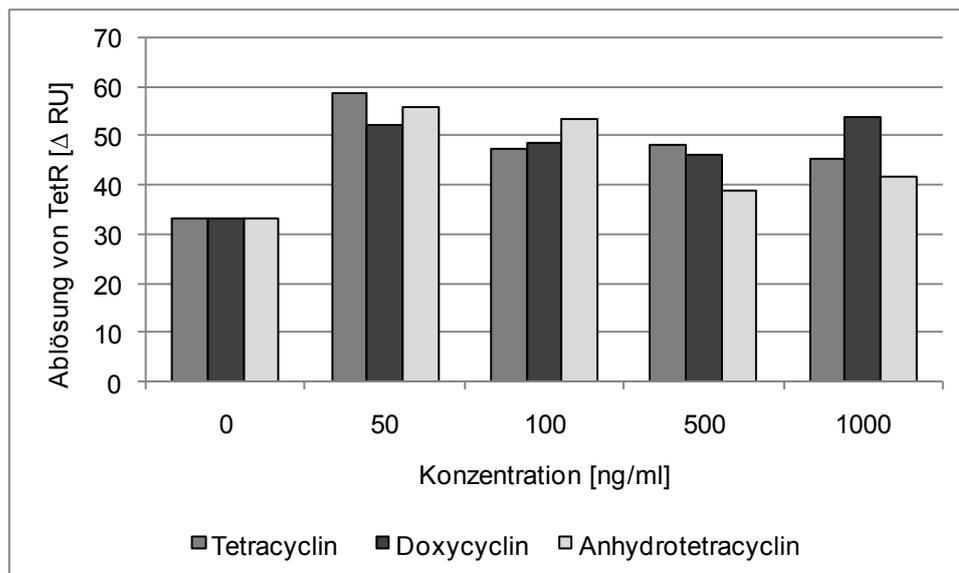


Abbildung 6-25: Ablösung von TetR durch verschiedene Tetracycline in unterschiedlichen Konzentrationen, Injektionsdauer Tetracyclin 15 Minuten, exemplarisch dargestellt für IU 95

Die Verringerung der Injektionsdauer für Tetracycline resultierte in einer deutlich geringeren Ablösung von TetR im Vergleich zur Injektionsdauer von 60 Minuten. Abbildung 6-25 zeigt, dass für das Derivat IU 95 die Ablösung von TetR durch Tetracyclin größer war als die Dissoziation von TetR ohne Tetracyclin im selben Zeitraum (Vergleich mit dem Messwert des Blanks). Bei IU 58 und IU 91 lagen die Messwerte unterhalb derer des Puffer-Leerwertes. Es ließ sich weder eine Zunahme der TetR-Ablösung mit steigender Konzentration, noch mit steigender Affinität des entsprechenden Tetracyclins zu TetR erkennen. Die Injektionsdauer von 15 Minuten reichte nicht aus, um konzentrations- oder spezifitätsabhängige Unterschiede zu beobachten und ist somit nicht für die Detektion von Tetracyclinen geeignet.

6.1.8 Stabilität des Systems

In fast allen Messreihen wurde für Mehrfachinjektionen ein Trend festgestellt, bei späteren Injektionen wurden deutlich geringere Messwerte erhalten. Die TetR-Bindung nahm im Verlauf der Nutzungsdauer der Sensorchips kontinuierlich ab. Darin zeigt sich deutlich eine Instabilität des Systems.

Dieses Phänomen kann auf verschiedene Effekte zurückzuführen sein. Zum einen könnte es in einer unzureichenden Regeneration begründet sein, durch die sich TetR an der Chipoberfläche anhäuft und so zunehmend weniger Bindestellen an der Oberfläche

zur Verfügung stehen. Ein kontinuierlicher Anstieg der Basislinie wäre neben abnehmender TetR-Bindung die Folge. Auf CM5-Chips zeigte sich, dass die Basislinie im Verlauf der Verwendungsdauer des Chips anstieg, allerdings zeigten die einzelnen Sensorgramme jeweils eine vollständige Regeneration.

Daneben sind auch Abbau- oder Umlagerungsreaktionen an den Derivaten möglich, die im System nur als schlechtere TetR-Bindung detektiert werden. Da tendenziell eher ein Anstieg der Basislinie beobachtet wurde und der Spacer kovalent an Doxycyclin gebunden ist, ist das Ablösen des Doxycyclinkörpers vom Spacer als unwahrscheinlich einzustufen. Eine Ablösung der Derivate von der Oberfläche wird ebenfalls als unwahrscheinlich angesehen, da die Derivate ihrerseits kovalent an die Oberfläche gebunden sind. Die Instabilität trat auf allen getesteten Oberflächenmaterialien und -dicken auf, daher ist die Beschaffenheit der Sensorchipoberfläche als Ursache auszuschließen.

Die Stabilität der Derivate wurde im nicht-kompetitiven Assayformat von Möller getestet. Dazu wurden Derivate gegen Doxycyclin als Referenz nach verschiedenen Zeiten der Lagerung unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gemessen. Bei der Stammlösung (1 mg/ml) konnte nach 16 Tagen keine Veränderung hinsichtlich der Fähigkeit, TetR von *tetO* zu lösen festgestellt werden. Auch die verdünnten Lösungen waren für mindestens 7 Tage stabil. Dies deutet zunächst darauf hin, dass die Derivate in Lösung für einen gewissen Zeitraum stabil sind. Bei der Interpretation dieses Ergebnisses und dem Übertragen auf das kompetitive Assayformat bleibt zu berücksichtigen, dass sich fixierte Moleküle anders verhalten können als freie Moleküle. Veränderungen am Spacer, die im Möller-System nicht detektiert werden können, im kompetitiven Format jedoch kritisch sein könnten, sind unter den milden Bedingungen nicht zu erwarten.

Mit den zur Verfügung stehenden Mitteln konnte die genaue Ursache der Instabilität des Systems nicht ergründet werden. Anhand der Tatsache, dass das Verhalten auf allen Chipoberflächen beobachtet wurde und TetR im nicht-kompetitiven Format als sehr stabil charakterisiert wurde, können diese als Ursachen ausgeschlossen werden. Die Instabilität ist daher auf die immobilisierten Doxycyclinderivate zurückzuführen. Es konnten keine Bedingungen ermittelt werden, unter denen eine Stabilität gegeben war.

6.1.9 Fazit der Messungen mit dem kompetitiven Assayformat

Es konnte gezeigt werden, dass ein kompetitives Assayformat mit TetR als Rezeptor und Doxycyclinderivaten als Kompetitor zu freien Tetracyclinen durchführbar ist („Proof of principle“).

Als wichtige Einflussgrößen für die Immobilisierung wurden die Oberfläche der Sensorchips-, insbesondere die Schichtdicke, die Konzentration der Derivatlösung, der pH-Wert und die Länge des Spacers am Derivat identifiziert. Gute Ergebnisse für die Immobilisierung wurden auf dicken Sensoroberflächen bei pH 7,4 mit einer Derivatkonzentration von 0,5 mg/ml erhalten. Ein langer Spacer am Derivat wirkte sich ebenfalls positiv auf den Immobilisierungslevel aus. Der Aktivierungslevel bei der Immobilisierung spielte im Vergleich zur Schichtdicke des Sensorchips nur eine untergeordnete Rolle. Ein Optimum für die Derivatkonzentration bei der Immobilisierung lag bei 0,5 mg/ml (CM5-Chip). Höhere Immobilisierungslevel führten nicht zu einer höheren TetR-Bindung.

Hinsichtlich der Chipoberflächen zeigte sich, dass lediglich die CM5-Oberfläche für das Assayformat geeignet war, da sie die geringste unspezifische Bindung von TetR sowie die geringste Dissoziation von TetR zeigte. Als Einflussgrößen für die TetR-Bindung wurden neben der Konzentration auch Immobilisierungslevel und Spacerlänge der Derivate gefunden. Ein längerer Spacer wirkt sich bei den CM5-Chips negativ auf die TetR-Bindung aus. Die TetR-Bindung konnte im Weiteren durch die Variation der Injektionsdauer beeinflusst werden. Eine längere Injektionsdauer führte zu mehr gebundenem TetR. Hinsichtlich der Konkurrenz mit Tetracyclin konnte gezeigt werden, dass die Inkubationsdauer TetR-Tetracyclin keinen Einfluss auf das Signal hat, wohl aber die Tetracyclinkonzentration. Je höher die Konzentration, desto weniger TetR wurde an die Oberfläche gebunden. Über die TetR-Konzentration konnte die Empfindlichkeit des Assays beeinflusst werden. Je weniger TetR angeboten wurde, desto höher war die Empfindlichkeit. Die Regeneration der Oberfläche konnte mit SDS erreicht werden.

Große Probleme zeigten sich in der Stabilität der Doxycyclinderivate und der Reproduzierbarkeit der TetR-Bindung. Bei den Messungen wurde ein Trend zu geringerer TetR-Bindung bei späteren Injektionen festgestellt. Die Bindefähigkeit von TetR nahm mit zunehmender Lebensdauer des Sensorchips ab. Auch waren die Messungen mit einer hohen Unpräzision behaftet, so dass letztendlich festgestellt werden muss, dass das kompetitive Assayformat aufgrund dieser schwerwiegenden Probleme nicht für den Nachweis von Tetracyclinen in Lebensmittelmatrices geeignet ist.

6.2 Nicht-kompetitives Assay-Format mit *tetO* und TetR

6.2.1 Aufbau des nicht-kompetitiven Assays und Charakteristika des Sensorgrammes

Die Funktionsweise des von Möller beschriebenen nicht-kompetitiven Assays [1, 188] wird im Folgenden zum besseren Verständnis ausführlich beschrieben.

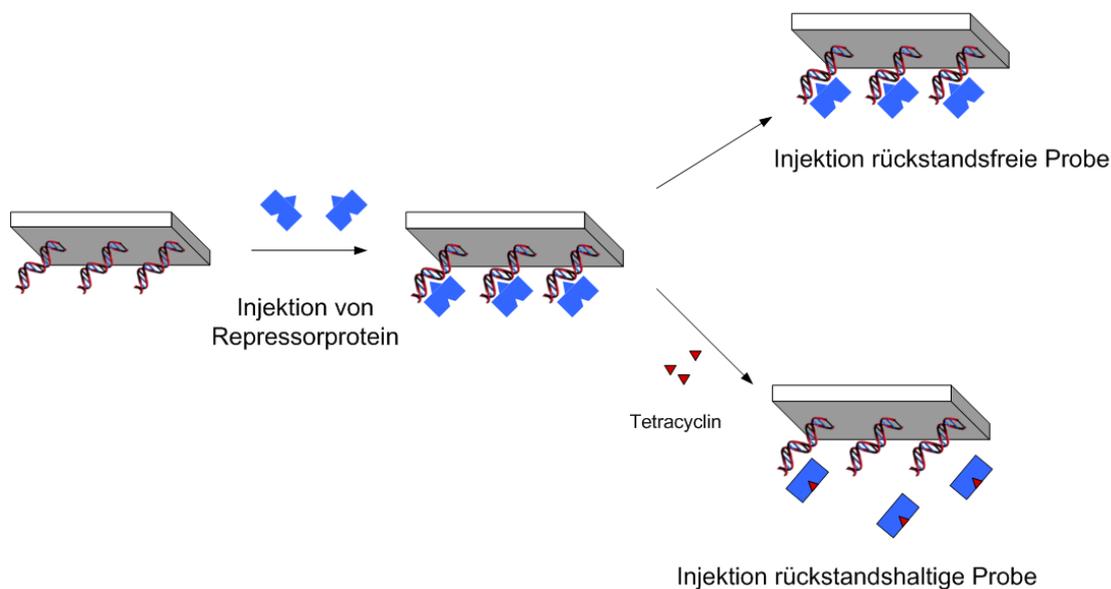


Abbildung 6-26: Nicht-kompetitives Assayformat mit *tetO* und TetR: Das DNA-Fragment *tetO* (Operator-Sequenz) wird durch Injektion von TetR mit dem Repressorprotein beladen. Bei der anschließenden Injektion von Probenlösung bindet im Fall von tetracyclinhaltigen Lösungen Tetracyclin an den Repressor und induziert hier eine Konformationsänderung. Diese führt zur Ablösung des Repressorproteins vom Operator und somit zu einem Abfall des SPR-Signals. Durch analytfreie Proben wird TetR nicht von *tetO* gelöst, es kommt daher nicht zu einer Signaländerung.

Bei diesem nicht-kompetitiven Assay wird das biotinylierte DNA-Fragment *tetO* auf der Oberfläche des Sensorchips immobilisiert. Es werden Sensorchips verwendet, die mit Streptavidin bereits funktionalisiert sind, so dass *tetO* durch eine einfache Injektion als stabiler Komplex an der Oberfläche fixiert werden kann. Im ersten Schritt der Analyse wird *tetO* mit TetR beladen. Anschließend kann die Probe injiziert werden. Ist Tetracyclin in der Probe enthalten, so bindet dieses mit hoher Affinität an den Repressor und induziert eine Konformationsänderung, die zur Ablösung des TetR vom Operator führt (Abbildung 6-26). Die Ablösung führt zu einem Abfall des SPR-Signals, so dass

bei der Injektion positiver Proben ein negatives Signal erhalten wird. Bei der Injektion tetracyclinfreier Proben wird TetR nicht vom Operator gelöst, es wird daher keine Signaländerung aufgezeichnet.

Charakteristika des Sensorgrammes

Der Verlauf eines Messzyklus ist exemplarisch in Abbildung 6-27 dargestellt. In einer Messreihe werden mehrere Messzyklen zusammengefasst. Ein Messzyklus umfasst im Fall dieses nicht-kompetitiven Assay-Formates mehrere Injektionen. Zunächst wird TetR injiziert, um die Operator-DNA mit TetR zu beladen. Es folgt die Injektion der Probe, die bei Anwesenheit von Tetracyclin TetR ablöst. Abschließend werden durch Injektion von SDS verbliebenes TetR und Matrixkomponenten aus der Probe vom Operator gelöst. Als zweiter Regenerationsschritt wird Probenpuffer injiziert, um SDS schneller aus der Dextranmatrix auszuwaschen.

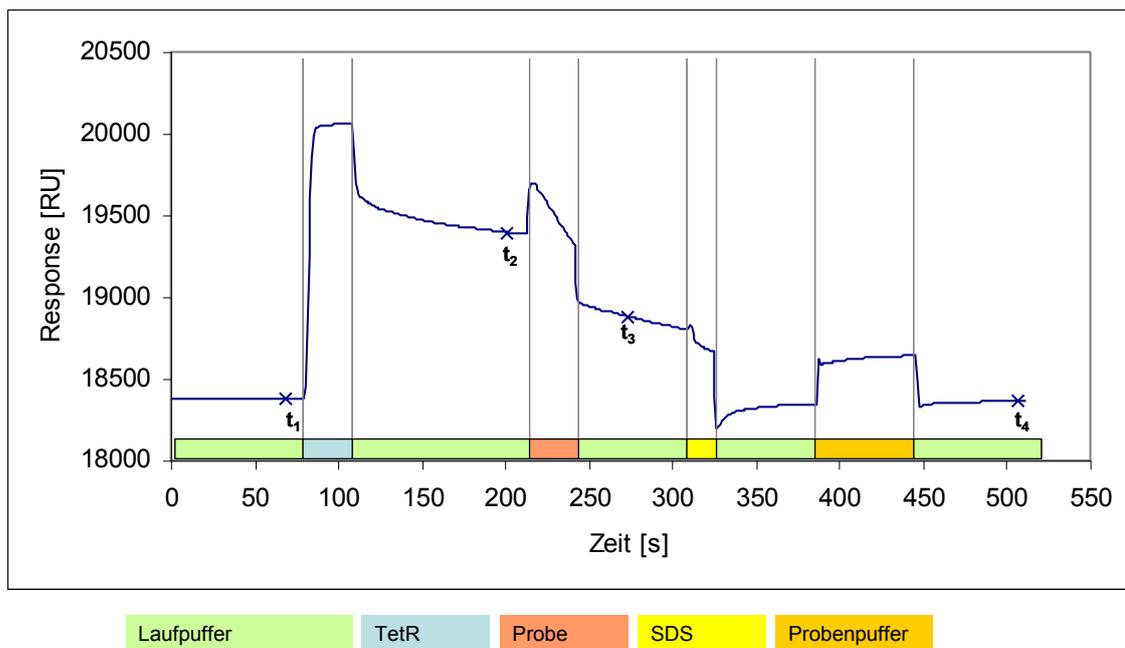


Abbildung 6-27: Sensorgramm eines Messzyklus des nicht-kompetitiven Assay-Formates. Dargestellt sind die Injektion von TetR, und einer Tetracyclin-Standardlösung (50 ng/ml) gefolgt von zwei Regenerationsschritten (SDS und Probenpuffer). Die Injektionen der verschiedenen Lösungen sind farblich markiert.

Bei der Injektion einer Lösung zeigt sich eine sprunghafte Signaländerung, die durch die Änderung des Brechungsindex an der Oberfläche hervorgerufen wird, sofern sich die Brechungsindices der injizierten Lösung und des Laufpuffers unterscheiden (Bulk-Effekt). Eine Änderung des Signals, die durch eine Massenänderung an der Chipober-

fläche hervorgerufen wird, zeigt sich erst, wenn nach der Injektion der Lösung wieder Laufpuffer über die Oberfläche fließt.

Zu definierten Zeitpunkten werden Messpunkte aufgezeichnet, die für die Auswertung der Sensorgramme herangezogen werden (t_1 bis t_4 in Abbildung 6-27). Die Messpunkte wurden zu folgenden Zeitpunkten gesetzt:

Tabelle 6-16: Lage der Messpunkte in einem Messzyklus des nicht-kompetitiven Assay-Formates

Messpunkt	Zeitpunkt
t_1 (Basislinie)	10 s vor TetR-Injektion
t_2 (Response 1)	10 s vor Probeninjektion
t_3 (Response 2)	30 s nach Probeninjektion
t_4 (Regeneration)	60 s nach Probenpuffer-Injektion

Bevor die TetR-Lösung injiziert wird, wird der Messpunkt t_1 gesetzt. Dieser Messpunkt repräsentiert den nur mit *tetO* belegten Chip. Die Beobachtung dieses Messpunktes bei mehreren Zyklen innerhalb einer Messreihe zeigt daher Veränderungen an der Chipoberfläche an. Beispielsweise kann ein Abfall des Signals die Ablösung von *tetO* anzeigen, wohingegen ein Anstieg ein Anzeichen für eine unzureichende Regeneration der Chipoberfläche ist.

Der absolute Response zum Zeitpunkt t_1 kann gegen die jeweilige Zyklusnummer aufgetragen werden und wird im Weiteren als Basislinie bezeichnet. „Basislinie“ bezeichnet also hier keine kontinuierliche Betrachtung eines Signals sondern eine Folge von Messwerten aufeinander folgender Zyklen, die zum Zeitpunkt t_1 im Zyklus aufgezeichnet werden.

Die Bindung von TetR an den Operator wird durch die Differenz der Messwerte zum Zeitpunkt t_2 und t_1 definiert. Die Bildung einer Signaldifferenz an zwei Messpunkten wird als relativer Response bezeichnet und in ΔRU angegeben. Wird diese Differenz gegen die Zyklusnummer aufgetragen, kann man einen Überblick über den Verlauf der TetR-Bindung während einer Messreihe erhalten. Dadurch können Aussagen über einen

möglichen „Aktivitätsverlust“ der *tetO*-Oberfläche getroffen werden. Die Differenz der Signale gemessen an t_2 und t_1 wird im Folgenden auch als „TetR-Bindung“ bezeichnet.

Als maximale TetR-Bindung R_{\max} wird im Folgenden die TetR-Bindung unter Standardbedingungen definiert, als Standardbedingungen gelten hier ein Injektionsvolumen von 10 μl TetR 1 μM bei einem Fluss von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Durch die Injektion tetracyclinhaltiger Lösungen wird Repressor von der Chipoberfläche abgelöst. Als Folge davon fällt das Signal zwischen den Messpunkten t_2 und t_3 ab. Es besteht eine Korrelation zwischen der injizierten Tetracyclinmenge und der Differenz der Messwerte: je mehr Tetracyclin injiziert wird, desto größer die Differenz. Der relative Response der Messwerte an t_3 und t_2 wird in ΔRU angegeben und ist bei der Injektion von Tetracyclinlösungen in aller Regel mit einem negativen Vorzeichen versehen, da es sich um eine Ablösung von TetR handelt. Bei der Injektion von tetracyclinfreien Pufferlösungen (Blank) wird ebenfalls ein schwach negativer ΔRU -Wert erhalten, der auf die Dissoziation von TetR im Zeitraum der Injektion zurückzuführen ist.

Zum Abschluss des Messzyklus wird die Chipoberfläche regeneriert, dabei sollte alles noch gebundene TetR sowie Matrixbestandteile, die unspezifisch an die Oberfläche gebunden sind, abgelöst werden. Das Signal nach der Regeneration (t_4) sollte wieder auf den Level kommen, der zu Beginn des Zyklus bestand. Eine Signaldifferenz zwischen t_4 und t_1 innerhalb desselben Zyklus kann daher zur Beurteilung der Regenerationskraft der verwendeten Lösungen herangezogen werden. Die Differenz zwischen den Messwerten zum Zeitpunkt t_4 und t_1 wird in dieser Arbeit synonym mit dem Begriff „Regeneration“ beschrieben.

Durch die Messung von Kalibrierlösungen („Kalibranten“) verschiedener Tetracyclin-Konzentrationen kann der Arbeitsbereich der Kalibrierung (Range) bestimmt werden. Darunter wird die Differenz zwischen dem ΔRU für die geringste und höchste Tetracyclin-Konzentration verstanden. Als ausreichender Arbeitsbereich wird eine Differenz von mindestens 300 RU bei guter Präzision angesehen [209]. Im Weiteren wird der Arbeitsbereich zur Berechnung des IB_{50} -Wertes benötigt, dieser Wert ist das

Signal jeder Kalibrierkurve, das einer 50%igen Ablösung von gebundenem TetR entspricht.

Die Parameter Basislinie, TetR-Bindung, Ablösung von TetR durch Probe und Regeneration wurden für diese Arbeit für jeden Messzyklus / jede Messreihe aufgezeichnet und bewertet.

6.2.2 Ausgangslage für die Untersuchungen mittels des nicht-kompetitiven Assays

Von Möller wurden bei der Entwicklung des Screening-Assays wichtige Erkenntnisse erarbeitet, die in dieser Arbeit nicht mehr überprüft werden mussten. Da diese als Grundlage für die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse dienen, wird hier eine kurze Zusammenfassung der Ergebnisse gegeben [188].

Von Möller wurden verschiedene Operator- und Repressorvarianten untersucht. Die Operatorvarianten (*tetO*) wurden hinsichtlich der Bindefähigkeit für TetR beurteilt, dabei zeigte sich, dass die Varianten sich nur wenig unterschieden und keine der Varianten den anderen deutlich überlegen war. Hinsichtlich verschiedener TetR-Varianten wurde TetR(BD) als für den Assay am besten geeignet befunden, da TetR(BD) eine hohe Signalantwort sowie eine gute Empfindlichkeit und gute Kreuzreaktivität für verschiedene Tetracycline zeigte. Die optimale TetR-Konzentration zur Beladung des Repressors war 1 μM , bei höheren Konzentrationen war die Sensitivität des Assays leicht verringert. Weiterhin zeigte Möller, dass die Bindung von TetR in Abhängigkeit des Immobilisierungslevels von *tetO* zunahm, dass jedoch die Empfindlichkeit auch durch geringere Immobilisierungslevel nicht beeinträchtigt wurde. Als geeignetes Regenerationsreagenz zur Ablösung von TetR vom Operator wurde SDS ermittelt. Für den Nachweis von Tetracyclinen in Honig wurde von Möller eine Entscheidungsgrenze von 14 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bestimmt [188].

Auf der Grundlage von Möllers Erkenntnissen wurden in dieser Arbeit schwerpunktmäßig zwei Ziele verfolgt: Zum einen sollte eine Überprüfung der Robustheit und damit der Praxistauglichkeit des Assays erfolgen, zum anderen sollten Wege gefunden werden, die Empfindlichkeit des Screening Assays für Honig zu erhöhen. Zur besseren Übersicht wird das Konzept der zu den beiden Schwerpunkten

durchgeführten Messungen zu Beginn der Kapitel 6.3 (Robustheit) und Kapitel 6.4 (Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit) vorgestellt.

6.3 Robustheit des Screening-Tests mit *tetO* und TetR

6.3.1 Konzept der Messungen

Die Praxistauglichkeit und Robustheit des von Möller et al. entwickelten Screening-Tests [1] sollte im Folgenden untersucht werden.

In einer Entscheidung der Kommission zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG betreffend die Durchführung von Analysemethoden (2002/657/EG) sind Leistungsmerkmale festgelegt, die für bestimmte Analyseverfahren bestimmt werden müssen [210]; in dieser Entscheidung sind auch die Screeningmethoden klassifiziert (Abbildung 6-28).

Klassifikation von Analysemethoden nach den Leistungsmerkmalen, die bestimmt werden müssen

		Nachweisgrenze CC β	Entscheidungs- grenze CC α	Richtigkeit/ Wiederfindung	Präzision	Selektivität/ Spezifität	Anwendbarkeit/ Robustheit/ Stabilität
Qualitative Methoden	S	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
Quantitative Methoden	S	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

S = Screeningmethoden; C = Bestätigungsmethoden; += Bestimmung ist obligatorisch.

Abbildung 6-28: Entscheidung 2002/657/EG; Einteilung von Analysemethoden nach den Leistungsmerkmalen, die bei der Validierung bestimmt werden müssen

Die Entscheidung 2002/657/EG fordert für qualitative Screeningmethoden die Bestimmung von Nachweisgrenze, Selektivität und Spezifität sowie der Anwendbarkeit, Robustheit und Stabilität. Für eine quantitative Screeningmethode muss darüber hinaus die Präzision bestimmt werden. Von Möller wurden für den vorliegenden Screening-Test bereits Nachweisgrenze, Selektivität und Spezifität beschrieben.

In dieser Arbeit sollten die noch ausstehenden Parameter Stabilität, Robustheit und Anwendbarkeit systematisch untersucht werden. Die Robustheit eines Systems beschreibt die Anfälligkeit einer Methode gegenüber Änderungen in den Versuchsbedingungen. Sie wird ausgedrückt als eine Liste von Bedingungen, unter

denen eine Methode wie beschrieben oder mit vorgeschriebenen geringfügigen Änderungen angewendet werden kann [210]. Für Versuchsbedingungen, die in der Praxis schwanken können, wie beispielsweise die Charge und Stabilität der Reagenzien, pH-Wert, Temperatur oder Zusammensetzung von Proben, sollte daher angegeben werden, welche Schwankungen das Analysenergebnis beeinflussen können. Einen Überblick über die Vorgehensweise und die für die einzelnen Parameter untersuchten Größen gibt Abbildung 6-29.

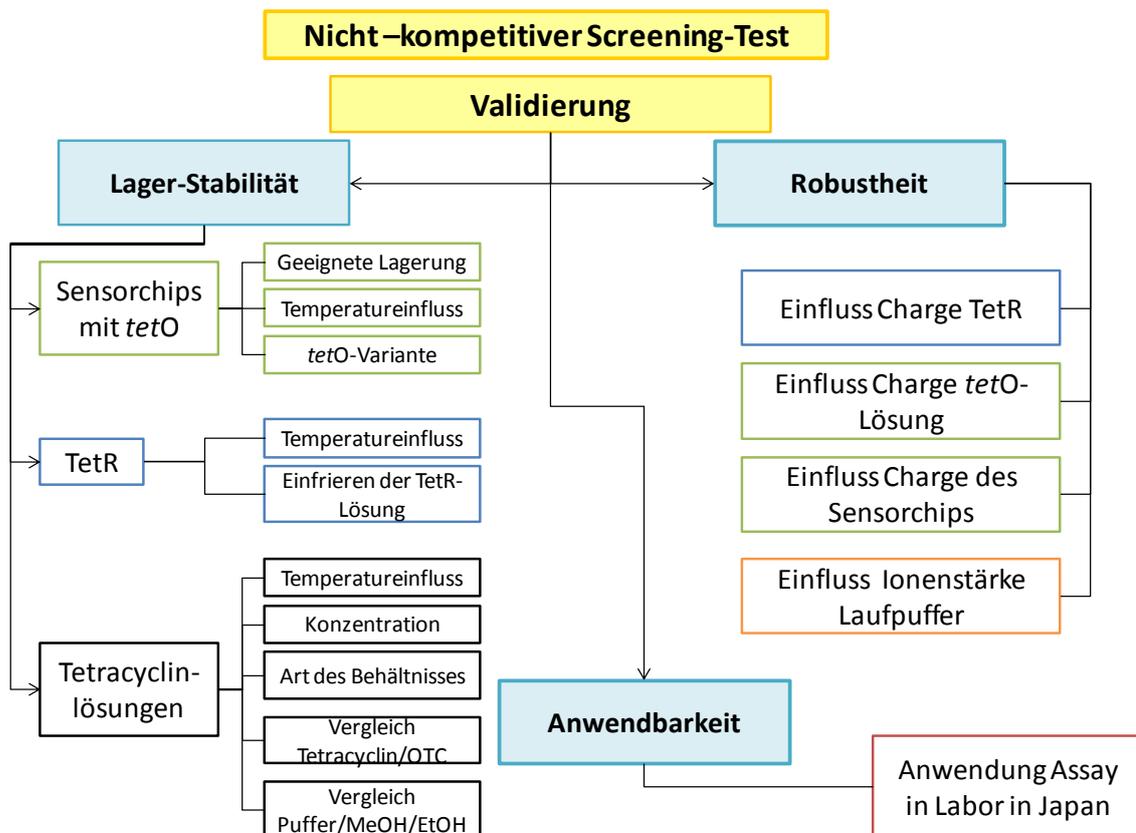


Abbildung 6-29: Schema der Versuche zur Bestimmung von Stabilität, Robustheit und Anwendbarkeit des Screening-Assays.

Für die Beschreibung der Stabilität wurde die Lagerstabilität der Reagenzien *tetO*; TetR und Tetracyclinlösungen unter verschiedenen Lagerbedingungen herangezogen. Der Einfluss verschiedener Reagenzienchargen auf das Messergebnis sowie der Einfluss der Ionenstärke des Laufpuffers wurden für die Beurteilung der Robustheit herangezogen. Die Anwendbarkeit konnte überprüft werden, indem Messungen der für Honig optimierten Methode in einem Labor in Japan von ungeübtem Laborpersonal durchgeführt wurden und die erhaltenen Ergebnisse bewertet wurden.

6.3.2 Lagerstabilität der Sensorchips

Ein Problem bei dem von Möller entwickelten Screeningtest war, dass es nicht möglich war, mit *tetO* belegte Sensorchips (Variante 2x Biotin, siehe auch 6.3.3) außerhalb des Gerätes zu lagern, ohne einen hohen Aktivitätsverlust für die Bindung von TetR hinnehmen zu müssen [188]. Messreihen konnten nur kontinuierlich auf dem Chip durchgeführt, dieser musste nach der Messreihe verworfen werden. Über einen kurzen Messzeitraum (eine Woche) im SPR-Gerät verbliebene Sensorchips zeigten keinen Stabilitätsverlust, auch nicht auf ungenutzten Flusszellen.

Es sollten zunächst geeignete Lagerbedingungen für die Sensorchips ermittelt werden.

Die folgenden Größen wurden zur Beschreibung der Lagerstabilität herangezogen: 1.) das Basisliniensignal (Messwert an t_1) gibt Aufschluss darüber, ob und in welchem Maße an den Sensorchip gebundenes *tetO* von der Oberfläche gelöst wird. 2.) Die TetR-Bindung (Differenz der Messwerte an t_2 und t_1) erlaubt eine Abschätzung der Verfügbarkeit der Oberfläche für TetR. 3.) Die Signaldifferenz zwischen der höchsten Tetracyclinkonzentration und einem Reagenzienblank (Range) (Messwerte bei t_3 und t_2) zeigt den Arbeitsbereich für die Kalibrierung an, der möglichst reproduzierbar sein sollte.

Verschiedene Lagerbedingungen wurden getestet: trockene Lagerung, Lagerung in Puffer und die Lagerung mit gebundenem TetR auf der Sensorchipoberfläche jeweils trocken und in Puffer bei 4-8 °C.

Verhalten der Basislinie nach der Lagerung von Sensorchips

Es sollten verschiedene Lagerbedingungen daraufhin untersucht werden, ob und unter welchen Bedingungen nach der Lagerung von Sensorchips außerhalb des SPR-Gerätes eine stabile Basislinie nach dem Einbau der Chips erhalten wird. Es wurden 4 verschiedene Sensorchips verwendet: Chip 1 und 14 wurden trocken gelagert, Chip 2 und 15 in Laufpuffer bei 4-8°C. Messungen zur Lagerstabilität erfolgten nach 2, 9, und 21 Tagen (Chips 1 und 2) oder 6, 13 und 30 Tagen (Chips 14 und 15). Bei Chip 14 wurde vor der Lagerung TetR auf die Chipoberfläche aufgebracht, das vor der

Messreihe mit SDS entfernt wurde. Chip 15 wurde in Laufpuffer mit TetR-Zusatz gelagert. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 6-17 wiedergegeben.

Tabelle 6-17: Lagerung der Sensorchips bei 4-8 °C außerhalb des SPR-Gerätes; Chip 14 nach Injektion von 20 µl TetR aus dem Gerät entnommen und im Stickstoffstrom getrocknet. Chip 15 in Laufpuffer mit 0,1 µM TetR im Puffer gelagert. Verlauf der Basislinie nach Wiedereinbau, Messpunkt Basislinie (t_1 , Oberfläche ohne TetR) jeweils im 5. Messzyklus

Lagerdauer [d]	Lagerung trocken Basisliniensignal [RU]			Lagerung in Laufpuffer Basisliniensignal [RU]		
	Chip 1 Lagerung ohne TetR		Chip 14 TetR	Chip 2 Lagerung ohne TetR		Chip 15 TetR
	Flusszelle 1	Flusszelle 2	Flusszelle 1	Flusszelle 1	Flusszelle 2	Flusszelle 1
0	17402	17425	19138	17457	17446	18603
2	16740	16729		17140	17117	
6			19108			18085
9	17183	17038		16554	16475	
13			18960			17466
21	16992	16758		16397	16175	
30			18968			17359
Abnahme [RU]	410	767	170	1060	1271	1244

Tabelle 6-17 zeigt, dass bei trockener Lagerung der Sensorchips die Basislinie weniger stark fällt (Differenz <800 RU) als bei der Lagerung in Puffer (Differenz >1000 RU). Möglicherweise verändert sich während der Lagerung in Puffer die Bindung von *tetO*-Biotin an Streptavidin.

Dieses Ergebnis war nicht erwartet worden, da die im Gerät – wo von Möller über den Zeitraum einer Woche keine Instabilität der Sensorchips beobachtet worden war, die nicht genutzten Flusszellen mit Laufpuffer gefüllt sind. Es war daher vermutet worden, dass die Instabilität der außerhalb des Gerätes gelagerten Sensorchips auf das Austrocknen der Oberfläche zurückzuführen sei. Es wurden jedoch keine

systematischen „Lagerstudien“ über die Stabilität der Sensorchips innerhalb des SPR-Gerätes durchgeführt.

Die bessere Stabilität bei der trockenen Lagerung ist darauf zurückzuführen, dass Reaktionen und Diffusion an der Oberfläche verhindert werden. Gute Resultate wurden bei der trockenen Lagerung der Sensorchips mit TetR auf der Oberfläche erhalten, eine hinreichende Stabilität der Streptavidin-Biotin-Bindung und des *tetO* unter diesen Bedingungen ist über den Zeitraum von 30 Tagen gegeben. Möglicherweise war bei der Lagerung von Chip 15 in Puffer mit TetR die Konzentration des TetR zu gering gewählt. Da eine Stabilität bei trockener Lagerung der Sensorchips mit TetR gegeben war, wurde nicht untersucht, ob höhere Konzentrationen TetR im Puffer die Chipoberfläche stabilisieren können. Nachteilig wäre hier der hohe Verbrauch an TetR für die Lagerung.

Bindung von Repressor nach der Lagerung von Sensorchips

Neben der Basislinie wurde die Bindungsfähigkeit der Oberfläche für den Repressor nach der Lagerung der Sensorchips betrachtet. Dazu wurden im ersten Schritt des Messzyklus 10 μl TetR 1 $\mu\text{Mol/l}$ bei einer Flussrate von 5 $\mu\text{l/min}$ injiziert. Die Repressorbindung wurde für den zweiten und den 17. Messzyklus ausgewertet, da von Möller bereits festgestellt wurde, dass im Verlauf einer Messreihe die Bindung von Repressorprotein zunahm [188].

Tabelle 6-18: Lagerung der Sensorchips bei 4-8 °C außerhalb des Gerätes; Flusszelle 1 von Chip 14 nach Injektion von 20 µl TetR aus dem Gerät entnommen und im Stickstoffstrom getrocknet. Chip 15 in Laufpuffer mit 0,1 µM TetR gelagert. Beladung der Chipoberfläche mit Repressorprotein nach Wiedereinbau des Chips, Messpunkt t_2 im zweiten und siebzehnten Zyklus auf der jeweiligen Flusszelle

Lagerdauer [d]	Lagerung trocken, TetR-Bindung [Δ RU]						Lagerung in Puffer, TetR-Bindung [Δ RU]					
	Chip 1 ohne TetR				Chip 14 TetR		Chip 2 ohne TetR				Chip 15 TetR	
	Flusszelle 1		Flusszelle 2		Flusszelle 1		Flusszelle 1		Flusszelle 2		Flusszelle 1	
Messzyklus	2	17	2	17	2	17	2	17	2	17	2	17
0	518	683	704	753	975	1162	621	727	689	734	1180	1219
2	528	625	641	673			547	660	619	669		
6					1127	1206					1038	1086
9	503	582	612	642			502	578	556	577		
13					1218	1228					825	904
21	302	430	440	485			309	412	374	400		
30					1168	1202					996	975
Abnahme [RU]	216	253	264	268	+193	+40	312	315	315	334	184	244

Die höhere TetR-Bindung auf den Flusszellen mit TetR ist auf einen um 300 RU höheren Immobilisierungslevel dieser Flusszellen (ca. 1200 RU auf Chip 14 und 15 gegenüber ca. 900 RU auf Chip 1 und 2) mit *tetO* zurückzuführen und hängt nicht mit der Lagerung zusammen.

Aus Tabelle 6-18 wird deutlich, dass bei der Lagerung ohne TetR auf der Oberfläche die Binfähigkeit der Oberfläche für TetR im Lauf der Lagerung um etwa 200 – 300 RU abnimmt, unabhängig davon, ob der Sensorchip trocken oder in Puffer gelagert wurde. Auf allen Flusszellen ist zu beobachten, dass die TetR-Bindung im Verlauf einer Messreihe (Zyklen 2 bis 17) ansteigt. Dies stimmt mit den von Möller beschriebenen Ergebnissen überein [188]. Es fällt auf, dass auf der jeweils später verwendeten Flusszelle 2 immer eine höhere TetR-Bindung im zweiten Messzyklus beobachtet wird

als auf der vorher verwendeten Flusszelle 1. Mögliche Ursachen für diesen Anstieg wurden von Möller diskutiert [188].

Bei den mit TetR gelagerten Flusszellen zeigt sich bei der Lagerung in Puffer ein Trend zur Abnahme der TetR-Bindfähigkeit, bei der trockenen Lagerung hingegen eine Zunahme. Diese Beobachtung ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, dass bei der Lagerung in Puffer trotz der hohen Bindungsaffinität zwischen TetR und *tetO* (vergleiche Kapitel 2.6.2) schützendes TetR von der Oberfläche diffundieren kann, was bei der trockenen Lagerung nicht möglich ist. Die Diffusion von TetR führt dazu, dass *tetO* zumindest teilweise wieder unbeladen vorliegt und daher die selben Veränderungen auftreten, die auch bei der Lagerung ohne TetR in Puffer dazu führen, dass die Bindfähigkeit der Oberfläche abnimmt. Offenbar verhindert die trockene Lagerung der Chipoberfläche mit gebundenem Repressor, dass Veränderungen am *tetO* auftreten, die dazu führen, dass TetR nicht mehr oder weniger gut an den Operator bindet. Die Lagerung der Chipoberfläche mit gebundenem TetR sollte Veränderungen des *tetO* auf der Oberfläche verhindern, die dazu führen, dass TetR nicht mehr gebunden werden kann. Schon geringe Abweichungen der Struktur von *tetO* können die Bindung von TetR behindern oder unterbinden. Beispielsweise löst sich TetR von *tetO* ab, wenn sich die *tetO*-bindenden α -Helices der TetR-Untereinheiten um mehr als 3 Å voneinander entfernen [67]. Sollten bei der Chiplagerung Veränderungen an *tetO* auftreten, die die Struktur beeinflussen, so kann dies eine geringere TetR-Bindung nach dem Wiedereinbau des Sensorchips erklären.

Unter prokaryotischen Repressorproteinen finden sich viele, die – wie TetR - über Helix-Turn-Helix-Motive an DNA binden. Diese Anordnung erklärt einerseits die hohe Spezifität der Bindung und trägt darüber hinaus zur Stabilisierung des DNA-Protein-Komplexes bei. Von Hitzeschockproteinen ist bekannt, dass sie bei DNA/Histonen komplexierend und stabilisierend wirken; wahrscheinlich stabilisiert auch im vorliegenden Fall die Bindung von TetR die *tetO*-Oberfläche.

Arbeitsbereich von Kalibrierkurven nach der Lagerung von Sensorchips

Da das Ziel des Screening-Tests letztendlich die Bestimmung von Tetracyclinen ist, wurde geprüft, ob und wie sich der Arbeitsbereich von Kalibrierkurven in Probenpuffer im Laufe der Lagerung der Sensorchips unter verschiedenen Bedingungen verändert. Dazu wurden auf den Sensorchips nach einer bestimmten Lagerdauer Kalibrierkurven im Bereich von 0-200 ng ml⁻¹ Tetracyclin aufgezeichnet.

Tabelle 6-19: Arbeitsbereich der Kalibrierung bei Tetracyclinkonzentrationen von 0 – 200 ng/ml, Differenz zwischen Blank und höchstem Kalibranten (höchste Tetracyclinkonzentration) auf den unterschiedlich gelagerten Sensorchips im zeitlichen Verlauf der Lagerung. Immobilisierungslevel Chip 14 und 15 ca. 1200 RU, Chip 1 und 2 ca. 900 RU

Lagerdauer [d]	Lagerung trocken, Arbeitsbereich [Δ RU]			Lagerung in Puffer, Arbeitsbereich [Δ RU]		
	Chip 1 (ohne TetR)		Chip 14 TetR	Chip 2 (ohne TetR)		Chip 15 TetR
	Flusszelle 1	Flusszelle 2	Flusszelle 1	Flusszelle 1	Flusszelle 2	Flusszelle 1
0	549	619	936	588	601	973
2	502	551		532	557	
6			1073			977
9	363	415		365	228	
13			1013			730
21	315	369		322	315	
30			1009			824

Analog mit der in Tabelle 6-18 gezeigten Abnahme der TetR-Bindung nimmt für die Flusszellen, die ohne TetR gelagert wurden, auch der Arbeitsbereich der Kalibrierung im Laufe der Lagerung stark ab (Tabelle 6-19). Ergebnisse von Möller zeigen, dass bei verschiedenen hohen Beladungen des *tetO* mit Repressor durch dieselbe Tetracyclinkonzentration unterschiedliche Mengen Repressor abgelöst wurden. Je höher die Beladung mit Repressor, desto mehr Repressor wurde von 20 ng/ml Tetracyclin abgelöst [188]. Der geringere Arbeitsbereich der Kalibrierkurven ist hier auf den gleichen Effekt zurückzuführen: wie in Tabelle 6-18 gezeigt, sinkt die Beladung des *tetO* mit Repressor. Die Ablösung von TetR durch Tetracyclin sank von 527 RU an

Tag 0 (Chip 1, Flusszelle 1, Tetracyclinkonzentration 20 ng/ml) auf 324 RU an Tag 21; somit wurde durch dieselbe Menge Tetracyclin weniger Repressor abgelöst. Aufgrund dessen verringert sich auch der Arbeitsbereich der Kalibrierung. Bei den mit TetR gelagerten Flusszellen korreliert der Arbeitsbereich mit der TetR-Bindung. Die trocken mit TetR gelagerte Flusszelle zeigt neben einer stabilen TetR-Bindung auch einen relativ konstanten Arbeitsbereich für die Kalibrierung.

Die Lagerung ohne TetR führte zu keinen zufrieden stellenden Ergebnissen, da sowohl bei der trockenen Lagerung als auch bei der Lagerung in Puffer ein deutlicher Rückgang der Bindefähigkeit der *tetO*-Oberfläche für TetR zu verzeichnen war und damit einhergehend auch der Arbeitsbereich der Kalibrierung abnahm. Die trockene Lagerung mit TetR ist der in Puffer vorzuziehen, da keine Diffusion des TetR vom *tetO* auftritt. Im Fall der trockenen Lagerung mit TetR wurde eine ausreichende Lagerstabilität der *tetO* -Sensorchips erreicht. Diese bedeutet einen Gewinn an Flexibilität, da nicht zwangsläufig eine große Probenzahl vorliegen muss, bevor es sich lohnt, den Sensorchip für die Tetracyclinanalytik einzubauen.

Nach diesen Untersuchungen wurde die Lagerung der Sensorchips standardmäßig durchgeführt wie folgt: Nach dem Ausbau des Chips wurde dieser aus seiner Schutzkassette geschoben und mittels einer Kolbenhubpipette 8 µl 1 µM TetR in Laufpuffer auf die Sensoroberfläche dosiert. Der Sensorchip wurde im Stickstoffstrom getrocknet und in der Schutzkassette in Greinertubes, die mit Blaugel beschickt waren, im Kühlschrank aufbewahrt.

Eine „Lagerung“ von mit *tetO* funktionalisierten, ungenutzten Sensorchips im SPR-Gerät sollte vermieden werden. Der Sensorchip liegt im SPR-Gerät nach Ende einer Messung regeneriert vor, das heißt ohne TetR auf der Oberfläche, so dass ein Verbleiben des Chips im Gerät einer Lagerung der Oberfläche ohne TetR in Puffer gleichkommt. Zudem werden im Standby-Modus (siehe Kapitel 4.2, Seite 48) des SPR-Gerätes (wird automatisch nach Ende einer Messung eingestellt) die Flusszellen kontinuierlich mit Laufpuffer durchströmt (Flussrate 5 µl/min), was eine Veränderung der Verfügbarkeit von *tetO* für TetR ermöglicht. Die Verfügbarkeit von Operator für die

Bindung von Repressor sollte in regelmäßigen Abständen und beim Auftreten von Unregelmäßigkeiten bei den Messungen geprüft werden, indem die maximale Repressorbindung R_{max} auf den einzelnen Flusszellen bestimmt wird. Eine Abnahme der Repressorbindung- gegebenenfalls einhergehend mit dem Abfall der Basislinie zeigt hier die Abnahme der Verfügbarkeit von Operator für die Bindung an.

6.3.3 Einfluss der *tetO*-Variante auf die Lagerstabilität

Von Möller wurde die TetR-Bindung an verschiedene *tetO*-Varianten bestimmt [1]. Dabei ließen sich geringe Unterschiede feststellen. Es wurde geprüft, ob sich hinsichtlich der Lagerstabilität der *tetO*-Varianten Unterschiede zeigten und dadurch ein Argument für die Verwendung der einen oder der anderen Variante liefern. Es wurden die Varianten „2x Biotin“ (jeder *tetO*-Doppelstrang trägt 2 Biotinmoleküle, jeweils ein Biotin an jedem Ende) und „1x Biotin“ (der größte Teil der *tetO*-Doppelstränge trägt nur an einem Ende ein Biotin) getestet, bis zu diesem Zeitpunkt wurden die Messungen mit der Variante „2x Biotin“ durchgeführt. Um identische Lagerbedingungen zu gewährleisten, wurde auf einer Flusszelle eines Sensorchips die Variante „1x Biotin“ und auf einer weiteren Flusszelle desselben Chips die Variante „2x Biotin“ immobilisiert. Die Lagerung erfolgte mit TetR auf der Sensorchipoberfläche über Trockenmittel bei 4-8 °C. Die Lagerdauer betrug insgesamt elf Wochen. Zur Beurteilung der Lagerfähigkeit wurden Kalibrierkurven im Bereich von 0 bis 200 ng/ml Tetracyclin verglichen. Die erhaltenen Kalibrierkurven sind in Abbildung 6-30 und Abbildung 6-31 dargestellt.

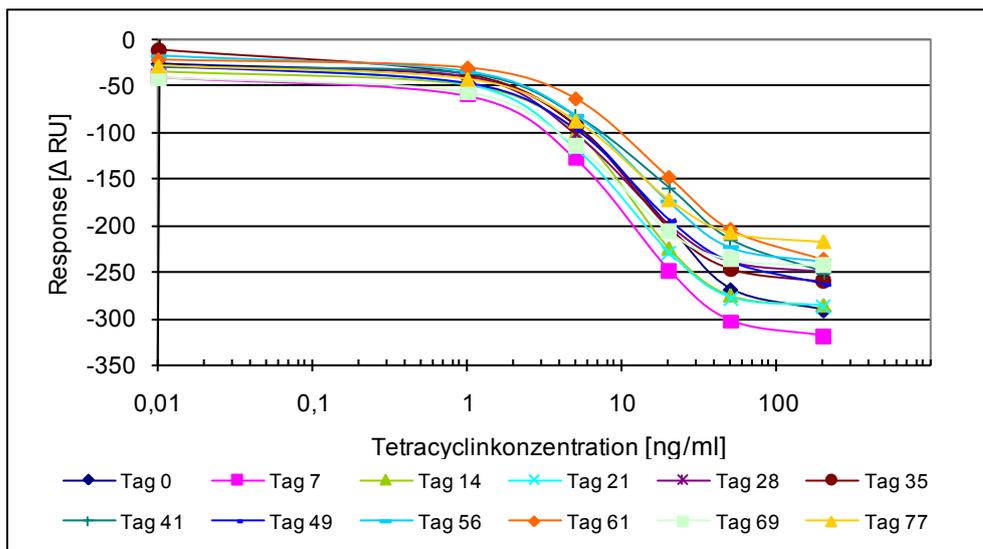


Abbildung 6-30: Kalibrierkurven von Tetracyclin im Verlauf der Lagerung des Sensorchips, tetO-Variante 2x Biotin, Lagerung mit TetR auf der Oberfläche über Trockenmittel bei 4-8 °C

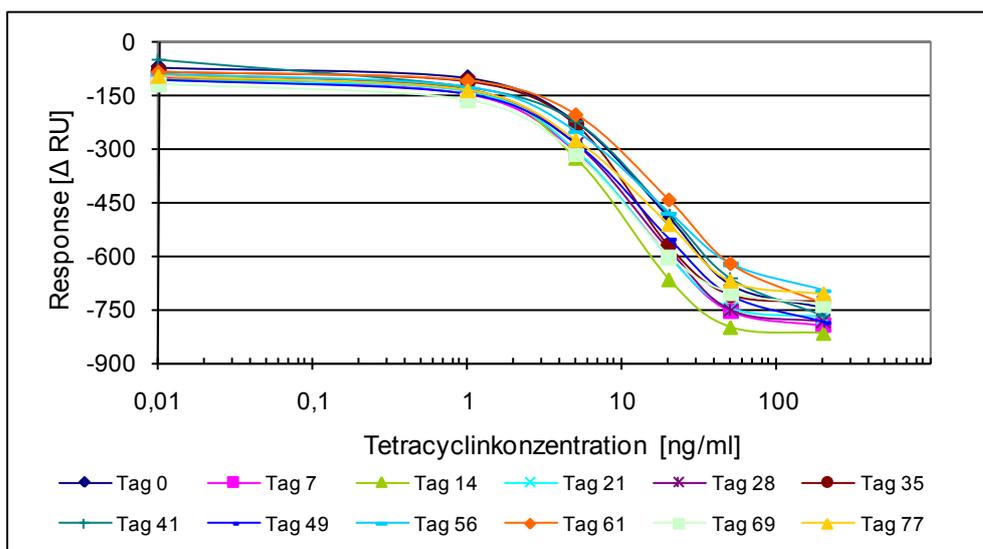


Abbildung 6-31: Kalibrierkurven von Tetracyclin im Verlauf der Lagerung des Sensorchips, tetO-Variante 1x Biotin, Lagerung mit TetR auf der Oberfläche über Trockenmittel bei 4-8 °C

Der Vergleich der Abbildungen zeigt, dass auf der mit *tetO* 1x Biotin belegten Flusszelle ein deutlich höherer Arbeitsbereich für die Kalibrierkurven erhalten wurde. Dieser ist auf stark verschiedene Immobilisierungslevel (2x Biotin: 327 RU, 1x Biotin 1045 RU) zurückzuführen. Aufgrund des höheren Immobilisierungslevels zeigte die Flusszelle mit der *tetO*-Variante 1x Biotin eine deutlich höhere Bindefähigkeit für TetR und damit einhergehend auch einen größeren Arbeitsbereich bei der Kalibrierung.

Aus den Kalibrierkurven wird die Empfindlichkeit des Assays über den IB_{50} -Wert berechnet. Der IB_{50} -Wert beschreibt die Tetracyclinkonzentration bei 50%iger TetR-Ablösung, je niedriger der Wert ist, desto empfindlicher ist das System.

Tabelle 6-20: Empfindlichkeit des Assays berechnet aus Kalibrierkurven mit Tetracyclin-Standardlösungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Chip Lagerung, zur Erklärung der IB_{50} -Werte siehe Text.

Lagerdauer [d]	0	7	14	21	28	35	41	49	56	61	69	77
IB_{50}-Wert 1x Biotin [ng/ml]	13,1	9,6	8,4	9,2	10,1	10,2	13,5	11,6	12,1	16,7	8,4	10,3
IB_{50}-Wert 2x Biotin [ng/ml]	11,7	8,8	9,7	7,9	8,3	8,3	14,3	10,0	9,9	15,0	7,2	8,7

Die Empfindlichkeit des Assays liegt für beide tetO-Varianten in derselben Größenordnung, wurde also durch die geringere TetR-Bindung an tetO 2x Biotin nicht negativ beeinflusst (Tabelle 6-20). Dies stimmt mit Ergebnissen von Möller überein, nach denen der die Bindung von Repressor mit dem Immobilisierungslevel korreliert ist, jedoch keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit des Screeningtests zeigt [188].

Es ist nicht bekannt, ob die tetO-Variante 2x Biotin bei der Immobilisierung mit beiden biotinmarkierten Enden an das Streptavidin der Chipoberfläche bindet oder nur mit jeweils einem Ende. Daher besteht zum einen die Möglichkeit, dass das Oligonucleotid durch die Bindung beider Enden an die Oberfläche gespannt wird und sich unter Spannung die räumliche Anordnung der DNA so ändert, dass TetR mit einer geringeren Affinität gebunden wird. Zum anderen könnte, sofern nur ein biotinmarkiertes DNA-Ende an die Chipoberfläche bindet, die Bindung des Repressors durch das Biotinmolekül sterisch behindert werden.

Weder Basislinie noch der Arbeitsbereich der Kalibrierungen nahm im Zeitraum von etwa 3 Monaten ab, auch die TetR-Bindung blieb relativ konstant. Die Lagerung mit TetR auf der Oberfläche lieferte für beide tetO-Varianten zufrieden stellende Ergebnisse und auch nach dem Chipausbau vergleichbare Werte.

Keine der beiden *tetO*-Varianten hob sich hinsichtlich der Stabilität der Sensorchips von der anderen ab. Im Folgenden wurde aufgrund der von Möller beschriebenen höheren Bindung des Repressors an die Variante *tetO* 1x Biotin [188] im Folgenden ausschließlich mit dieser Variante gearbeitet.

6.3.4 Lagerstabilität der *tetO*-Sensorchips bei verschiedenen Temperaturen

Nachdem in 6.3.2 geeignete Lagerbedingungen für die Sensorchips ermittelt wurden, sollte geprüft werden, ob und inwieweit verschiedene Lagertemperaturen zu Veränderungen der Chipoberfläche führen und die Bindung von Repressor beeinträchtigen. Dazu wurden mit *tetO* 1x Biotin belegte SA-Chips (Immobilisierungslevel ~1000 RU) für 5 Wochen bei verschiedenen Temperaturen gelagert. Um auszuschließen, dass die wiederholte Untersuchung eines Chips zu verschiedenen Zeitpunkten die Ergebnisse beeinflusst, wurde nach dem in Tabelle 6-21 gezeigten Schema vorgegangen. Lediglich bei 4-8 °C wurde ein Chip gelagert, der nicht nur zu Beginn und Ende der Lagerdauer, sondern wöchentlich untersucht wurde (Arbeitschip).

Tabelle 6-21: Lagerdauer und -temperatur zur Ermittlung der Lagerstabilität der Sensorchips, jeder Buchstabe kennzeichnet jeweils einen Chip, Tag 0 beschreibt den Tag, an dem die Chips mit *tetO* immobilisiert wurden, die angegebenen Wochen die Lagerzeit.

Temperatur [°C]	Tag 0	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5
-20	A – E	A	B	C	D	E
4-8	F	F	F	F	F	F
4-8	G					G
25	H - I	H	I			
37	J – K	J	K			

Die Stabilität wurde anhand der maximalen Bindung des Tet-Repressors R_{\max} (siehe Kapitel 6.2, Seite 116) und von Kalibrierkurven mit Tetracyclinlösungen bewertet. Am Tag der Immobilisierung wurden dazu auf dem zu lagernden Chip für beide Parameter Referenzmessungen durchgeführt. Die Bestimmung der maximalen Repressorbindung dient dazu, zu erkennen, ob und in welchem Maße durch die Temperatur oder Dauer der

Lagerung Veränderungen an der Sensorchipoberfläche auftreten. Für eine ausreichende Lagerstabilität gilt, dass die maximale Bindung nicht unter 50% des Wertes der Referenzmessung absinken sollte [209].

Abbildung 6-32 zeigt die maximale Repressorbindung auf den einzelnen Sensorchips.

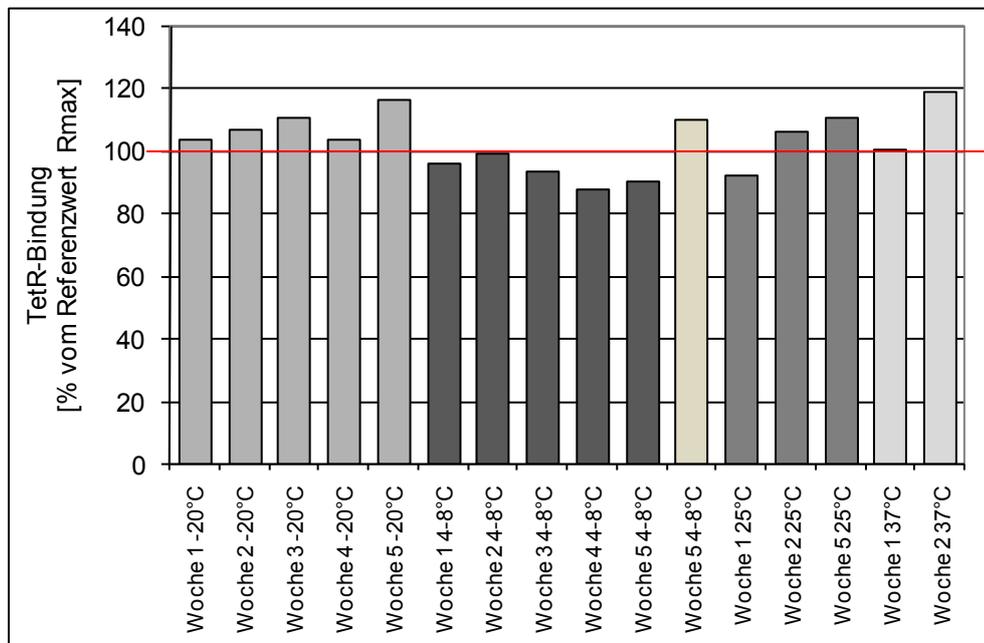


Abbildung 6-32: maximale TetR-Bindung (R_{max}) nach der Lagerung der Sensorchips bei verschiedenen Temperaturen, angegeben ist die maximale TetR-Bindung prozentual zu dem auf dem Chip gemessenen Referenzwert am Tag 0, TetR 1 μ M, Injektionsvolumen 10 μ l bei einer Flussrate von 10 μ l/min

Bei den Lagertemperaturen -20 °C, 25 °C und 37 °C war die TetR-Bindung jeweils gleich oder höher als der Referenzwert (Abbildung 6-32). Lediglich für den wöchentlich verwendeten Chip, der bei 4-8 °C gelagert war (in der Abbildung dunkelgrau dargestellt), zeigte sich ein geringfügig niedrigerer R_{max} -Wert als bei der Referenz. Für die Lagerung bei 25 und 37 °C zeichnete sich ein Trend zu höherer Maximalbindung mit steigender Lagerdauer ab. Daraus ist abzuleiten, dass auch höhere Temperaturen die Oberfläche nicht negativ beeinträchtigen und die Sensorchips bei der Lagerung relativ unempfindlich gegenüber Temperaturschwankungen sind.

Die maximale Repressorbindung betrug unter den verschiedenen Lagerbedingungen in keinem Fall weniger als 87% des Referenzwertes. Aus den Kalibrierkurven nach Lagerung bei verschiedenen Lagertemperaturen ließ sich ablesen, dass der Arbeitsbereich – also die Signaldifferenz gemessen bei der höchsten und der niedrigsten Konzentration - mit dem Immobilisierungslevel für *tetO* korreliert ist. Je mehr *tetO* auf

der Chipoberfläche gebunden war, desto mehr Bindungsstellen stehen für TetR zur Verfügung, desto höher ist demzufolge die TetR-Bindung. Die nach der Lagerung aufgezeichneten Kalibrierkurven zeigten einen akzeptablen Arbeitsbereich (> 300 RU). Aus der Lagerung bei „Extremtemperaturen“ wie 37 °C kann die maximale Lagerdauer bei geringeren Temperaturen abgeschätzt werden; so wird beispielsweise als Faustregel angenommen, dass ein Sensorchip, der bei 37 °C für zwei Wochen stabil ist, bei $4\text{-}8\text{ °C}$ für circa ein Jahr ohne Stabilitätsverlust gelagert werden kann [209]. Die Ergebnisse zeigen demnach, dass die Sensorchips auch für den Zeitraum von einem Jahr bei $4\text{-}8\text{ °C}$ lagerfähig sein sollten. Da sich die Ergebnisse für die verschiedenen Temperaturen nicht wesentlich unterscheiden, lässt sich darüber hinaus folgern, dass die Sensorchips unempfindlich gegenüber Temperaturschwankungen sind.

Hinsichtlich der Bindefähigkeit für den Repressor und des Arbeitsbereiches für Kalibrierkurven sind die Sensorchips unter allen getesteten Temperaturen stabil.

Bei der Lagerung bei $4\text{-}8\text{ °C}$ wurde, da dies – weil in den meisten Laboratorien ohne großen gerätetechnischen Aufwand möglich - die angestrebte Lagertemperatur darstellt, im Weiteren geprüft, ob ein **häufiger Einbau** und die Verwendung des Chips sich negativ auf die Lagereigenschaften auswirken. Dazu wurde ein Chip für 5 Wochen bei $4\text{-}8\text{ °C}$ gelagert und am Tag 0 und nach 5 Wochen gemessen („**Lagerchip**“), ein weiterer Chip wurde ebenfalls 5 Wochen bei $4\text{-}8\text{ °C}$ gelagert, jedoch wöchentlich gemessen („**Arbeitschip**“).

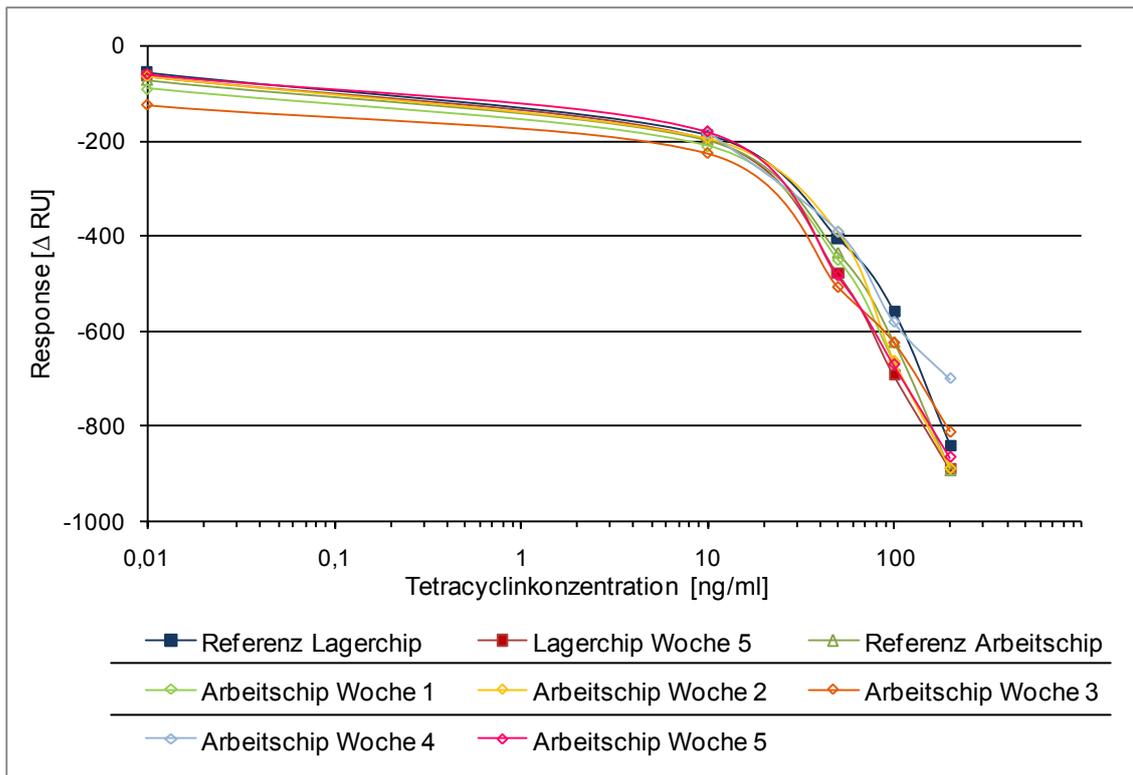


Abbildung 6-33: Vergleich zweier bei 4-8 °C gelagerter Sensorchips, tetO-Variante 1x Biotin, Beladungsdichte Arbeitschip 1029 RU, Lagerchip 929 RU; Kalibrierkurven aufgezeichnet zu verschiedenen Zeitpunkten der Lagerung. Auf dem „Arbeitschip“ wurden wöchentlich Kalibrierkurven gemessen, auf dem „Lagerchip“ nur am Anfang und am Ende der Lagerperiode (5 Wochen)

Abbildung 6-33 zeigt den Vergleich der Kalibrierkurven für die während der Lagerung verschieden genutzten Sensorchips. Die Kalibrierkurven zeigen einen breiten Arbeitsbereich von etwa 800 RU und eine gute Übereinstimmung der Werte der Kalibrierkurven. Unterschiede durch die wiederholte Verwendung des Arbeitschips während der Lagerdauer ließen sich nicht erkennen. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Sensorchips mit *tetO* auf der Chipoberfläche als stabil zu betrachten sind.

6.3.5 Lagerstabilität des Tet-Repressors

Ebenso wie die Lagerstabilität des *tetO* auf der Chipoberfläche muss für eine routinemäßige Verwendung des Assays auch die Stabilität von TetR gewährleistet sein. Es war zu untersuchen, ob gelagertes TetR noch in gleichem Maße von Tetracyclin aus der *tetO*-Bindung gelöst wird, wie frisch verdünnte Stammlösungen. Als Maß dafür wurden die Δ RU-Werte bei der Injektion von tetracyclinhaltigen und tetracyclinfreien

Pufferlösungen verglichen. Die Lagerung von TetR erfolgte in Aliquoten einer 5 μM -Lösung in Laufpuffer mit Zusatz von BSA und Natriumazid bei den Temperaturen 4-8 °C, 25 °C und 37 °C. BSA im Puffer sollte die Adsorption von Protein an die Behältnisoberfläche verhindern, Natriumazid wurde zur Konservierung zugesetzt. Am Tag 0 wurden Referenzmessungen mit der an diesem Tag hergestellten TetR-Lösung durchgeführt, auf die die späteren Ergebnisse bezogen wurden. Die folgende Tabelle zeigt, nach wie vielen Wochen die bei einer bestimmten Temperatur gelagerten Aliquote untersucht wurden.

Tabelle 6-22: Lagertemperaturen und -dauer für die Stabilitätsstudien am Tet-Repressor

Temperatur [°C]	Tag 0	Woche 1	Woche 3	Woche 6
4-8		X	X	X
25	X		X	X
37		X	X	

Vor der Messreihe wurden die gelagerten Aliquote auf Raumtemperatur temperiert und mit Laufpuffer auf 1 μM verdünnt. Da zum Zeitpunkt der Messungen die Lagerstudien der Sensorchips noch nicht abgeschlossen waren, wurde für jeden Messzeitpunkt eine neue Flusszelle mit *tetO* belegt.

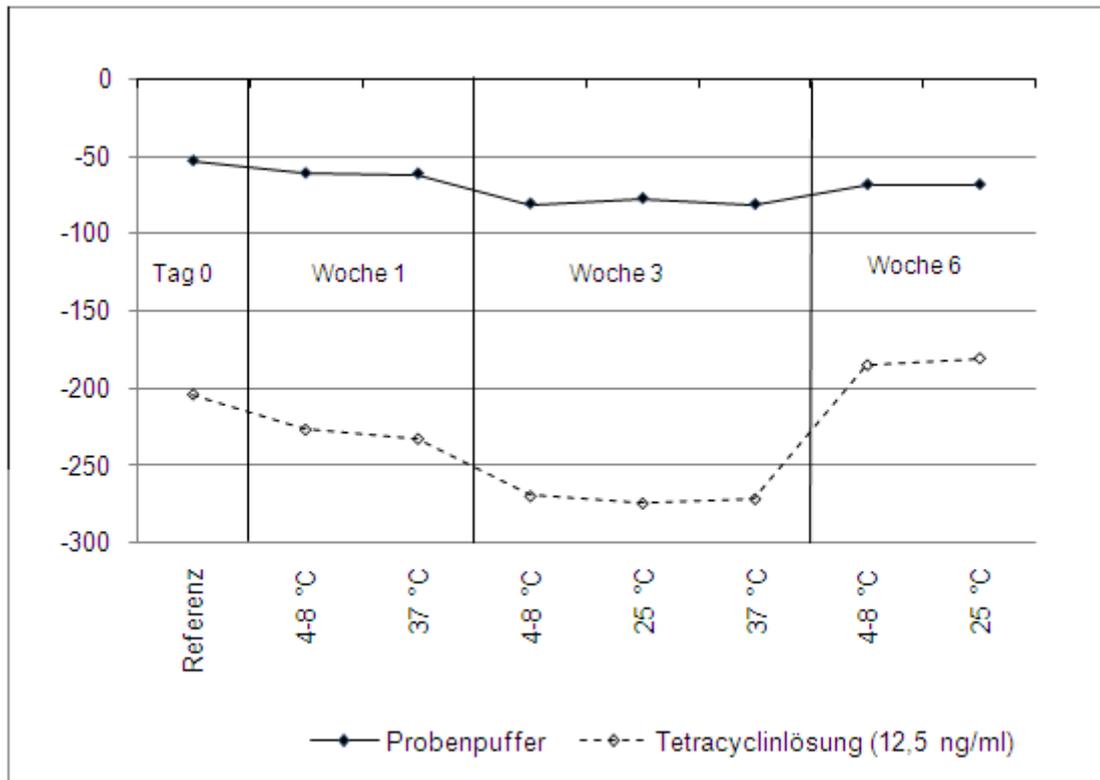


Abbildung 6-34: Ablösung von TetR durch Pufferlösungen ohne und mit 12,5 Tetracyclin nach Lagerung von 5 μ M TetR-Lösung bei verschiedenen Temperaturen, Mittelwerte aus 3 Verdünnungen der gelagerten Tetracyclinlösung (1 μ M).

Abbildung 6-34 zeigt, dass die Differenz zwischen positiver und negativer Probe in der Referenzmessung circa 150 RU betrug. Nach einer und drei Wochen Lagerung war die Differenz sogar größer als zum Zeitpunkt Tag 0. Lediglich nach 6 Wochen Lagerdauer war sie auf etwa 100 RU verringert. Aus Abbildung 6-34 wird deutlich, dass die Lagertemperatur sich nicht auf die Möglichkeit des TetR auswirkt, Tetracyclin zu binden. Zwar ergaben sich unterschiedliche Messwerte zu den einzelnen Lagerzeitpunkten, diese aber unabhängig von den Lagertemperaturen. Dies lässt vermuten, dass es sich bei allen Schwankungen um einen Effekt handelt, der auf unterschiedliche Immobilisierungslevel der Flusszellen zurückzuführen ist. Die Immobilisierungslevel für die verwendeten Flusszellen variierten zwischen 1038 RU (Tag 0) bis 1211 RU (Woche 3).

Die Bindung von TetR an immobilisiertes *tetO* ist unabhängig von Lagerdauer und Lagertemperatur des Repressorproteins. Die Bindungsfähigkeit für Tetracyclin - und

damit die Ablösung von TetR durch Tetracyclin ist ebenfalls als stabil zu betrachten, auch hier konnte kein Einfluss der Lagertemperatur festgestellt werden.

Einfrieren von TetR-Lösungen

Im Rahmen der Untersuchung der Lagerstabilität der Sensorchips wurde die maximale TetR-Bindung an die Sensorchips bestimmt (R_{\max}). Um identische Bedingungen zu gewährleisten, wurde dafür am Tag der Immobilisierung des ersten Chips TetR-Lösung $1 \mu\text{M}$ (Arbeitslösung) in Laufpuffer hergestellt, die als Referenz gemessen und dann eingefroren wurde. Da nicht sicher war, ob die Bildung von Eiskristallen beim Einfrieren zur Denaturierung von TetR führt, wurden für die Messungen von R_{\max} neben den aufgetauten auch frisch verdünnte Arbeitslösungen von TetR in Laufpuffer gemessen und mit den eingefrorenen verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6-35 dargestellt.

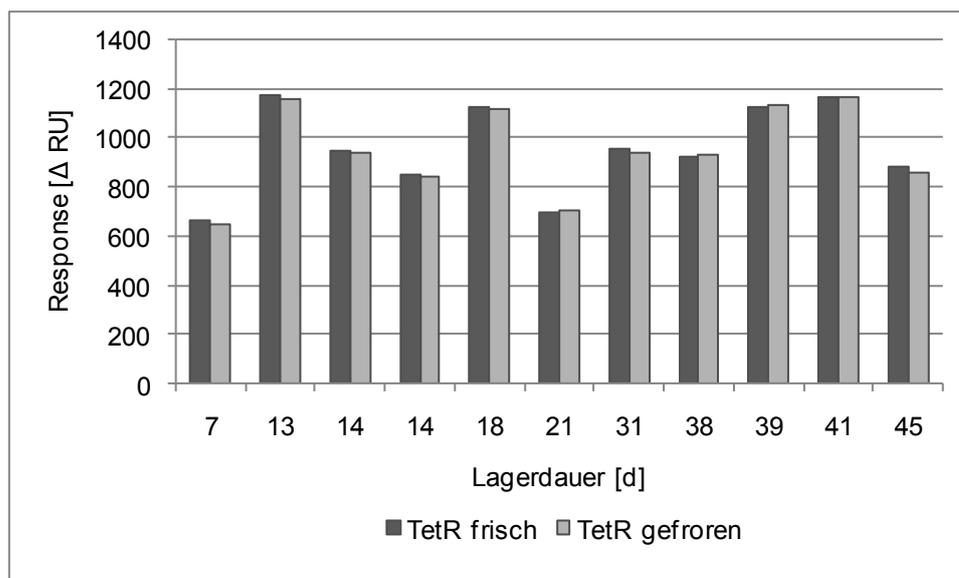


Abbildung 6-35: Gegenüberstellung der Bindung von TetR ($1 \mu\text{M}$) an *tetO* 1x Biotin bei frisch verdünnten TetR und aufgetautem, gelagertem TetR. Injektionsvolumen $10 \mu\text{l}$, Fluss $10 \mu\text{l}/\text{min}$. Unterschiede im Response sind auf unterschiedliche Immobilisierungslevel der Chips zurückzuführen, auf denen die Messungen durchgeführt wurden.

Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen frisch verdünnten und eingefrorenen TetR-Lösungen festgestellt. Das Einfrieren von TetR-Lösungen und die Bildung von Eiskristallen in der Lösung führen nicht zur Beeinträchtigung der Bindefähigkeit zum *tetO*. TetR ist damit als äußerst stabil und unproblematisch hinsichtlich Lagertemperatur und Lagerdauer anzusehen.

6.3.6 Stabilität von Tetracyclinlösungen

Zur Stabilität der Tetracyclinlösungen wurden die folgenden Parameter geprüft: Lagerdauer, Temperatur, Konzentration der Lösung, Einfluss des Lösungsmittels und die Verwendung von Glas- bzw. Kunststoffgefäßen.

Für die Untersuchung der Lagerdauer in Abhängigkeit von der Temperatur und Konzentration wurde eine Tetracyclin-Stammlösung (1 mg/ml) sowie Verdünnungen (10, 50, 100 und 200 ng/ml Tetracyclin) in Braunglasvials unter Lichtausschluss gelagert bei verschiedenen Temperaturen (-20 °C, 4-8°C, 25 °C und 37 °C) gelagert. Die Lagerdauer betrug insgesamt 6 Wochen, Messungen erfolgten nach 1, 3 und 6 Wochen Lagerdauer. Für eine Referenz-Kalibrierkurve wurde kristallines Tetracyclinhydrochlorid frisch eingewogen und entsprechend in Probenpuffer verdünnt.

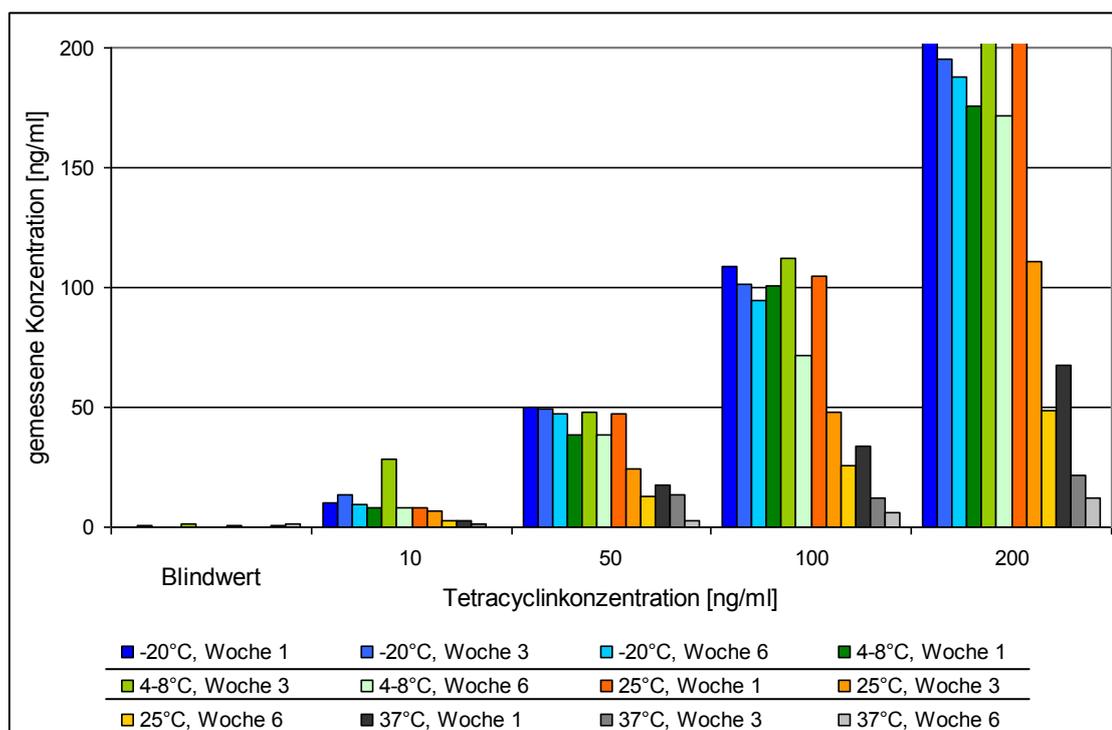


Abbildung 6-36: Einfluss von Lagerdauer und Temperatur auf Stammlösungen von 1 mg/ml Tetracyclin. Für die Messung wurde mit Probenpuffer auf 10, 50, 100 und 200 ng/ml verdünnt.

Abbildung 6-36 zeigt den Einfluss von Lagerdauer und –temperatur auf die gemessene Tetracyclinkonzentration nach der Lagerung von Standardlösungen. Der Vergleich der Konzentrationen bei einer bestimmten Lagertemperatur zeigt, dass mit zunehmender Lagerdauer weniger Tetracyclin in der Lösung gemessen wird. So wird beispielsweise während der Lagerung bei 25 °C nach einer Woche noch ca. 100% der anfangs

vorhandenen Tetracyclinkonzentration nachgewiesen. Nach drei Wochen ist dieser Wert bereits auf etwa 50% gesunken, und nach sechs Wochen wird nur noch circa ein Viertel der ursprünglichen Konzentration gefunden. Bei einer höheren Lagertemperatur ist der Verlauf noch deutlicher: bei 37 °C wird nach einer Woche Lagerung nur noch 35% Tetracyclin gefunden, nach drei Wochen noch etwa 10%, während nach sechs Wochen nunmehr 6% nachgewiesen werden können. Die Tetracyclinkonzentration, die vom System erfasst wird, nimmt mit zunehmender Lagerdauer ab. Darüber hinaus wird auch der Einfluss der Lagertemperatur deutlich: je höher die Lagertemperatur ist, desto instabiler die Lösung. Dies war erwartet worden, da Reaktionen, die zum Abbau von Tetracyclin oder zur Epimerisierung führen bei höheren Temperaturen schneller ablaufen, beziehungsweise sich entsprechende Gleichgewichte schneller einstellen.

Die Lagerung von Tetracyclinstammlösungen im Gefrierschrank oder im Kühlschrank gewährleistet einen langsamen Ablauf von Reaktionen und daher auch nach sechs Wochen noch eine akzeptable Wiederfindung von etwa 95% (Gefrierschrank) und um 80% (Kühlschrank). Als Maß für die Haltbarkeit gilt eine Wiederfindung nach der Lagerung von mindestens 95% [209].

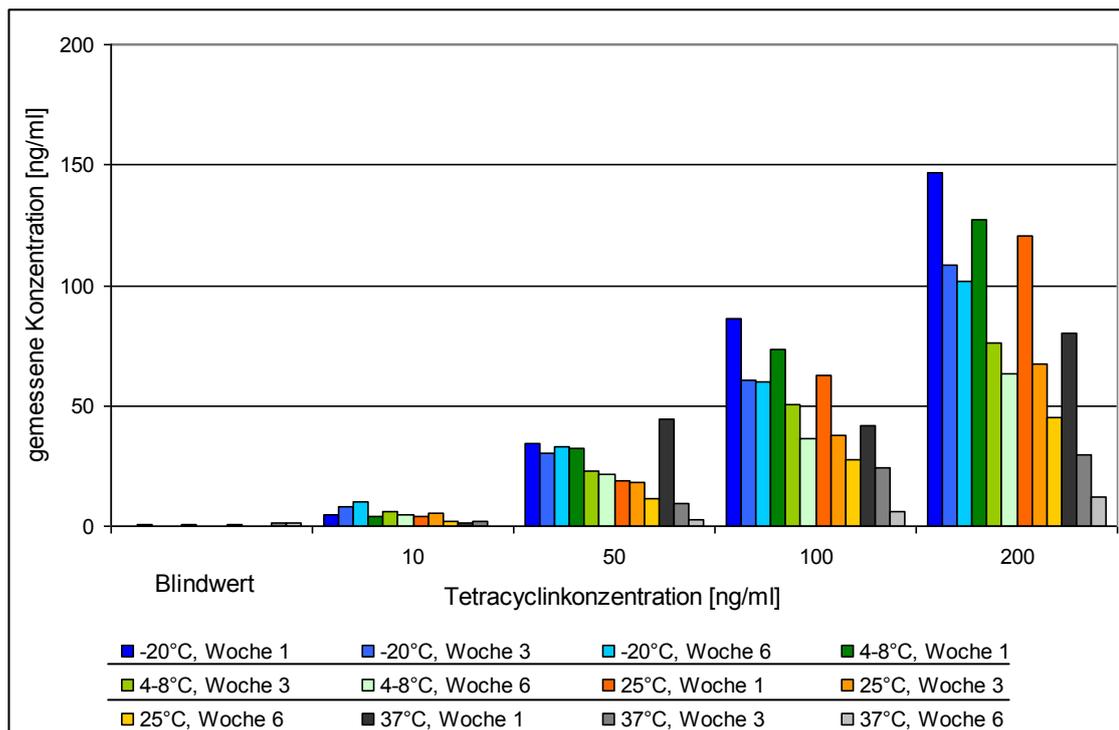


Abbildung 6-37: Einfluss von Lagerdauer (1 bis 6 Wochen) und Temperatur (-20 °C, 4-8 °C, 25 °C und 37 °C) auf die Wiederfindung von Tetracyclin, Lagerung der verdünnten Tetracyclinlösungen.

Die Lagerstabilität von verdünnten Arbeitslösungen wird ebenfalls stark von Lagerdauer und –temperatur beeinflusst (Abbildung 6-37); übereinstimmend mit dem Verhalten der Stammlösungen bei der Lagerung nimmt auch bei den Arbeitslösungen mit zunehmender Lagerdauer und steigender Lagertemperatur die gemessene Konzentration ab. Allerdings ist dieser Effekt deutlich stärker ausgeprägt, so wird bei der Lagerung von Arbeitslösungen bereits nach einer Woche für keine Lagertemperatur mehr als 75% der ursprünglichen Tetracyclinkonzentration nachgewiesen. Für die bei 37 °C gelagerten Lösungen lag die Wiederfindung schon nach einer Woche unter 50%. Die Lagerung von Arbeitslösungen ist auch über einen kurzen Zeitraum nicht möglich. Ein Einfluss der Konzentration dahingehend, dass höher konzentrierte Lösungen stabiler sind, ließ sich im Bereich von 10 bis 200 ng/ml Tetracyclin nicht erkennen. Wahrscheinlich sind die Lösungen zu verdünnt, als dass sich die verschiedenen Konzentrationen auswirken. Stammlösungen, die wesentlich besser lagerfähig sind, sind verglichen mit der Konzentration von 200 ng/ml 5000fach konzentrierter.

Die schlechte Wiederfindung von Tetracyclin nach der Lagerung der Lösungen kann verschiedene Ursachen haben: Tetracycline können sich aufgrund der hohen Polarität an die Silanolgruppen von Glasgefäßen anlagern und dort adsorbieren, so dass die Konzentration freien Tetracyclins in der Lösung dadurch abnimmt [211]. Daneben stellt sich während der Lagerung der Lösungen wahrscheinlich ein Epimerisierungsgleichgewicht ein. Epimere der Tetracycline zeigen eine circa 300fach geringere Bindung an TetR verglichen mit Tetracyclin [212], so dass auch die Bildung von Epimeren die im Assay nachweisbare Tetracyclinkonzentration verringert. Letztendlich kann Tetracyclin während der Lagerung auch einem chemischen Abbau unterliegen [24]. Es wurden verschiedene Messungen durchgeführt, die Rückschlüsse darauf zulassen sollten, welche dieser Faktoren während der Lagerung kritisch sind.

Verwendung von Glas- bzw. Kunststoffgefäßen

Um einen Eindruck des Ausmaßes der Adsorption von Tetracyclinlösungen an die Glasoberfläche zu bekommen, wurde die Stabilität von Tetracyclinlösungen in Glas- und Kunststoffvials (HDPE) verglichen. Um ein schnelles Ergebnis zu erhalten, wurden die Lösungen eine Woche bei 37 °C gelagert, da dies hinsichtlich der Temperatur extreme Bedingungen darstellt und schon früh Aussagen erlaubt.

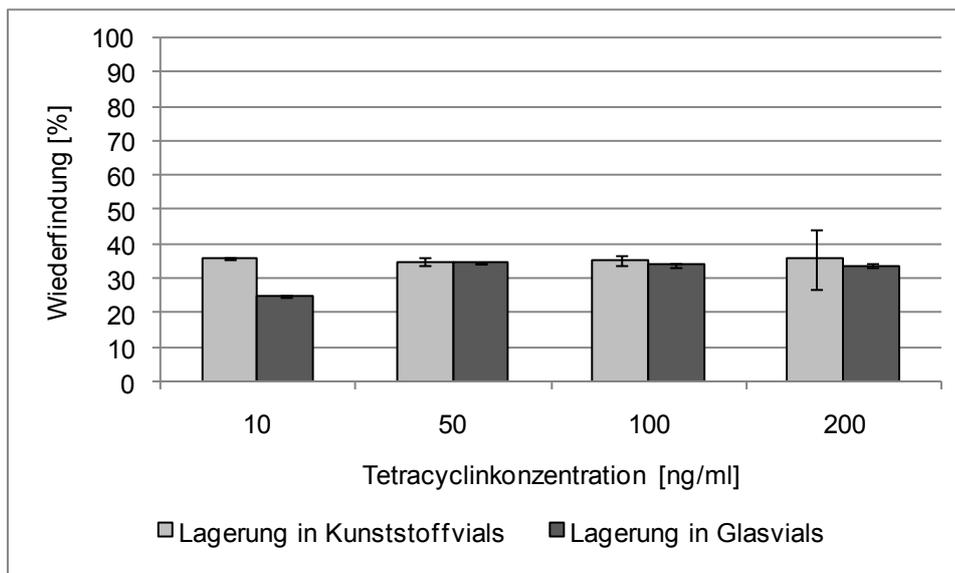


Abbildung 6-38: Einfluss des Materials der zur Lagerung verwendeten Vials, Gegenüberstellung von Glas- und Kunststoffvials, Lagerung einer Tetracyclinstammlösung (1 mg/ml) für eine Woche bei 37 °C, die Stammlösung wurde vor der Messung auf die angegebenen Konzentrationen mit Probenpuffer verdünnt

Die Wiederfindung für Tetracyclin war unabhängig vom Material, in dem die Lösungen gelagert wurden schlecht (Abbildung 6-38); zwischen den Lösungen, die in Glas und Kunststoffvials gelagert wurden bestand kein signifikanter Unterschied. Dies lässt vermuten, dass die Adsorption in gleichem Maße bei Kunststoffvials auftritt oder aufgrund der hohen Konzentration der Stammlösung (1 mg/ml) vernachlässigbar ist. Die von Ciarlone et al. beschriebenen Befunde, wonach weniger Tetracyclin an Polypropylen als an Borosilikatglas adsorbierte konnten hier nicht bestätigt werden, allerdings waren bei Ciarlone Tetracyclinkonzentrationen von 1 bis 10 µg/ml getestet worden [211].

Stabilität von Oxytetracyclin gegenüber Tetracyclin

Inwieweit die Epimerisierung von Tetracyclin zur geringeren Wiederfindung beiträgt, sollte über eine vergleichende Untersuchung von Oxytetracyclin und Tetracyclin festgestellt werden. Oxytetracyclin epimerisiert gegenüber anderen Tetracyclinen sehr langsam, was darauf zurückzuführen ist, dass eine am C5 lokalisierte Hydroxygruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zum Stickstoff am C4 ausbilden und somit der Epimerisierung entgegenwirken kann [24].

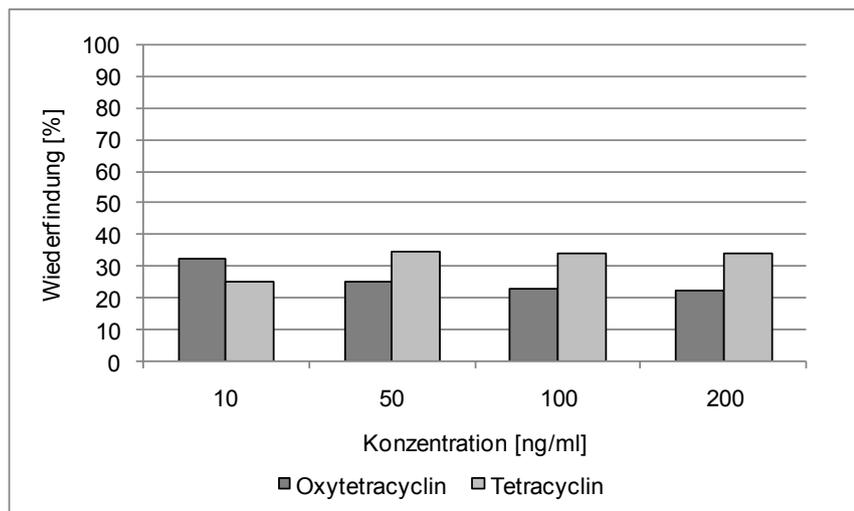


Abbildung 6-39: Gegenüberstellung von Tetracyclin und Oxytetracyclin-Stammlösungen (1 mg/ml), Stammlösungen wurden vor der Messung mit Probenpuffer auf die angegebenen Konzentrationen verdünnt. Lagerung für eine Woche bei 37 °C

Durch die Verwendung von Oxytetracyclin anstelle von Tetracyclin konnte kein Stabilitätsgewinn erreicht werden, sowohl für Oxytetracyclin als auch für Tetracyclin lag die Wiederfindung unter 40%. Ein eindeutiges Rückführen der geringen Wiederfindung auf die Epimerisierung kann daher nicht erfolgen.

Einfluss des Lösungsmittels auf die Lagerstabilität

Die Wiederfindung von Tetracyclin in Probenpuffer pH 7,4 war sehr schlecht, so dass geprüft wurde, ob sich andere Lösungsmittel besser für die Lagerung von Tetracyclinlösungen eignen. Da Tetracyclin sehr polar ist, wurden Methanol und Ethanol als Lösungsmittel für die Lagerung eingesetzt, da hier eine ausreichende Löslichkeit von Tetracyclin gewährleistet war und ebenfalls bekannt war, dass geringe Mengen dieser Lösungsmittel, wie sie nach der Verdünnung mit Probenpuffer vorliegen, das System nicht negativ beeinträchtigen [188].

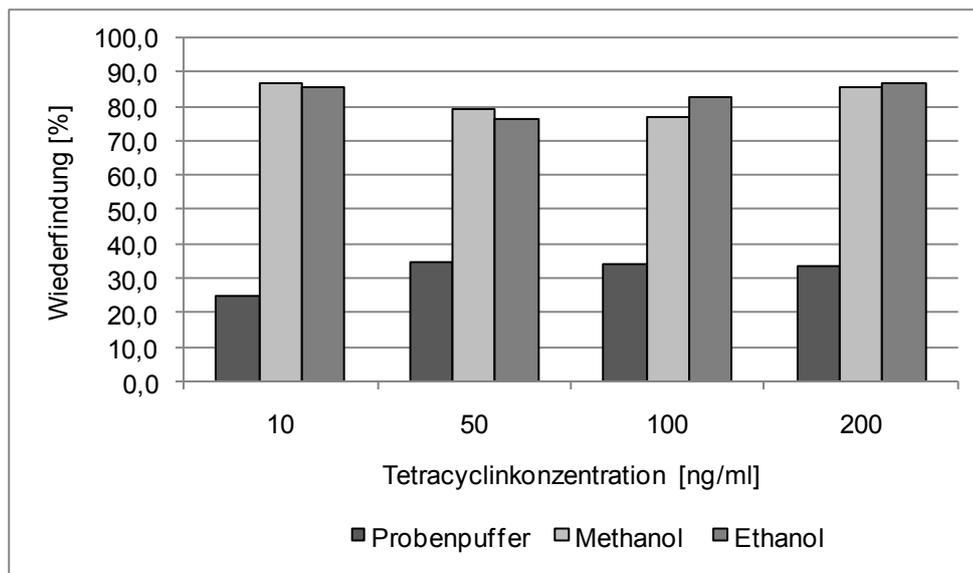


Abbildung 6-40: Gegenüberstellung der Wiederfindung für Tetracyclin. Lagerung der Stammlösung (1 mg/ml) für eine Woche bei 37 °C in verschiedenen Lösungsmitteln, Stammlösungen wurden vor der Messung mit Probenpuffer auf die angegebenen Konzentrationen verdünnt.

Die Verwendung von Methanol oder Ethanol führte gegenüber der Verwendung von Probenpuffer zu deutlich höheren Wiederfindungen, wie in Abbildung 6-40 deutlich wird. Während die Wiederfindung nach Lagerung in Puffer im Mittel bei etwa 33% lag, zeigten Tetracyclinlösungen in Methanol und Ethanol Wiederfindungen von etwa 83% bei einer einwöchigen Lagerung der Stammlösung bei 37 °C. Die Wiederfindung in Methanol und Ethanol unterschied sich nicht signifikant. Es wird deutlich, dass die Stabilität von Tetracyclinlösungen sehr stark vom Lösungsmittel und der Anwesenheit von Puffersalzen abhängt. Von Remmers et al. wurde beschrieben, dass die Epimerisierung von Tetracyclin in Puffer (Citratpuffer oder Phosphatpuffer 1 M) 70mal schneller gegenüber der Epimerisierung in Wasser abläuft [22]; die Anwesenheit von Puffersalzen scheint demnach die Epimerisierung zu begünstigen, was möglicherweise auch hier die schlechtere Wiederfindung bei der Verwendung von Laufpuffer erklären kann. Die gute Wiederfindung in Methanol und Ethanol trotz der hohen Lagertemperatur lässt vermuten, dass bei niedrigeren Temperaturen die Stabilität noch deutlich besser ist. Von Liang et al. wird diskutiert, dass Methanol durch Additions- und Substitutionsreaktionen an den funktionellen Gruppen des Tetracyclin eine wichtige Rolle beim chemischen Abbau von Tetracyclinen spielt. Allerdings wurde in diesen Studien der Abbau von Tetracyclin durch Lagerung der Lösungen über 6 Monate bei Raumtemperatur und Tageslicht forciert, um die Abbauprodukte untersuchen zu

können. Durch Lagerung unter -10 °C und Lichtausschluss wurde hingegen der Abbau von Tetracyclin deutlich verzögert, nach einer Lagerdauer von 2 Monaten wurden hier nur eine geringe Mengen epi-Tetracyclin gefunden [213].

Sollte eine Lagerung von Tetracyclin-Stammlösungen über einen längeren Zeitraum notwendig sein, so sollte diese am besten in Methanol oder Ethanol bei Temperaturen unter -10 °C erfolgen.

6.3.7 Robustheit des Assays im Hinblick auf verschiedene Chargen der verwendeten Reagenzien und Sensorchips

6.3.7.1 Vergleich zweier Chargen TetR

Das Repressorprotein TetR spielt im Assay eine zentrale Rolle, daher wurde die Robustheit des Assays im Hinblick auf verschiedene TetR-Chargen geprüft. Die Chargen wurden von verschiedenen Personen in einem zeitlichen Abstand von etwa zwei Jahren isoliert. Ein Vergleich der Chargen kann anhand der Proteinkonzentration und der über die Fluoreszenzzunahme von Anhydrotetracyclin berechneten Aktivität [86] erfolgen. Darüber hinaus ist für den Screeningtest insbesondere der Vergleich der Bindung an den immobilisierten Operator *tetO* und die Ablösung durch Tetracyclin von Interesse, um die Reproduzierbarkeit zu prüfen.

Tabelle 6-23: Konzentration, Aktivität gegenüber Anhydrotetracyclin und R_{\max} -Wert der Repressorproteine TetR(BD), R_{\max} bestimmt mit *tetO*-Variante 1x-Biotin auf derselben Flusszelle

	Protein-Konzentration [mg/ml]	Protein-Konzentration [$\mu\text{M/l}$]*	errechnete Aktivität [%]	R_{\max} [Δ RU] für eine auf $1\text{ }\mu\text{M}$ verdünnte Lösung
TetR Charge 04⁷	10,14	435,1	107	1234
TetR Charge 07	18,19	781	100	1215

*Die Konzentrationsangabe in $\mu\text{M/l}$ bezieht sich auf das Monomer

Die Proteinkonzentration der beiden Chargen variierte stark, was darauf zurückzuführen ist, dass der letzte Schritt bei der Reinigung des Proteins eine Konzentration von TetR

⁷

188. Möller, N., *Entwicklung eines optischen Biosensor-Assays mit Elementen aus der Resistenzforschung zum Screening auf Tetracyclin-Rückstände in Lebensmitteln*. Dissertation, Fachbereich C Lebensmittelchemie Bergische Universität Wuppertal, 2007

mittels Ultrafiltration ist und die Proteinkonzentration im Wesentlichen vom Volumen der Proteinlösung und der Dauer der Filtration abhängt. Beide Chargen zeigten eine vergleichbare Bindung an den Operator (Tabelle 6-23). Die Abweichung zwischen den Chargen ist mit <1% als sehr gering einzustufen.

Für beide TetR-Chargen wurden Kalibrierkurven mit Tetracyclinlösungen in Puffer aufgezeichnet.

Tabelle 6-24: Zwei TetR-Chargen: Vergleich der Ablösung durch unterschiedliche Tetracyclin-konzentrationen (0 – 200 ng/ml), Messwerte in [Δ RU], Chip belegt mit *tetO* 1xBiotin 957 RU, Injektionsvolumen TetR und Tetracyclinlösung 5 μ l; Fluss 5 μ l/min

Tetracyclinkonzentration [ng/ml]	0	1	5	20	50	200
TetR Charge 04	-60	-79	-143	-304	-513	-870
TetR Charge 07	-60	-79	-144	-303	-513	-874

Die Kalibrierkurven zeigen, dass durch gleiche Tetracyclingehalte unabhängig von der Charge des verwendeten TetR gleich viel TetR abgelöst wird. Bei der SPR-Messung war kein signifikanter Unterschied zwischen den verwendeten TetR-Chargen zu erkennen (Tabelle 6-24). Zwischen Charge 04 und 07 konnten weder Unterschiede in der Bindung an den Operator, noch in der Ablösung durch Tetracyclin festgestellt werden. Hinsichtlich der Verwendung von TetR-Chargen, die im Fluoreszenztest mit Anhydrotetracyclin gleiche Aktivität zeigen, ist der Assay als sehr robust einzustufen. Sollten TetR-Chargen mit geringerer Aktivität verwendet werden, muss die eingesetzte TetR-Konzentration entsprechend korrigiert werden.

6.3.7.2 Vergleich verschiedener *tetO* 1xBiotin-Lösungen

Es sollte überprüft werden, ob die Verwendung unterschiedlicher *tetO* 1xBiotin-Chargen sich auf den Immobilisierungslevel bei der Belegung von SA-Chips auswirkt. Dafür wurden die Immobilisierungslevel, die mit verschiedenen *tetO* 1xBiotin-Lösungen unter denselben Immobilisierungsbedingungen auf derselben Sensorchip-charge erhalten wurden, verglichen. Zur Standardisierung und besseren Vergleichbarkeit der erhaltenen Messwerte wurde bei der Beladung der Sensorchips mit *tetO* ein Immobilisierungslevel von 1000 RU angestrebt.

Für die Belegung der Sensorchips wurde doppelsträngige Operator-DNA verwendet, die aus Oligonucleotidsträngen durch Schmelzen und langsames Abkühlen hergestellt wurde (Annealing; siehe 9.2, Seite 234). Die zur Herstellung des DNA-Doppelstranges verwendeten Oligonucleotide wurden alle von einem Hersteller bezogen. Insgesamt wurden in drei Bestellungen 4 Chargen (2 Chargen mit, 2 Chargen ohne Biotin) Oligonucleotide geliefert. Bei der Herstellung von *tetO* 1x Biotin wurde nicht biotinyliertes *tetO* im Verhältnis 10:1 mit biotinyliertem *tetO* gemischt. Eine Übersicht der Oligonucleotidchargen und der daraus hergestellten *tetO*-Chargen (Variante 1x Biotin) findet sich in den Tabellen Tabelle 6-25 und Tabelle 6-26. Die Herstellung der Operator-DNA erfolgte in einem zeitlichen Abstand von jeweils 4 Monaten. Das Annealing der Operator-DNA wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dies sollte eine Kontamination mit DNAsen vermeiden, um einem enzymatischen Abbau von *tetO* vorzubeugen. Das doppelsträngige *tetO* (50 µl je Ansatz) wurde bei -20 °C gelagert. Für die Belegung der Sensorchips wurde aus einem Aliquot des aufgetauten *tetO* durch Verdünnung mit Laufpuffer die *tetO*-Arbeitslösung hergestellt (siehe dazu auch Kapitel 9.2 und 9.4.1).

Tabelle 6-25: Übersicht der Oligonucleotidchargen zur Herstellung von *tetO*

	Abkürzung	Lieferdatum
Oligonucleotid 1	ON1	01.07.04
Oligonucleotid-Biotin 2	ONB2	03.05.06
Oligonucleotid 3	ON3	05.12.06
Oligonucleotid Biotin 4	ONB4	

Tabelle 6-26: Übersicht über die verwendeten *tetO*-Chargen

<i>tetO</i>-Charge	Datum Annealing	Verwendete Oligonucleotide
B0606	21.06.06	ON1/ONB2
B0207	07.02.07	ON3/ONB4
B0607	12.06.07	ON3/ONB4
B1007	12.10.07	ON3/ONB4

Die Belegungsdaten dreier *tetO*-Chargen (B0207, B0607, B1007) wurden verglichen, um die Reproduzierbarkeit des Annealing-Prozesses abschätzen zu können. B0606 wurde nicht hinzugezogen, da die Immobilisierung der Chips mit einem höheren Injektionsvolumen durchgeführt wurde. Die Belegungsdichten der unter vergleichbaren Bedingungen belegten Sensorchips sind in Tabelle 6-27 dargestellt.

Tabelle 6-27: Belegungsdichte mit den verschiedenen *tetO* 1x Biotin-Chargen, 47 Flusszellen auf insgesamt 12 unbelegten Streptavidin-Sensorchips der Charge 1161906, Injektionsvolumen *tetO* (20 nmol/l) 32 μ l; Fluss 4 μ l/min

<i>tetO</i> 1x Biotin Charge	B0207	B0607	B1007
Anzahl der belegten Flusszellen	34	12	1
Anzahl verwendeter <i>tetO</i> 1x-Biotin- Arbeitslösungen	14	4	1
Immobilisierungslevel, Median [RU]	1030	1115	836
Standardabweichung [RU]	251	220	-

Die Belegungsdichte der Sensorchips lag – mit Ausnahme eines Ausreißers (151 RU) für Charge B0207 zwischen 525 und 1209 RU, für Charge B0607 zwischen 639 und 1286 RU. Die Standardabweichung für B0207 und B0607 lagen in einer Größenordnung. Aufgrund der relativ hohen Abweichung für die Belegungsdichten derselben *tetO* –Charge (Variationskoeffizient 22%) lässt sich zwischen den drei Chargen kein signifikanter Unterschied erkennen.

Die Reproduzierbarkeit des Annealing-Schrittes ist für den Assay als unkritisch anzusehen, zwischen drei verschiedenen *tetO* 1x Biotin-Chargen wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt und die Belegungsdichten waren innerhalb einer gewissen Schwankungsbreite vergleichbar. Die Verwendung von *tetO*-Chargen, die aus Oligonucleotiden verschiedener Chargen hergestellt wurden, ließ keinen kritischen Einfluss auf die Belegungsdichten erkennen, somit ist auch der Einfluss verschiedener Chargen Oligonucleotide auf das Annealing und die nachfolgende Belegungsdichte der Sensorchips als gering einzustufen.

Es wurde beobachtet, dass die Belegungsdichten durch verschiedenen Arbeitslösungen *tetO* 1x Biotin untereinander gut übereinstimmen- auch auf verschiedenen Sensorchips einer identischen Charge, dass aber zwischen verschiedenen Arbeitslösungen *tetO* 1x Biotin, die aus derselben Stammlösung hergestellt wurden, zum Teil erhebliche Unterschiede auftraten (Tabelle 6-28).

Tabelle 6-28: Belegung von 6 Chips der Charge 1161242 mit *tetO* 1x Biotin, Charge B0207, Injektionsvolumen 32 μ l, Fluss 4 μ l/min, umrahmte Werte wurden jeweils mit derselben *tetO*-Arbeitslösung am selben Tag belegt.

Chip	32	33	34	35	36	37
Flusszelle 1	948	579	537	558	568	572
Flusszelle 2	957					
Flusszelle 3	557	835	787	1017	1005	1016
Flusszelle 4	546					

In Tabelle 6-28 sind die Flusszellen eingerahmt, die mit derselben Arbeitslösung *tetO* 1x Biotin belegt wurden. Für die Belegung von Flusszellen mit derselben Arbeitslösung wurden gut übereinstimmende Werte erhalten. Ein Vergleich verschiedener Arbeitslösungen zeigt allerdings, dass diese um bis zu 480 RU voneinander abweichen. Da stark unterschiedliche Ergebnisse auf verschiedenen Flusszellen desselben Sensorchips auftraten, kann ausgeschlossen werden, dass es sich um ein Sensorchip-spezifisches Phänomen handelt. Der Abbau von *tetO* 1x-Biotin-Stammlösung während der Lagerung kann ebenfalls als Ursache ausgeschlossen werden, da die zuletzt belegten Flusszellen die größten Belegungsdichten aufwiesen (Sensorchips 35 – 37, jeweils Flusszelle 3). Die Daten deuten darauf hin, dass Unterschiede in den jeweils am Tag der Belegung frisch verdünnten *tetO*-Arbeitslösungen bestanden.

Die Immobilisierungslevel, die mit den Verdünnungen von *tetO*-Stammlösung erhalten wurden, wurden in Abhängigkeit der Lagerdauer der Stammlösungen bei -20 °C ausgewertet.

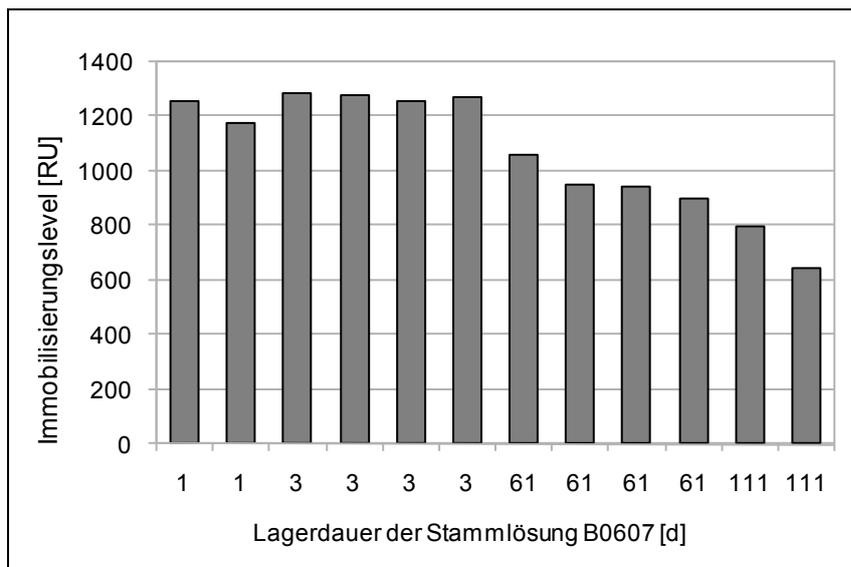


Abbildung 6-41: Immobilisierungsniveau von Flusszellen verschiedener Sensorchips, tetO-Stammlösung B0607, Injektionsvolumen *tetO* (20 nmol/l) 32 μ l, Fluss 4 μ l/min, Lagerung der Stammlösung im 50 μ l-Aliquot bei -20°C

Bei der *tetO*-Charge B0607 zeigte sich eine Abnahme der Belegungsdichte mit zunehmender Lagerdauer der *tetO*-Stammlösung (Abbildung 6-41). Bei den Flusszellen, die nach 61 Tagen Lagerung der *tetO*-Stammlösung mit derselben Arbeitslösung immobilisiert wurden, zeigte sich zudem ein Trend zur Abnahme der Belegungsdichte der später immobilisierten Flusszellen. Während der Dauer der Immobilisierung von 4 Flusszellen (ca. 6 h) stand die *tetO*-Arbeitslösung bei Raumtemperatur im Gerät.

Bei allen anderen *tetO*-Stammlösungen trat keine oder nur eine sehr geringe Abnahme der Belegungsdichte mit zunehmender Lagerdauer der Stammlösung auf. Zum Vergleich ist in Abbildung 6-42 die Belegungsdichte während der Lagerung der *tetO*-Charge B0606 dargestellt.

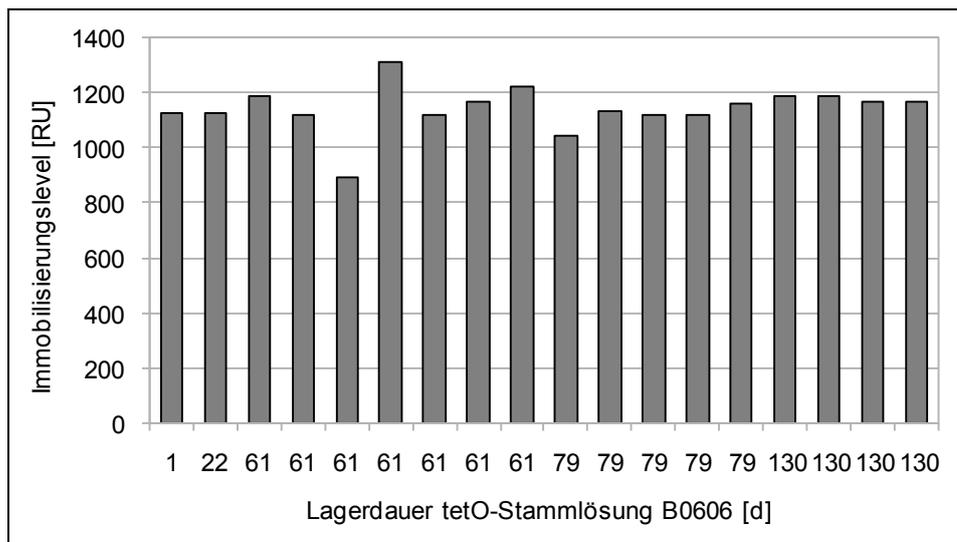


Abbildung 6-42: Immobilisierungslevel von Flusszellen verschiedener Sensorchips in Abhängigkeit von der Lagerdauer der Stammlösung, tetO-Charge B0606, Injektionsvolumen *tetO* (20 nmol/l) 40 µl, Fluss 4 µl/min, Lagerung der Stammlösung im 50 µl-Aliquot bei -20°C

Es wird deutlich, dass mit dieser Charge nach 130 Tagen Lagerung noch Belegungsdichten erhalten wurden, die den nach einem Tag Lagerung erreichten entsprechen. Auch wurde hier keine Abnahme der Belegungsdichte während der aufeinanderfolgenden Immobilisierung mehrerer Flusszellen mit derselben Arbeitslösung *tetO* beobachtet. Festzuhalten bleibt, dass der Immobilisierungslevel nicht ausschließlich das Verhalten der *tetO*-Stammlösung, sondern auch Unterschiede zwischen den Sensorchips abbilden kann. Eine Differenzierung ist anhand der Belegungsdichte allein nicht möglich.

Generell ist eine Verwendung der *tetO*-Stammlösungen über mehrere Wochen hinweg möglich, allerdings zeigt das Beispiel von Charge B0607, dass chargenspezifische Unterschiede in der Lagerfähigkeit auftreten können. Nicht ausgeschlossen werden kann die ungewollte Kontamination der *tetO*-Stammlösung B0607 mit DNAsen, die möglicherweise die Ursache für die schlechtere Stabilität und Abnahme des Immobilisierungslevels ist.

Bei der Belegung von 34 Flusszellen mit der *tetO*-Charge B0207 zeigte sich, dass sich häufig wiederholende Tau- und Gefrierzyklen (19 Zyklen) negativ auf die Belegungsdichten der Sensorchips auswirken; bei der Belegung von Flusszellen nach 18

Tau- und Gefrierzyklen wurden nur noch etwa 60 – 80% der Belegungsdichte der zuerst belegten Flusszellen erreicht. Bei den in Abbildung 6-42 dargestellten Daten war die Belegungsdichte der Flusszellen über 5 Tau- und Gefrierzyklen stabil. Durch Aliquotieren geeigneter Mengen der Stammlösung kann die Anzahl der Tau- und Gefrierzyklen gering gehalten werden, somit lässt sich diese Einflussgröße gut kontrollieren.

Die Belegungsdichte des Sensorchips kann durch die Variation des Injektionsvolumens von *tetO* gesteuert werden, da diese Größen miteinander korreliert sind. Wird die angestrebte Belegungsdichte mit Operator-DNA (1000 RU) bei der Injektion unter Standardbedingungen nicht erreicht, kann durch die entsprechende Erhöhung oder Verringerung des Injektionsvolumens von *tetO* die Höhe der Sensorchip-Belegung angepasst werden (Tabelle 6-29).

Tabelle 6-29: Korrelation von Injektionsvolumen des tetO und der Belegungsdichte des Sensorchips, Injektion bei einer Flussrate von 4 µl/min

Injektionsvolumen [µl]	36	44	48
Immobilisierungs- level[Δ RU]	719	958	1013

Eine Anpassung der Belegungsdichte kann auch durch stufenweise wiederholte Injektion von *tetO* erreicht werden. Die Injektion von *tetO* bis zum Erreichen einer bestimmten Belegungsdichte hingegen erweist sich als ungeeignet, da bei der sich anschließenden Injektion von SDS und Laufpuffer nicht reproduzierbare Mengen *tetO* vom Chip gewaschen werden, die sich während der *tetO*-Injektion nicht abschätzen lassen.

Mit dem Injektionsvolumen steht jedoch eine leicht handhabbare Größe zur Verfügung, mit Hilfe derer eine Vereinheitlichung der Belegungsdichte erreicht werden kann. Auch geringe Unterschiede der verwendeten Chargen *tetO* können über das Injektionsvolumen ausgeglichen werden, so dass einheitliche Belegungsdichten erreicht werden können und darüber eine ausreichende Robustheit des Assays hinsichtlich der die Belegung beeinflussenden Parameter gegeben ist.

6.3.7.3 Vergleich verschiedener Chipchargen der SA-Chips

Die Belegung von Chips derselben Charge war bei Möller gut reproduzierbar [188]. Um die Robustheit des Systems beschreiben zu können, wurden die Daten, die bei der Belegung von verschiedenen Chipchargen erhalten wurden untersucht.

Tabelle 6-30: Chips belegt mit derselben Charge tetO 1x Biotin (B0606), Injektionsvolumen *tetO* (20 nmol/l) 40 µl, Fluss 4 µl/min, Belegungen durchgeführt im Zeitraum von 17 Wochen an 5 Tagen, umrahmte Zellen mit jeweils derselben tetO-Arbeitslösung immobilisiert.

Chip	13	21	22	23	24	25	27
Charge	1151680						1161906
Immobilisierungslevel Fc1 [RU]	-	1123	1189	1312	1045	1131	1184
Immobilisierungslevel Fc2 [RU]	1123	-	1120	1120	-	1120	1185
Immobilisierungslevel Fc3 [RU]	-	-	891	1170	-	1118	1167
Immobilisierungslevel Fc4 [RU]	-	-	-	1220	-	1159	1170

Die erhaltenen Belegungsdichten lagen zwischen 891 und 1312 RU. Der Median für die Belegungsdichte von Chipcharge 1151680 liegt bei 1123 RU, der von Charge 1160242 bei 1177 RU. Die Mediane unterschieden sich um etwa 50 RU, was einer Abweichung von weniger als 5% entspricht. Von Möller wurde die Abweichung in den Belegungsdichten von Chips derselben Charge mit 9% angegeben; die Abweichung von <5% zwischen den Chargen 1151680 und 1161906 liegt also in der Größenordnung dessen, was auch als Abweichung auf den Sensorchips einer einzigen Charge erhalten wird. Im Folgenden wird die Häufigkeitsverteilung der Beladungsdichten auf den Chipchargen verglichen, die aussagekräftiger sind als der Vergleich der Mediane (Abbildung 6-43).

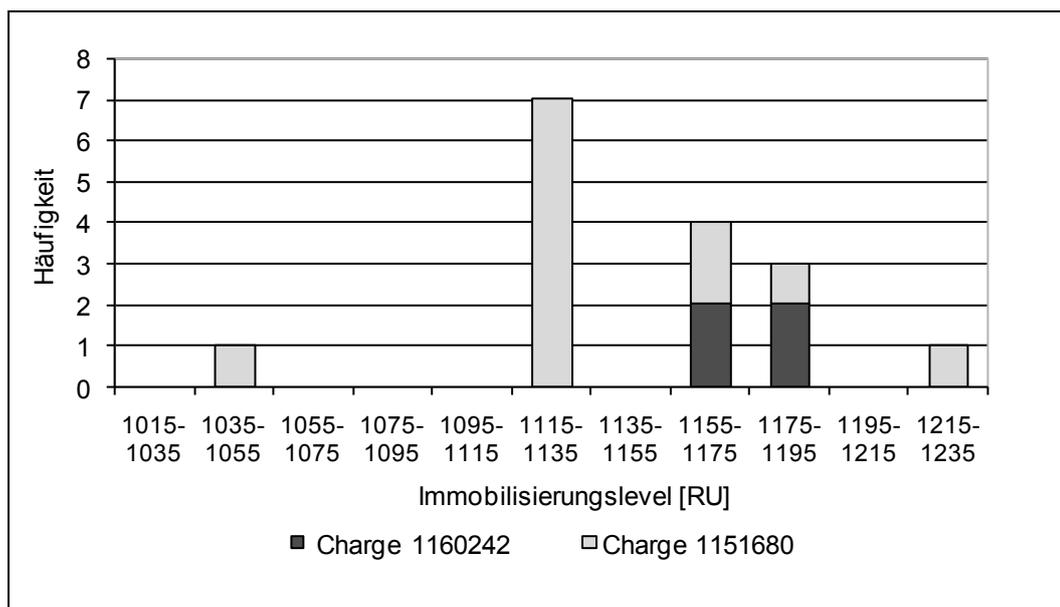


Abbildung 6-43: Häufigkeit der Belegungsdichten bei den Chipchargen 1151680 und 1161906, tetO B0606 (20 nmol/l), Injektionsvolumen 40 μ l, Fluss 4 μ l/min (Das Injektionsvolumen von 40 μ l wurde für tetO B0606 gewählt, da bei 32 μ l Belegungsdichten von nur etwa 700 RU erreicht wurden)

Betrachtet man allerdings die Häufigkeit, mit der auf den verschiedenen Chipchargen bestimmte Immobilisierungslevel erreicht werden, deutet sich an, dass die Chipchargen möglicherweise doch leichte Unterschiede zeigen, da für Charge 1151680 häufiger höhere Immobilisierungslevel erreicht wurden.

Zwischen Sensorchips der Chargen 1160242 und 1161906 zeigten sich hingegen deutliche Unterschiede in der Belegungsdichte der verschiedenen Chargen und in deren Häufigkeit.

Tabelle 6-31: Vergleich der Belegungsdichten zweier Chipchargen, tetO 1x Biotin Charge 0207, Injektionsvolumen 32 μ l bei 4 μ l/min

Sensorchip Charge	1160242	1161906
Anzahl der belegten Flusszellen	14	34
Anzahl verwendeter tetO 1x-Biotin-Arbeitslösungen	5	14
Immobilisierungslevel, Mittelwert [RU]	749	918
Standardabweichung [RU]	206	251

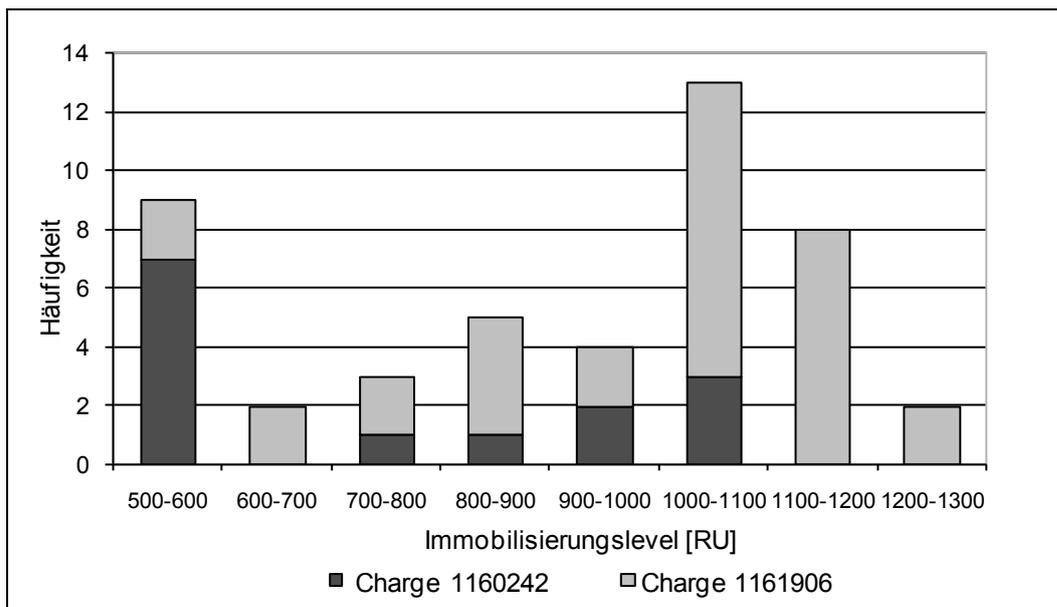


Abbildung 6-44: Belegungsdichte der Chipchargen 1160242 und 1161906 mit tetO B0207, Injektionsvolumen 32 μ l, Fluss 4 μ l/min

Ob die Unterschiede auf die Verwendung verschiedener Chipchargen zurückzuführen sind, ist vor dem Hintergrund der in 6.3.7.2 diskutierten Ergebnisse fraglich. Bei den in Tabelle 6-31 gezeigten Werten wurden Verdünnungen der *tetO*-Stammlösung an unterschiedlichen Tagen für die Belegung hergestellt, die die Ursache für die Unterschiede darstellen können. Um eindeutig festzustellen, ob die Unterschiede auf die Chipchargen zurückzuführen sind, müssen Studien erfolgen, bei denen Sensorchips verschiedener Chargen mit derselben *tetO*-Arbeitslösung belegt werden.

Wahrscheinlich hat die Produktionscharge der Sensorchips nur einen geringen Einfluss auf die Belegungsdichte der Sensorchips. Die Sensorchips unterliegen beim Hersteller einer Qualitätskontrolle, was für die im Labor hergestellten Arbeitslösungen der Operator-DNA noch nicht gewährleistet war.

Festzuhalten bleibt, dass **angestrebte Belegungsdichten** durch die Anpassung des Injektionsvolumens *tetO* **erreicht werden können**. Ebenso wie in 6.3.7.2 diskutiert, kann auch bei der Verwendung verschiedener Chipchargen kann auf diese Weise eine einheitliche Belegungsdichte sichergestellt werden.

6.3.8 Zusammensetzung des Laufpuffers

Im nicht-kompetitiven Assay für Tetracycline wird ein Mechanismus der Genregulation imitiert, der in tetracyclinresistenten Bakterien abläuft. Es wird daher auch *in vitro* unter physiologischen Bedingungen bei neutralem pH-Wert gearbeitet. Es sollte geprüft werden, ob die Zusammensetzung des Laufpuffers einen kritischen Einfluss auf die TetR-Bindung beziehungsweise die Bindung von Tetracyclin an TetR hat. Ergebnisse von Möller, nach denen bei hohen Ionenstärken (1,7 mol/l) TetR von *tetO* gelöst wird, hatten dies vermuten lassen [188]. Es sollten Bedingungen gefunden werden, unter denen die TetR-Ablösung minimal ist.

Puffer verschiedener Ionenstärken wurde durch den Zusatz von 0,035 bis 0,35 mM Natriumchlorid zum Laufpuffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl) hergestellt. Da Magnesiumionen für die Bindung von Tetracyclin an TetR notwendig sind, enthielten alle Puffer 5 mM Magnesiumsulfat-Heptahydrat. Die Lösungen wurden als Blank und mit Tetracyclin dotiert injiziert.

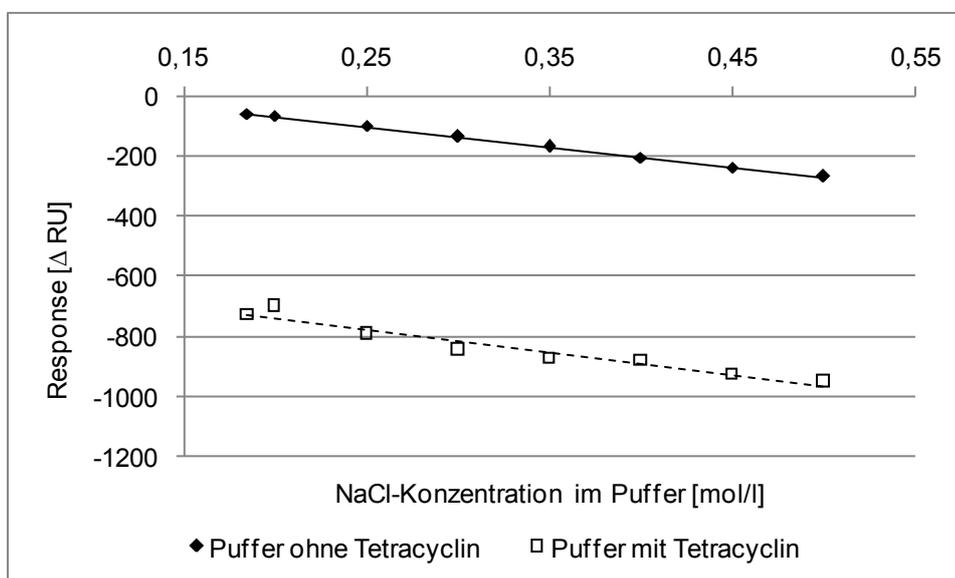


Abbildung 6-45: Ablösung von TetR durch Probelösung unterschiedlicher Ionenstärke (NaCl in Laufpuffer) obere Gerade: Puffer verschiedener Ionenstärke, untere Gerade: zusätzlich 50 ng/ml Tetracyclin, Mittelwerte aus Zweifachinjektionen. Injektionsvolumen TetR und Probelösung je 5 μ l bei 10 μ l/min

Abbildung 6-45 zeigt den Zusammenhang zwischen der NaCl-Ionenstärke der Probelösung und der Signaldifferenz an t_1 und t_2 . Je höher die Ionenstärke ist, desto negativer ist das Signal, das heißt, desto mehr TetR wird von *tetO* abgelöst. Die

Abnahme verhält sich linear. Bei der Injektion von 50 ng/ml Tetracyclin in Puffer wurden bei allen NaCl-Konzentrationen deutlich negativere Messwerte erhalten als bei der Injektion der Blanks. Beide Geraden in Abbildung 6-45 zeigen eine vergleichbare Steigung, die Signaldifferenz zwischen dotierten und undotierten Puffern ist damit im Bereich von 0,185 – 0,5 mol/l NaCl-Konzentration konstant. Dies zeigt, dass die Bindung von Tetracyclin an TetR durch hohe NaCl-Konzentrationen nicht negativ beeinflusst wird, sondern sich die Menge des durch Tetracyclin abgelösten TetR nur zur Menge addiert, die aufgrund der Ionenstärke des Puffers abgelöst wird.

Deutlich zeigt sich die Ablösung von TetR bei hoher Ionenstärke auch im Sensorgramm:

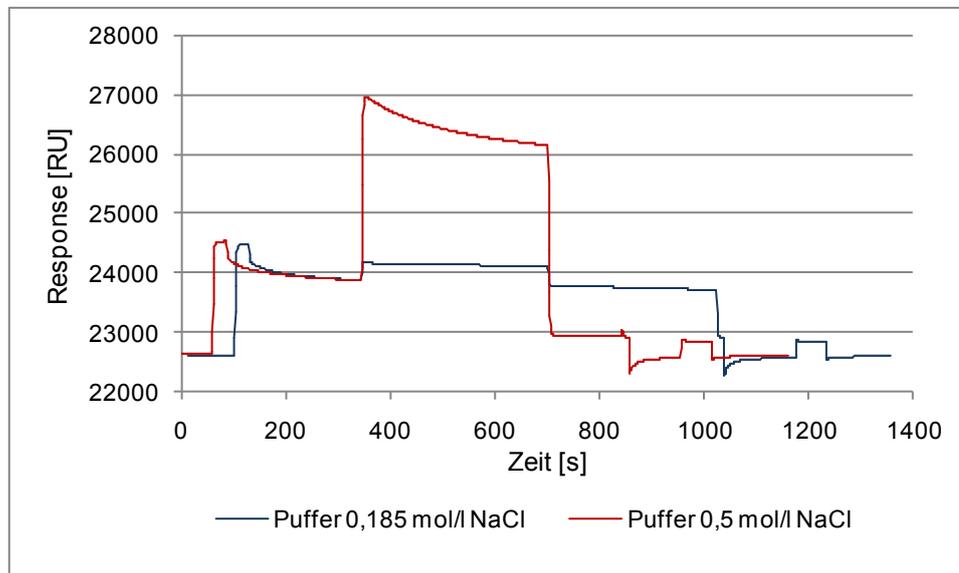


Abbildung 6-46: Gegenüberstellung der Injektion von Probenpuffer mit 0,185 mol/l und 0,5 mol/l NaCl-Konzentration, Sensorgramme sind normiert auf Injektionsbeginn des Puffers als Probelösung, Injektionsvolumen 60 µl, Flussrate 10 µl/min. Blaue Linie: Probenpuffer 0,185 mol/l NaCl, rote Linie: Probenpuffer 0,5 mol/l

Nach der Injektion von TetR fiel bei Injektion des Puffers, der die höhere Ionenfracht enthält, das Signal deutlich ab (ca. 1000 RU), dies zeigt die Ablösung von TetR. Beim Puffer geringer Ionenstärke hingegen zeigte sich nur eine geringe Signalabnahme, die in derselben Größenordnung lag, wie die Dissoziation von TetR, die im selben Zeitraum durch den Fluss des Laufpuffers hervorgerufen würde.

Es wurde untersucht, ob die höhere Ionenstärke im Laufpuffer nur die Ablösung von TetR bewirkt oder auch die Bindung von TetR an *tetO* beeinträchtigt. Dazu wurde

TetR-Stammlösung mit Puffern verschiedener Ionenstärke verdünnt. Es wurden sowohl Pufferlösungen zur Verdünnung verwendet, deren Ionenstärke mit Natriumchlorid eingestellt war, als auch solche, bei denen stattdessen die Ionenstärke mit Magnesiumsulfat eingestellt wurde. Die Ergebnisse der Messung sind in Abbildung 6-47 dargestellt.

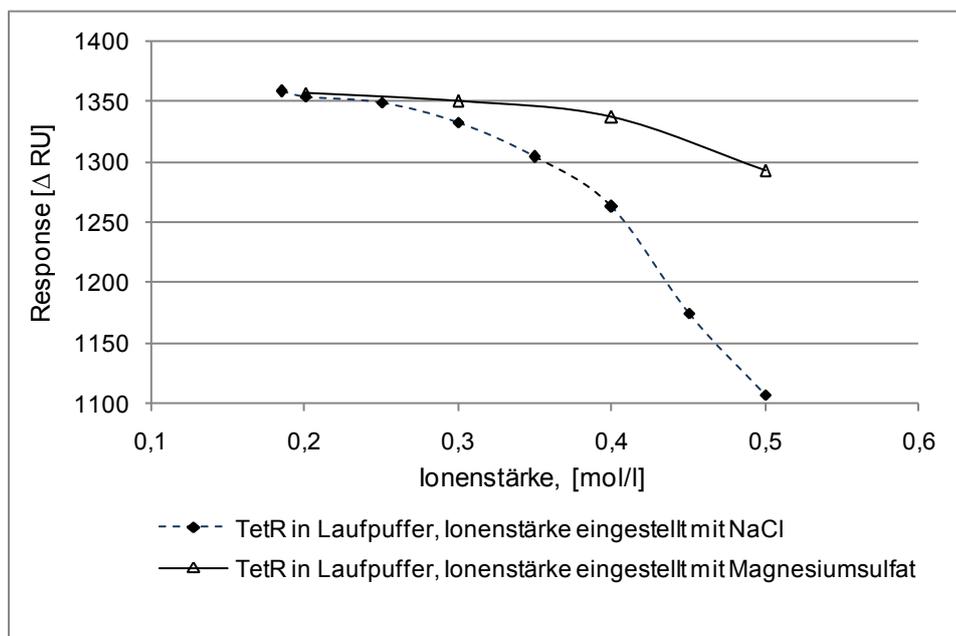


Abbildung 6-47: TetR-Bindung an tetO nach Verdünnung von TetR in Puffern verschiedener Ionenstärken. Ionenstärken wurden für eine Messung mit NaCl, für eine andere mit Magnesiumsulfat eingestellt. Injektionsvolumen 5 μ l, Mittelwerte aus Zweifachinjektionen

Übereinstimmend mit der Beobachtung, dass hohe Ionenstärken TetR von *tetO* lösen, zeigt sich, dass **weniger TetR an *tetO* bindet, wenn die Ionenstärke des Puffers, in dem TetR gelöst ist, hoch ist** (Abbildung 6-47). Neben dem Einfluss der Konzentration zeigen sich auch Unterschiede in Abhängigkeit von der **Art oder Wertigkeit der verwendeten Ionen**: Hohe NaCl-Konzentrationen führten zu einer Differenz zwischen höchster und geringster Ionenstärke von 250 RU, bei der Verwendung von **Magnesiumionen** betrug die Signaldifferenz 70 RU.

In einer weiteren Messung wurden geprüft, ob sich Unterschiede zwischen den Puffern, deren Ionenstärke mit verschiedenen Ionen eingestellt wurde, auch beim Nachweis von Tetracyclinen zeigen. Dazu wurden undotierte und mit 50 ng/ml Tetracyclin dotierte Pufferlösungen verschiedener Ionenstärke verglichen, zur Einstellung der Ionenstärke

wurde neben Natriumchlorid und Magnesiumsulfat noch Ammoniumacetat als drittes Salz hinzugenommen.

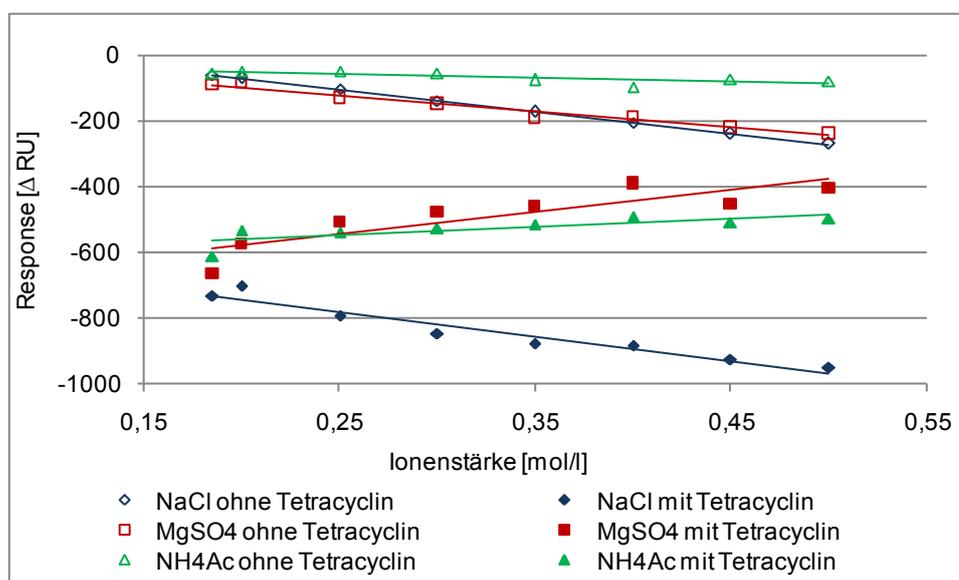


Abbildung 6-48: Injektion von undotierten und mit Tetracyclin dotierten Pufferlösungen verschiedener Ionenstärken, die Ionenstärken wurden mit verschiedenen Ionen eingestellt. Nicht gefüllte Symbole kennzeichnen undotierte Pufferlösungen, gefüllte Symbole dotierte Pufferlösungen (50 ng/ml Tetracyclin). Als Ionenstärke ist der Zusatz zum Laufpuffer angegeben. Dargestellte Werte sind Mittelwerte aus Zweifachinjektionen. MgSO4= Magnesiumsulfat-Heptahydrat, NH4Ac = Ammoniumacetat

Unterschiede zwischen Pufferlösungen gleicher Ionenstärke, die mit verschiedenen Salzen eingestellt wurde, zeigten sich auch bei der Injektion undotierter und mit 50 ng/ml Tetracyclin dotierter Probelösungen (Abbildung 6-48).

Die Ionenstärke der Puffer, die mit Ammoniumacetat eingestellt wurden, zeigte nur einen geringen Einfluss, was sich an der flachen Steigung der Geraden ablesen lässt. Für die Messung der undotierten Puffer zeigte sich mit steigender Ammoniumacetat-Ionenstärke eine leichte Tendenz, mehr TetR abzulösen, bei den dotierten Proben die Tendenz, weniger TetR abzulösen. Demgegenüber wurde durch Puffer, deren Ionenstärke mit NaCl eingestellt wurde, in beiden Fällen (dotiert und undotiert) mehr TetR bei höherer Ionenstärke abgelöst. Die Ablösung von TetR, die durch Injektion von Puffern mit Magnesiumsulfat zur Einstellung der Ionenstärke erreicht wurde, liegt für die undotierten Pufferlösungen in der Größenordnung der durch NaCl hervorgerufenen Ablösung. Allerdings zeigten die dotierten Proben mit Magnesiumsulfat eine abnehmende TetR-Ablösung mit steigender Ionenstärke. Die Signaldifferenz zwischen dotierten und undotierten Proben nimmt mit dem Anstieg der Ionenstärke von 600 RU

auf 200 RU ab. Dies zeigt, dass die **Empfindlichkeit des Assays bei hoher Ionenstärke des Probenpuffers schlechter ist**, da durch dieselbe Menge Tetracyclin weit weniger TetR abgelöst wird als bei geringer Ionenstärke des Probenpuffers.

Beim Zusatz von NaCl zur Erhöhung der Ionenstärke verhalten sich Ionenstärke und Tetracyclin additiv im Hinblick auf die TetR-Ablösung. Wird Magnesiumsulfat verwendet, verhalten sich die Ionenstärke und Tetracyclin jedoch nicht additiv. Bei der Verwendung von Ammoniumacetat zeigte sich kein deutlicher Effekt.

Diskussion des Einflusses der Natriumchlorid-Konzentration

Der starke Einfluss der Ionenstärke ist als kritisch anzusehen, da die durch Tetracyclin induzierte Ablösung von TetR die Messgröße des Assays ist und die Ablösung durch die erhöhte Ionenstärke zu falsch-positiven Messwerten führen kann.

Die Beobachtungen in Abbildung 6-48 lassen sich dahingehend interpretieren, dass durch hohe Natriumchloridkonzentrationen zwar TetR von *tetO* gelöst wird, die Bindung von Tetracyclin an TetR aber nicht beeinträchtigt wird. Durch die Erhöhung der Salzkonzentration können Veränderungen am TetR einerseits und an der DNA andererseits auftreten. TetR trägt als Protein geladene Gruppen, die in Abhängigkeit von der Salzkonzentration der Umgebung unterschiedlich hydratisiert sind. DNA liegt unter physiologischen Bedingungen aufgrund der großen Menge unprotonierter Phosphatgruppen negativ geladen vor, dies ist auch im Fall der DNA wichtig für die Ausbildung einer Hydrathülle. Konkurrieren bei hohen Ionenkonzentrationen die gelösten Ionen mit DNA und Proteinen um hydratisierende Wassermoleküle, so führt dies möglicherweise zu einem veränderten Hydratationsverhalten von *tetO* und TetR und dadurch zur Ablösung von TetR. Übereinstimmend damit beschreiben Yang et al. eine Abhängigkeit von Protein-DNA-Interaktionen vom Salzgehalt des Puffers: es wurde weniger Protein bei höherem Salzgehalt gebunden. Dieser Effekt wurde darauf zurückgeführt, dass die Ionen mit den Proteinen um die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA konkurrieren und den Kontakt des Proteins mit der DNA abschirmen [214].

Diskussion des Einflusses der Magnesiumionen-Konzentration

Durch eine hohe Magnesiumsulfat-Konzentration wird die Erkennung von Tetracyclin gestört, ein Effekt, der bei Natriumchlorid und Ammoniumacetat nicht oder nur stark vermindert auftritt. Der Effekt, dass weniger Tetracyclin von TetR gebunden wird überwiegt hier sogar den Effekt, dass durch die hohe Ionenstärke mehr TetR von *tetO* gelöst wird. Magnesium ist als einziges der getesteten Ionen zweiwertig und bildet als Erdalkalimetall Komplexe mit Tetracyclin (siehe auch Abschnitt 2.3.4, Seite 10), wohingegen Natrium und Ammonium dazu nicht in der Lage sind.

In der Literatur wird die Stöchiometrie des Mg^{2+} -Tetracyclin-Komplexes diskutiert [215-217]. Schmitt et al. postulieren die Existenz von 1:1 und 2:1 Mg^{2+} :Tetracyclin-Komplexen, bei denen ein Mg^{2+} an das β -Hydroxy-Keto-System am BCD Chromophor und das zweite vom Sauerstoff am C3 und der Dimethylaminofunktion am C4 gebunden wird [216]. Jin et al untersuchten die molaren Verhältnisse von Mg^{2+} und Tetracyclin in Abhängigkeit von pH-Wert, Puffer und Salzkonzentration sowie den Einfluss der Protonierung und der Konformation des Tetracyclins auf die Bindung von Mg^{2+} . Sie beschreiben das Vorkommen von 1:2 Mg^{2+} :Tetracyclin-Komplexen sowie eine Abhängigkeit der Bindung von Magnesiumionen von der Salzkonzentration des Puffers. In Abwesenheit von NaCl wurden nichtganzzahlige molare Verhältnisse des Mg^{2+} :Tetracyclinkomplexes erhalten [27]. Es ist daher denkbar, dass Tetracyclin unter den untersuchten Bedingungen (pH 7,4; hohe Konzentration Magnesiumionen) nicht in einem 1:1 Komplex mit Mg^{2+} vorliegt. Möglicherweise führt dies – abhängig von der Stabilität der Komplexe- dazu, dass Tetracyclin von TetR nicht oder sehr viel schwächer gebunden wird (siehe dazu auch Abschnitt 2.6.3, Seite 28).

6.3.9 Anwendung des für Honig optimierten Screeningtests in einem Labor in Japan

Die Anwendbarkeit des Screeningtests sollte in einem zweiten Labor überprüft werden, wo dieser von Laborpersonal durchgeführt werden sollte, das mit der Methodik nicht vertraut war. Es bestand die Möglichkeit, diese Messungen mit der in 6.4.1 beschriebenen, für Honig optimierten Methode in einem Labor in Japan durchführen zu lassen. Für die Messungen, die mit dem Screening-Test in Japan durchgeführt wurden, wurden in Wuppertal zwei Sensorchips mit *tetO* 1x Biotin beladen, die maximale Bindung von Repressor bestimmt und zur Lagerung TetR auf die Oberfläche aufgebracht. Die Messungen in Japan erfolgten etwa sechs Monate nach der Belegung der Chips; sämtliche Reagenzien wurden bis zur Messung kühl gelagert, wobei während des Versandes eine Einhaltung der Kühlkette nicht sichergestellt war. Das für den Test benötigte TetR wurde in einer Konzentration von 5 μM in mit Zusatz von 0,1% Natriumazid und 0,3% Rinderserumalbumin verschickt. Natriumazid wurde zur Konservierung zugesetzt, BSA um die unspezifische Adsorption von TetR an Gefäßwandungen zu unterdrücken.

Die vom Labor in Japan erhaltenen Daten wurden mit Messungen verglichen, die in Wuppertal durchgeführt wurden. Ein Vergleich von Kalibrierkurven in Honig im Bereich 0 – 400 $\mu\text{g/kg}$ Tetracyclin ist in Abbildung 6-49 dargestellt.

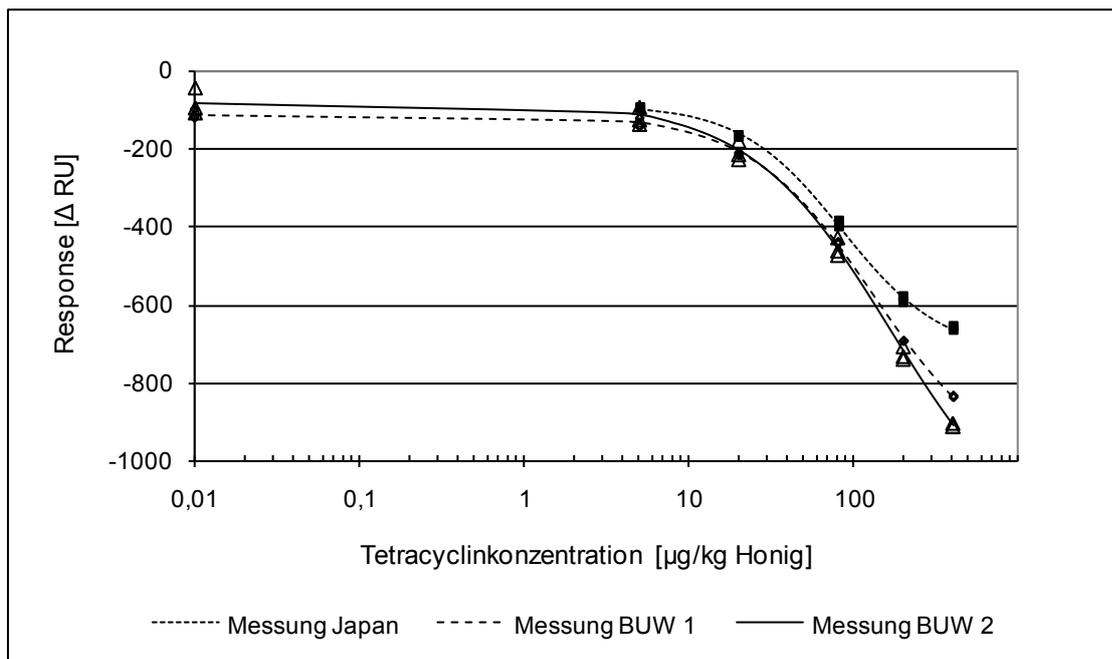


Abbildung 6-49: In Japan und Wuppertal (BUW) aufgezeichnete Kalibrierkurven, Tetracyclin in Honig

Die im japanischen Labor aufgenommene Kalibrierung zeigte eine gute Präzision; auch konnte eine gute Empfindlichkeit der Messung erreicht werden. Der IB_{50} -Wert berechnete sich aus der Kalibrierkurve des japanischen Labors zu $71,8 \mu\text{g Tetracyclin/kg Honig}$, in den Messungen in Wuppertal betrug der IB_{50} -Wert $88,7 \mu\text{g/kg}$ und $91,7 \mu\text{g/kg}$. Die Basislinie war in allen Messungen vergleichbar stabil. In der Messung des japanischen Labors zeigte sich der auch in Wuppertal beobachtete und bereits von Möller beschriebene anfängliche Anstieg der Repressorbindung (gemessen an t_1 und t_2) während einer Messreihe.

Die Daten zeigen, dass die Methodik des Screening-Assays sehr robust ist. Von Laborpersonal konnten bei erstmaliger Durchführung des Tests mit *tetO*-Sensorchips, die etwa sechs Monate gelagert waren, und unter Verwendung von Reagenzien und Honig aus Japan präzise und empfindliche Messungen vorgenommen werden. Lediglich der Arbeitsbereich der in Japan aufgezeichneten Kalibrierung war geringer als der in Wuppertal. Wahrscheinlich ist dies auf die verhältnismäßig lange Lagerung der Sensorchips zurückzuführen. Die Stabilitätsmessungen und Kalibrierungen wurden in Wuppertal in einem Zeitraum von maximal 5 Wochen nach der Immobilisierung des Chips durchgeführt, zudem erfolgte die Lagerung unter kontrollierten Bedingungen.

Diese Voraussetzungen waren bei den nach Japan versandten Chips nicht erfüllt. Ein Hinweis darauf, dass die Lagerung der Sensorchips ursächlich für den geringeren Arbeitsbereich ist, ist die Tatsache, dass bei der Referenzmessung nach der Immobilisierung eine Repressorbindung von etwa 1100 RU erreicht wurde, bei der Messung in Japan jedoch nur etwa 740 RU. Eine weitere Messung des japanischen Labors, die 5 Tage nach der ersten Messung durchgeführt wurde, zeigte ebenfalls eine gute Präzision und hohe Empfindlichkeit ($IB_{50} = 73,7 \mu\text{g/kg}$). Basislinie und Repressorbindung verhielten sich erwartungsgemäß. Die TetR-Bindung an *tetO* war hingegen auf etwa 400 RU gesunken, der Arbeitsbereich war zudem nochmals geringer als in der vorangegangenen Messung.

Es konnten keine Informationen über die Lagerung des Sensorchips in der Zeit zwischen den beiden Messreihen erhalten werden. Möglicherweise wurde dieser im Gerät unter standby-flow gelagert. Bei der Basislinie war zwischen den Messungen ein Abfall von 21800 RU auf 20450 RU in der zweiten Messung zu verzeichnen, das deutet auf eine Ablösung des *tetO* hin. Die Empfindlichkeit des Assays war dadurch nicht wesentlich schlechter.

6.3.10 Fazit zur Robustheit des Screeningtests mit *tetO* und TetR

Es konnten Lagerbedingungen ermittelt werden, unter denen die mit *tetO* beladenen Sensorchips außerhalb des SPR-Gerätes stabil waren, indem vor der Lagerung TetR auf die Oberfläche aufgebracht wurde und die Sensorchips trocken gelagert wurden. Bei dieser Art der Lagerung wirkten sich weder die Lagerdauer noch die Lagertemperatur negativ auf die Stabilität der mit *tetO* beladenen Sensorchips aus. Die Möglichkeit der Lagerung des Chips außerhalb des Gerätes bedeutet einen Gewinn an Flexibilität, da Messungen nicht kontinuierlich durchgeführt werden müssen. Auch bei einem häufigen Verwendung (Ein- und Ausbau) des Sensorchips verschlechterte sich deren Stabilität nicht. Die Lagerstabilität des TetR war ähnlich gut: auch bei TetR wurden keine Stabilitätseinbußen bei der Lagerung bei verschiedenen Temperaturen und Lagerdauern festgestellt. Darüber hinaus ließ sich auch die TetR-Arbeitslösung einfrieren, ohne dass dies zu einer Abnahme der Bindung an den Operator führte. Das Protein ist damit als äußerst lagerstabil einzustufen. Auch bei den tiefgefrorenen Stammlösungen wurden im Zeitraum von etwa 18 Monaten keine Veränderungen während der Lagerung beobachtet.

Bei der Lagerung von Tetracyclinlösungen wurde mit zunehmender Lagerdauer und –temperatur eine schlechtere Wiederfindung festgestellt. Verdünnte Tetracyclinlösungen waren auch über einen kurzen Zeitraum nicht stabil, Tetracyclinlösungen nur bei niedrigen Temperaturen. Während sich bei der Verwendung von Oxytetracyclin gegenüber Tetracyclin und Glas- gegenüber Kunststoffgefäßen keine Unterschiede feststellen ließen, konnte durch die Verwendung von Methanol und Ethanol als Lagermedium gegenüber Puffer ein deutlicher Stabilitätsgewinn erreicht werden. Tetracyclinlösungen sollten frisch aus kristallinem Tetracyclinhydrochlorid hergestellt werden. Sofern eine Lagerung der Lösungen notwendig sein sollte, sollte diese in Methanol oder Ethanol bei niedrigen Temperaturen erfolgen.

Der Vergleich zweier TetR-Chargen zeigte eine hervorragende Übereinstimmung der Chargen im Hinblick auf Bindung an den Operator und Ablösung durch TetR, die Verwendung verschiedener Chargen gleicher Aktivität ist unkritisch. Mögliche

Unterschiede bei der Verwendung verschiedener *tetO*- oder Sensorchipchargen zeigen sich im Immobilisierungslevel. Dieser kann jedoch leicht über die Injektionsdauer der *tetO*-Lösung gesteuert werden, so dass chargenspezifische Unterschiede über die Anpassung der Injektionsdauer von *tetO* relativ problemlos ausgeglichen werden können.

Die Anwendbarkeit des Screeningtests wurde durch Untersuchungen mit der für Honig optimierten Methode in einem zweiten Labor in Japan bestätigt. Es wurde eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse beobachtet. Hinsichtlich der Stabilität und Anwendbarkeit sowie der Robustheit im Hinblick auf die Verwendung verschiedener Reagenzienchargen zeigt der Screeningtest gute Eigenschaften.

Kritisch eingestuft wird hingegen der Einfluss der Ionenstärke des Puffers auf die *tetO*-TetR-Bindung auf der einen und die schlechtere Erkennung von Tetracyclin durch TetR bei hohen Magnesiumkonzentrationen auf der anderen Seite. Die unspezifische Ablösung von TetR täuscht im Assay das Vorhandensein von Tetracyclin vor und führt zu falsch-positiven Ergebnissen. Wird die Bindung von Tetracyclin an TetR durch hohe Magnesiumionen-Konzentrationen im Puffer beeinträchtigt, nimmt die Empfindlichkeit des Assays ab. Die Ionenstärke muss daher bei der Konzeption von Experimenten und Interpretation von Ergebnissen beachtet werden. Es sollte sichergestellt sein, dass bei der Messung von Kalibrierlösungen und Proben ähnliche, geringe Ionenkonzentrationen vorliegen; hohe Ionenkonzentrationen sollten gänzlich vermieden werden. Problematisch kann dies insbesondere dann werden, wenn es notwendig ist, Tetracycline aus einer Lebensmittelmatrix zu extrahieren oder die Matrix selbst zu einer hohen Ionenstärke beiträgt. Der im Allgemeinen zur Extraktion von Tetracyclinen aus Lebensmittelmatrices eingesetzte McIlvaine-Puffer kann wahrscheinlich aufgrund der Ionenstärke und dem Zusatz von EDTA in der Probenaufarbeitung von Proben für den Screeningtest nicht eingesetzt werden.

6.4 Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit für Tetracycline in Honig

Die Entscheidungsgrenze für den Nachweis von Tetracyclinen in Honig wurde von Möller bestimmt und betrug $14 \mu\text{g}/\text{kg}$ [188]. In der EU sind Tetracycline nicht für die Behandlung von Honigbienen zugelassen [56], einzelne Mitgliedstaaten der EU haben allerdings verschiedene Aktionswerte festgelegt [116]. Um diese mit dem Assay erfassen zu können, war es ein Ziel dieser Arbeit, die Empfindlichkeit des Assays gemessen an der Entscheidungsgrenze zu erhöhen. Der Faktor, um den die Entscheidungsgrenze verringert werden muss, muss zudem berücksichtigen, dass der Assay die Tetracyclin-Epimere nicht erfasst. In der EU-Gesetzgebung sind Höchstmengen an Tetracyclinen jeweils als Summe von Muttersubstanz und Epimer festgelegt [56]. Die Epimerisierungsrate hängt stark von Temperatur, pH-Wert und den Lagerbedingungen der Probe ab. Wird eine maximale Epimerisierungsrate von 50% angenommen, muss der Assay, um ein Entscheidungsgrenze von $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ zu erreichen, in der Lage sein, Konzentrationen von $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ Tetracyclin in Honig nachzuweisen. Die Entscheidungsgrenze sollte daher um den Faktor 3 verringert werden.

Eine Übersicht über die zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit durchgeführten Versuche ist in Abbildung Abbildung 6-50 gegeben.

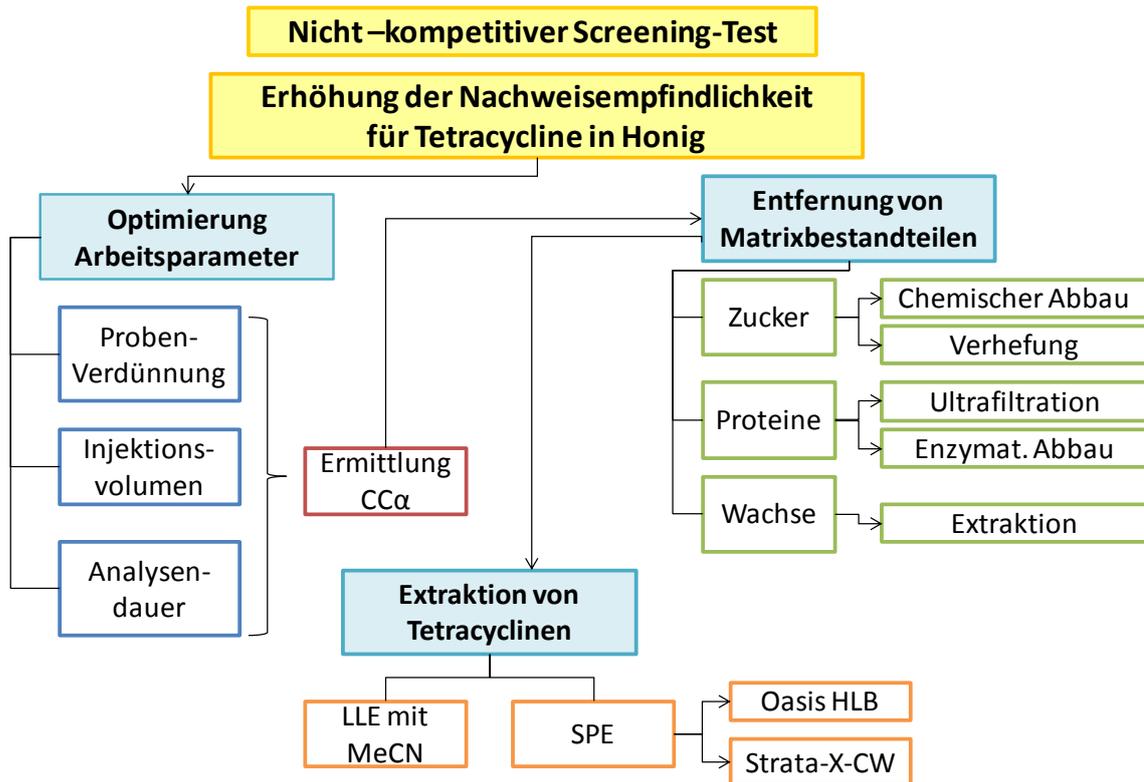


Abbildung 6-50: Konzept der Versuche zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit von Tetracyclinen in Honig.

Zunächst erfolgte eine Optimierung der Arbeitsparameter (Probenverdünnung, Injektionsvolumen und Analysendauer). Nach der Optimierung wurde die Entscheidungsgrenze unter optimierten Parametern bestimmt und mit der von Möller bestimmten verglichen. Weiterhin wurde versucht, störende Matrixbestandteile zu identifizieren und selektiv mittels verschiedener Verfahren zu entfernen oder abzubauen; parallel dazu wurden Versuche zur Extraktion von Tetracyclin aus Honig durchgeführt.

6.4.1 Optimierung der Arbeitsparameter

6.4.1.1 Verdünnung von Honigproben

Es sollte geprüft werden, ob sich durch die Variation der Probenverdünnung die Empfindlichkeit des Assays steigern lässt. Zu diesem Zweck wurde Mischhonig I mit Laufpuffer im Bereich von 1:10 bis 1:30 verdünnt und zur Aufnahme von Kalibrierkurven mit Tetracyclin in verschiedenen Konzentrationen dotiert. Der IB_{50} -Wert der Kalibrierkurven und deren Arbeitsbereich bei den verschiedenen

Verdünnungen wurden verglichen (Tabelle 6-32). Die Optimierungsversuche wurden auf einem Chip im Zeitraum von 17 Tagen durchgeführt.

Tabelle 6-32: Tetracyclin-Kalibrierkurven in verschieden stark verdünnten Honigproben. Als Honigprobe wurde Mischhonig (Honig1) verwendet. Injektionsvolumen TetR und Honig 10 µl, Flussrate 5 µl/min

Konzentration Tetracyclin [µg/kg]	Verdünnung 1/10 [Δ RU]	Verdünnung 1/15 [Δ RU]	Verdünnung 1/20 [Δ RU]	Verdünnung 1/25 [Δ RU]	Verdünnung 1/30 [Δ RU]
0	-59	-93	-119	-121	-131
5	-74	-106	-125	-129	-140
20	-135	-151	-166	-158	-169
80	-321	-314	-318	-270	-249
200	-528	-528	-532	-446	-493
Arbeitsbereich [RU]	469	435	413	325	362
IB ₅₀ -Wert [µg/kg]	110,9	127,9	145,6	151,0	166,7

Tabelle 6-32 zeigt den Effekt der Verdünnung von Honig auf die Empfindlichkeit des Screeningtests. Die Empfindlichkeit wird als IB₅₀-Wert ausgedrückt und beschreibt die Tetracyclinkonzentration, bei der 50% des gebundenen TetR abgelöst wird.

Je stärker der Honig verdünnt war, desto höher war der IB₅₀-Wert, das heißt, desto unempfindlicher war der Assay. **Bei stärkerer Verdünnung nimmt die Empfindlichkeit ab**, eine **Verdünnung** des Honigs um **Faktor 10** mit Probenpuffer zeigte die **beste Empfindlichkeit**. Die Abnahme der Empfindlichkeit ist darauf zurückzuführen, dass im injizierten Probenvolumen bei stärkerer Verdünnung absolut weniger Tetracyclin vorliegt. Dies überwiegt hier den Effekt, dass bei höherer Verdünnung auch weniger störende Matrixbestandteile auf die Chipoberfläche gelangen, die unspezifisch mit der Oberfläche wechselwirken können und große Auswirkungen auf den Wert der Entscheidungsgrenze haben [188]. Für die Bestimmung der Entscheidungsgrenze bei Möller waren die Honigproben für die SPR-Messungen im

Verhältnis 1:10 verdünnt worden, um ein Verkleben des mikrofluiden Systems zu vermeiden.

Die beste Verdünnung wurde im oben stehenden Versuch mit einem Mischhonig bestimmt. Da aber, wie von Möller gezeigt, verschiedene Honige verschieden starke unspezifische Wechselwirkungen zeigen, wurden in einem weiteren Test die Verdünnungen 1/10 und 1/20 in verschiedenen Honigen gegenübergestellt und die Matrixeffekte der dotierten Honige verglichen, um zu prüfen, ob sich bei den verschiedenen Verdünnungen Unterschiede bei der Quantifizierung von Tetracyclin zeigen.

Tabelle 6-33: Verschiedene Honige, Verdünnung 1/10 und 1/20, dotiert mit 80 µg/kg Tetracyclin. Gegenüberstellung von Messwerten und über eine Kalibrierung in Mischhonig berechnete Tetracyclinkonzentration; Injektionsvolumen TetR und Honig 10 µl, Fluss: 5 µl/min, dargestellte Werte sind Mittelwerte aus Zweifachinjektionen

	Verdünnung 1/10		Verdünnung 1/20	
	Messwert [Δ RU]	Berechnete Konzentration [µg/kg]	Messwert [Δ RU]	Berechnete Konzentration [µg/kg]
Honig 5	-293	77	-338	86
Honig 8	-228	52	-301	70
Honig 10a	-285	73	-338	86
Honig 13a	-398	126	-366	99
Honig 20a	-412	134	-386	109

Obwohl die Empfindlichkeit bei der Verdünnung des Honigs um Faktor 10 besser war als bei Verdünnung um Faktor 20, zeigten bei der **Verdünnung um Faktor 20** die Honigproben geringere Matrixeffekte die sich zum einen durch niedrigere Messwerte [ΔRU], (Honige 5, 8 und 10a) bemerkbar machten und zum anderen in einer **besseren Quantifizierung der Tetracyclinkonzentration** zeigten. Die Honige 13a und 20a zeigen stärker negative Werte als die Honige 5, 8 und 10a. Die Blanks der Honige 13a und 20a zeigten im Vergleich zu den übrigen Honigen keine Abweichung, der Blank für Honig 13a lag im Bereich vom Blank des Honigs 8, während der Blank von Honig 20

mit dem Wert für Honig 10a vergleichbar war. Der Blank weist nicht darauf hin, dass es sich um falsch-positive Ergebnisse handelt.

Da letztendlich der Screening-Assay auf unterschiedlichste Honigsorten angewendet wird, werden Honigproben im Folgenden **im Verhältnis 1/20** mit Probenpuffer verdünnt.

6.4.1.2 Optimierung von Injektionsvolumen und Analysendauer

Die Erhöhung des Injektionsvolumens bei konstanter Fließgeschwindigkeit ermöglicht eine längere Reaktionszeit zwischen TetR und Tetracyclin, außerdem wird ein größeres Probenvolumen an der Oberfläche vorbeigeführt, und damit eine größere Analytmenge, was die gewählte stärkere Verdünnung von Honigproben ausgleichen kann. Es wurde geprüft, wie sich die Variation des Injektionsvolumens auf die Empfindlichkeit des Screeningtestes auswirkt, indem Kalibrierkurven von Tetracyclin in Mischhonig bei derselben Fließgeschwindigkeit aber unterschiedlichem Injektionsvolumen der Probenlösung aufgezeichnet wurden.

Tabelle 6-34: Kalibrierkurven von Tetracyclin in Mischhonig (Honig 1, Verdünnung 1:20 mit Probenpuffer), verschiedene Injektionsvolumina der Probe mit der Chipoberfläche, Vergleich der Empfindlichkeit. Injektionsvolumen TetR 5 µl (Die geringere Kontaktzeit gegenüber den in Tabelle 6-16 dargestellten Ergebnisse erklärt sich durch die Chronologie der Messungen), Flussrate 5 µl/min

Konzentration Tetracyclin [µg/kg]	Volumen 20µl; Signal [Δ RU]	Volumen 25µl Signal [Δ RU]	Volumen 30µl Signal [Δ RU]
0	-112	-125	-137
5	-138	-157	-177
20	-227	-263	-297
50	-360	-414	-464
100	-501	-563	-614
200	-651	-704	-742
Arbeitsbereich [RU]	539	579	605
IB₅₀-Wert [µg/kg]	56,1	50,1	44,5

Die Empfindlichkeit des Assays kann durch die Erhöhung des Injektionsvolumens gesteigert werden, wie der Vergleich der IB_{50} -Werte in Tabelle 6-34 und Tabelle 6-32 zeigt.

Um eine unnötig lange Dauer des gesamten Messzyklus aufgrund der verlängerten Injektionsdauer (höheres Injektionsvolumen) der Probe zu vermeiden, wurde geprüft, ob sich Verluste in der Empfindlichkeit ergeben, wenn die Injektionsdauer von TetR verkürzt wird (Tabelle 6-35).

Tabelle 6-35: Kalibrierkurven von Tetracyclin in Mischhonig; Gegenüberstellung verschiedener Injektionsvolumina von TetR. Bei 5 μ l Injektionsvolumen musste die Flussrate von 5 auf 10 μ l/min erhöht werden, da 5 μ l das kleinstmögliche Injektionsvolumen ist. Injektionsvolumen der Probe jeweils 30 μ l bei 5 μ l/min

Konzentration Tetracyclin [μ g/kg]	TetR 20 μ l Signal [Δ RU]	TetR 10 μ l Signal [Δ RU]	TetR 7,5 μ l Signal [Δ RU]	TetR 5 μ l Signal [Δ RU]
0	-53	-91	-101	-105
5	-89	-122	-134	-139
20	-162	-205	-212	-213
50	-284	-328	-349	-345
100	-418	-469	-497	-498
200	-540	-607	-626	-637
TetR-Bindung [RU]	580-684	681-726	726-751	748-755
IB_{50}-Wert [μg/kg]	53,0	55,4	53,4	56,0

Wie die Tabelle zeigt, ist die **Verringerung des Injektionsvolumens** (Injektionsdauer) für **TetR ohne signifikanten Verlust der Empfindlichkeit** möglich. Die Gesamt-Analysendauer kann dadurch verkürzt werden, dass die Kontaktzeit (bei konstant gehaltenem Fluss korreliert mit dem Injektionsvolumen) für TetR verringert wird.

Auffallend ist, dass trotz des verringerten Injektionsvolumens die TetR-Bindung an *tetO* zunimmt. Dies erscheint zunächst unlogisch, ist aber vor dem Hintergrund des von

Möller beschriebenen Phänomens, dass die Repressor-Bindung während einer Messreihe zunimmt [188] erklärbar.

Die Entscheidungsgrenze wurde von Möller bei einer Injektionszeit für TetR und Probe von 120 Sekunden bestimmt, die Dauer eines kompletten Messzyklus lag bei 845 Sekunden. Durch die Verdreifachung der Injektionszeit der Probe kann eine höhere Empfindlichkeit erzielt werden. Um die Analysendauer für einen Messzyklus zu optimieren, wurde das Injektionsvolumen (und damit die Injektionsdauer) von TetR um die Hälfte verringert und bei einer höheren Flussrate injiziert (von 10 μl in 2 Minuten, Fluss 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ auf 5 μl in 30 sec, Fluss 10 $\mu\text{l}/\text{min}$). Die Dauer eines Zyklus betrug unter diesen Bedingungen 889 Sekunden, also 40 Sekunden mehr als bei den Ausgangsbedingungen. Trotz der Verlängerung der Injektionsdauer der Probe ist der „Zeitverlust“ auf einen Messzyklus bezogen gering.

Eine Erhöhung des Injektionsvolumens kann auch durch die Erhöhung der Fließgeschwindigkeit während der Probeninjektion erreicht werden. Diese könnte unter Umständen aufgrund der Möglichkeit vorteilhaft sein, dass die unspezifischen Wechselwirkungen der Matrix mit der Chipoberfläche stärker unterdrückt werden, als die spezifische Wechselwirkung zwischen Tetracyclin und TetR. Eine Erhöhung der Flussrate verringert die am Rand der Flusszelle vorhandene langsam bis gar nicht fließende Schicht. Die Folge wäre eine nicht durch Diffusion limitierte Bindung von Tetracyclin an den chipgebundenen Repressor. Eine Erhöhung der Flussrate bei konstantem Injektionsvolumen führt allerdings im Gegenzug zu einer verminderten Kontaktzeit des Tetracyclin mit dem Repressor auf der Chipoberfläche [218]. Um den Einfluss der Flussrate bei der Injektion auf die Wechselwirkungen der Matrix mit der Chipoberfläche zu prüfen, wurden Verdünnungen (1:20) undotierter Honige bei verschiedenen Flussraten injiziert und deren Signale mit denen eines Puffer-Blanks verglichen (Tabelle 6-36).

Tabelle 6-36: Injektion von 4 undotierten Honigen (Verdünnung 1:20) bei verschiedenen Flussraten (verschiedene Injektionsvolumina) im Vergleich zu Probenpuffer, Kontaktzeit Probe - Oberfläche: 6 min bei angegebenem Fluss, Injektion TetR 30 sec bei 10 µl/min. In Fett zu jeder Probe tabelliert ist die Differenz des Signals zum Signal des Probenpuffers

Honig	Fluss 5 µl/min [Δ RU]		Fluss 20 µl/min [Δ RU]		Fluss 50 µl/min [Δ RU]	
2	-92	52	-174	20	-195	12
12	-111	33	-184	10	-212	-5
15	-74	70	-131	63	-144	63
20a	-104	40	-173	21	-197	10
Probenpuffer	-144		-194		-207	

Der Vergleich der erhaltenen Signale bei den verschiedenen Flussraten zeigt, dass die Matrixinterferenzen verschiedener Honige bei höheren Flussraten trotz der größeren Menge, die über die Flusszelle lief, abnahmen. **Generell wird bei höheren Flussraten mehr TetR von tetO abgelöst**, was sich anhand der bei der Injektion von Probenpuffer erhaltenen Daten zeigen lässt. Vergleicht man die Signaldifferenz zwischen Honig und Probenpuffer bei den verschiedenen Flussraten, so wird deutlich, dass die Differenz bei 50 µl/min am kleinsten ist, sich also mit **steigender Flussrate das Signal der Honigprobe dem des Probenpuffers angleicht**. Dieser Effekt könnte zum einen abbilden, dass weniger Matrixinterferenzen bei höheren Flussraten auftreten; zum anderen könnte durch die Forcierung der tetracyclinunabhängigen Ablösung des TetR von tetO bei höheren Flussraten der Einfluss der Honigmatrix überdeckt werden.

Weiterhin wurde untersucht, wie sich der höhere Fluss auf die Detektion von Tetracyclin in dotierten Honigproben auswirkt, es wurden bei verschiedenen Flussraten Kalibrierungen in Mischhonig aufgenommen.

Tabelle 6-37: Kalibrierkurven in Mischhonig bei verschiedenen Flussgeschwindigkeiten während der Probeninjektion

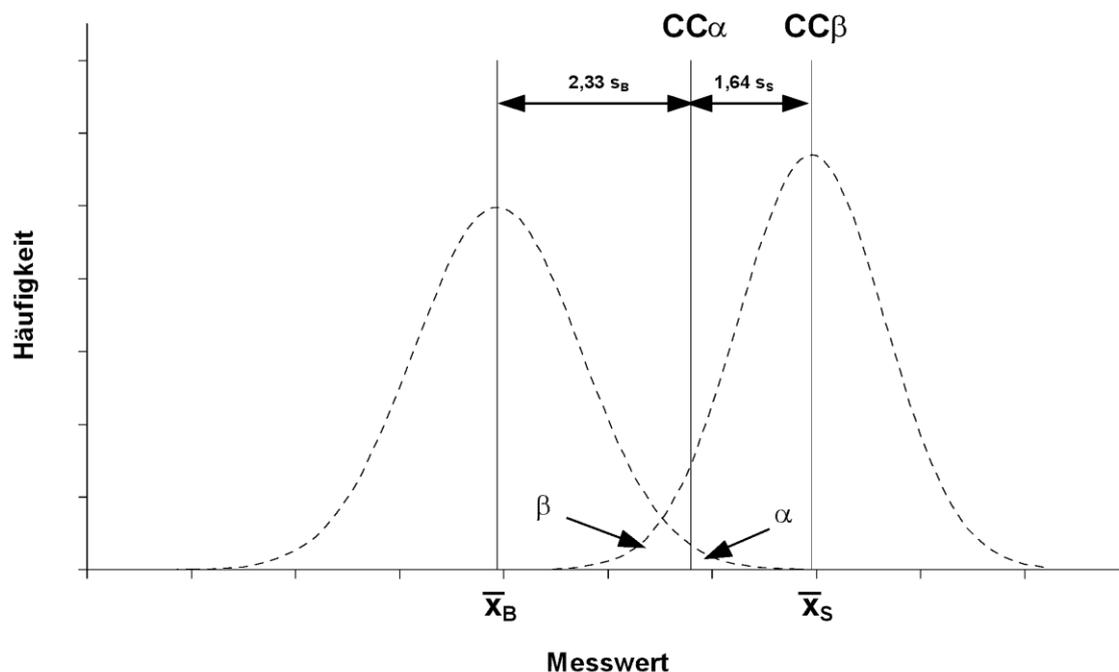
Tetracyclin-Konzentration [µg/kg]	5µl/min [Δ RU]	10µl/min [Δ RU]	20µl/min [Δ RU]
0,01	-86	-139	-203
1	-110	-161	-193
5	-160	210	-243
20	-232	-290	-313
50	-347	-389	-418
200	-476	-523	-538
Arbeitsbereich [RU]	390	384	335
IB₅₀-Wert [µg/kg]	29,1	22,1	33,4

Der Arbeitsbereich der Kalibrierung nahm bei höheren Flussraten ab. Die beste Empfindlichkeit- ausgedrückt als IB₅₀-Wert zeigte die Kalibrierung, die bei 10 µl/min aufgezeichnet wurde (Tabelle 6-37), den größten Arbeitsbereich die Kalibrierung, die bei 5 µl/min aufgezeichnet wurde.

Es ist nicht möglich zu beurteilen, ob die leichte Verbesserung der Empfindlichkeit auf eine veränderte Kinetik oder das höhere Injektionsvolumen zurückzuführen ist. Zwei weitere Kalibrierungen, die in Honig bei verschiedenen Flussraten aufgezeichnet wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Empfindlichkeit des Tests. **Der Einfluss der Fließgeschwindigkeit ist daher möglicherweise nicht so groß, wie es zunächst schien und gegenüber der Erhöhung des Injektionsvolumens zu vernachlässigen.** Aufgrund der Geräteparameter war es nicht möglich, die Flussrate in Abhängigkeit der Kontaktzeit und des Injektionsvolumens zu variieren, es konnten entweder verschiedene Fließgeschwindigkeiten oder verschiedene Injektionsvolumina getestet werden.

6.4.2 Bestimmung der Entscheidungsgrenze nach Optimierung der Arbeitsparameter

Um zu prüfen, ob durch die Optimierung von Probenverdünnung und Kontaktzeit die Entscheidungsgrenze gegenüber der von Möller ermittelten verbessert wurde, wurde unter den optimierten Bedingungen die Entscheidungsgrenze (critical concentration, CC_{α}) bestimmt. Nach der Entscheidung 2002/657/EG der Kommission zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen [210] ist die Entscheidungsgrenze der Wert, bei und über dem mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von α (5%) bestimmt werden kann, dass eine Probe positiv ist. Für Stoffe, für die kein zulässiger Grenzwert festgeschrieben wurde – dazu gehören Tetracycline in Honig- kann die Entscheidungsgrenze dadurch bestimmt werden, dass 20 Leerproben pro Matrix analysiert werden, um das Signal/Rauschverhältnis zu berechnen. Die Summe aus Signal und dem dreifachen Signal/Rauschverhältnis kann als Entscheidungsgrenze verwendet werden. Eine graphische Darstellung zur Verdeutlichung der analytischen Grenzen (CC_{α} und CC_{β}) ist in der folgenden Abbildung dargestellt [210]:



- \bar{x}_S mittlerer Messwert der verunreinigten Probe
- s_B Standardabweichung der Leerwertprobe (bestimmt unter laborinternen Reproduzierbarkeitsbedingungen)
- s_S Standardabweichung der verunreinigten Probe (bestimmt unter laborinternen Reproduzierbarkeitsbedingungen)
- α Rate falsch positiver Ergebnisse
- β Rate falsch negativer Ergebnisse
- $CC\alpha$ Messwert mit einem gegebenen α -Fehler und 50%- β -Fehler
- $CC\beta$ Messwert mit einem sehr kleinen α -Fehler und einem gegebenen β -Fehler
- \bar{x}_B mittlere „Konzentration“ der Leerwertprobe

Abbildung 6-51: Bestimmung von $CC\alpha$ und $CC\beta$ bei Stoffen, für die kein zulässiger Grenzwert festgelegt ist

Um die Nachweisgrenze zu bestimmen, wurden zwei Messreihen mit verschiedenen Honigen durchgeführt. In der zweiten Messreihe wurden im Gegensatz zur ersten überwiegend sortenreine Honige untersucht. Jeweils 20 Honigproben wurden im Verhältnis 1:20 mit Probenpuffer verdünnt und undotiert untersucht, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu berechnen. Eine Kalibrierkurve wurde durch Dotierung von

Mischhonig 1 mit Tetracyclin und Messen der Lösungen erhalten, über die das erhaltene Leerwertsignal in die entsprechende Konzentration in $\mu\text{g}/\text{kg}$ Honig umgerechnet werden konnte. Die Entscheidungsgrenze wurde berechnet, indem das Dreifache der Standardabweichung zum Mittelwert addiert und über die Kalibrierkurve die zugehörige Konzentration berechnet wurde. Die Ergebnisse der beiden Messreihen, die sich nur in der Auswahl der Proben unterschieden, sind in Tabelle 6-38 und Tabelle 6-39 wiedergegeben.

Tabelle 6-38: Messreihe 1 zur Berechnung der Entscheidungsgrenze. Proben Honig1 bis 21 wurden zur Bestimmung des Leerwertes undotiert gemessen. Honig 1 wurde zur Erstellung der Kalibrierkurve mit den angegebenen Tetracyclinkonzentrationen dotiert und ebenfalls gemessen
Verdünnung der Honigproben 1:20, Injektionsvolumen 30 µl bei 5 µl/min. Die Messung wurde auf einem Sensorchip mit einem Immobilisierungslevel von 1184 RU („1x Biotin“) durchgeführt.
Messwerte sind Mittelwerte aus Dreifachinjektionen

Kalibrierung		Probe	Honigart	Messwert [Δ RU]
Konzentration TC [µg/kg]	Messwert [Δ RU]	Honig 1	Mischhonig	-82
0	-82	Honig 2	Orangenblütenhonig	-113
5	-119	Honig 3	Waldhonig	-119
20	-208	Honig 4	unverarbeiteter Blütenhonig	-120
80	-455	Honig 5	Imker Auslese	-213
200	-727	Honig 6	Blütenhonig naturrein	-121
400	-910	Honig 7	Thymianhonig	-129
		Honig 8	Eukalyptushonig	-142
		Honig 9	Rapshonig	-166
		Honig 10a	Waldhonig	-118
		Honig 11	ausländischer Bienenhonig	-135
		Honig 12	Frühlingsblütenhonig	-163
		Honig 13a	Sommerblüte mit Akazienhonig	-160
		Honig 14a	Gebirgsblütenhonig	-138
		Honig 15	Waldhonig	-95
		Honig 16	Imker Honig	-124
		Honig 17a	Sonnenblumenhonig	-117
		Honig 18	Akazienhonig	-139
		Honig 19a	Sommerblüte	-131
		Honig 20a	Frühlingsblüte	-151
		Honig 21	Zitronenhonig	-149
		Mittelwert	-	-133
		Standardabweichung	-	18

Die Entscheidungsgrenze in dieser Messreihe berechnet sich zu 17 µg/kg. In dieser Bestimmung wurden bis auf zwei Ausnahmen dieselben Honige verwendet, die von Möller für die Ermittlung der Entscheidungsgrenze eingesetzt wurden. Die ermittelte Entscheidungsgrenze lag in derselben Größenordnung der von Möller ermittelten (14 µg/kg). Die von Möller bestimmte Entscheidungsgrenze konnte durch die Optimierung der Arbeitsparameter zwar in ihrer Größenordnung reproduziert, nicht aber verbessert werden. Eine weitere Messreihe wurde unter gleichen Bedingungen mit 20 weiteren, zumeist sortenreinen Honigen vorgenommen und die Entscheidungsgrenze berechnet.

Tabelle 6-39: : Messreihe 1 zur Berechnung der Entscheidungsgrenze. Proben Honig1 bis 41 wurden zur Bestimmung des Leerwertes undotiert gemessen. Honig 1 wurde zur Erstellung der Kalibrierkurve mit den angegebenen Tetracyclinkonzentrationen dotiert und ebenfalls gemessen. Verdünnung der Honigproben 1:20, Injektionsvolumen 30 µl bei 5 µl/min. Die Messung wurde auf einem Sensorchip mit einem Immobilisierungslevel von 998 RU („1x Biotin“) durchgeführt. Messwerte sind Mittelwerte aus Dreifachinjektionen

Kalibrierung		Probe	Honigart	Messwert [Δ RU]
Konzentration TC [µg/kg]	Messwert [Δ RU]	Honig 1	Mischhonig	-114
0	-114	Honig 22	Lindenhonig	-126
5	-137	Honig 23	Goldrutenhonig	-90
20	-215	Honig 24	Kornblumenhonig	-105
80	-441	Honig 25	Buchweizenhonig	-74
200	-692	Honig 26	Balsaminenhonig	-92
400	-834	Honig 27	Rapshonig	-131
		Honig 28	Robinienhonig	-133
		Honig 29	Phaeceliahonig	-121
		Honig 30	Heidehonig	110
		Honig 31	RotkleeHonig	-143
		Honig 32	Blütenhonig	-138
		Honig 33	Weidenhonig	-120
		Honig 34	Lindenhonig	-134
		Honig 35	Frühjahrsblüte	-109
		Honig 36	Sommerblüte	-90
		Honig 37	Rapshonig	-122
		Honig 38	Wickenhonig	-94
		Honig 39	Sonnenblumenhonig	-2
		Honig 40	Götterbaumhonig	-122
		Honig 41	Sommertracht	-114
		Mittelwert		-98
		Standardabweichung		58

Die Entscheidungsgrenze für verschiedene, zumeist sortenreine Honige berechnet sich zu 33 µg/kg. Dieser vergleichsweise hohe Wert ist insbesondere auf einen Heidehonig (Honig 30) zurückzuführen, der eine stark positive Signaldifferenz (Messpunkt t_2 , t_1) lieferte, dadurch resultierte eine hohe Standardabweichung. Da diese bei der Berechnung der Entscheidungsgrenze mit Faktor 3 eingeht, resultiert eine hohe Entscheidungsgrenze.

Die Optimierung der Arbeitsparameter zeigt, dass die Probenverdünnung und die Kontaktzeit der Probe mit der Oberfläche wichtige Parameter sind, über die Einfluss auf die Empfindlichkeit des Assays genommen werden kann. Die Optimierung der Empfindlichkeit hinsichtlich verschiedener Parameter führte jedoch in der Summe nicht zur Verbesserung der Entscheidungsgrenze. Um die Entscheidungsgrenze herabzusetzen, muss der Messung eine Probenvorbereitung vorangehen, die selektiv störende Matrixkomponenten im Honig entfernt.

6.5 Versuche zur Identifizierung und Entfernung von störenden Matrixbestandteilen in Honig

Wie in 6.4.2 gezeigt wurde, zeigten verschiedenen Honige eine unterschiedlich starke Wechselwirkung mit der Chipoberfläche, die die Ablösung von Repressor durch die Bindung von Matrixbestandteilen überlagert (Tabelle 6-38 und Tabelle 6-39). Verschiedene Methoden zur Probenaufarbeitung sollten Aufschluss darüber geben, welche Honigbestandteile (Zucker, Proteine, Lipide) sich störend auf den Assay auswirken, indem jeweils selektiv einzelne Bestandteile entfernt wurden.

6.5.1 Selektiver Abbau einzelner Honigbestandteile

6.5.1.1 Abbau von Zuckern

Eine Lösung verschiedener Zucker, die dem Zuckerprofil von Honig entsprach (siehe Kapitel 9.4.8) wurde eingesetzt, um zu ermitteln, ob insbesondere eine hohe Zuckerfracht zu unspezifischen Wechselwirkungen führt.

Tabelle 6-40: Vergleich von Puffer, Zuckerlösung und Honig, Zuckerlösung und Honig im Verhältnis 1/20 mit Probenpuffer verdünnt, Mittelwerte aus 10 Injektionen

Puffer Response [Δ RU]	Zuckerlösung (Honigimitat) Response [Δ RU]	Mischhonig Response [Δ RU]
-124	-98	-114

Durch die Injektion von Puffer werden im Zeitraum der Probeninjektion 124 RU TetR abgelöst. Die Tabelle zeigt, dass das **Signal des Mischhonigs nur wenig von dem der Pufferinjektion abweicht**, sich hier also nur **wenige Matrixinterferenzen** beobachten lassen. Bei der Injektion des „Honigimitates“ wurden gegenüber Probenpuffer signifikant positivere Messwerte erhalten. Dies kann als Hinweis auf die **unspezifische Bindung von Zuckerkomponenten** an die Chipoberfläche gedeutet werden. Im Honig liegen Zucker in großer Menge vor, diese können aufgrund zahlreicher Hydroxylfunktionen Wasserstoffbrückenbindungen zu Hydroxylfunktionen der

Carboxymethyldextranschicht oder der Operator-DNA ausbilden und über diesen Mechanismus unspezifisch binden. Ein Maß für unspezifische Bindung von Matrixkomponenten ist die Differenz des vor und nach Probeninjektion abgelesenen Signals. Dieses bildet mehrere Effekte ab: Durch den Fluss des Laufpuffers werden geringe Mengen TetR kontinuierlich von *tetO* abgelöst und aus der Flusszelle transportiert, so dass bei der Injektion von Pufferlösungen, die keine Wechselwirkungen mit der Sensorchipoberfläche zeigen, ΔRU ein negatives Vorzeichen hat. Die Größe von ΔRU ist von der Injektionsdauer abhängig. Dazu kommt die spezifische Ablösung von TetR durch Tetracyclin, unter Umständen auch die unspezifische Ablösung von TetR durch hohe Ionenstärken (siehe 6.3.8). Diese drei Effekte führen zu stärker negativen ΔRU -Werten. Die unspezifische Bindung von Matrixkomponenten wirkt dem entgegen und führt zu weniger negativen ΔRU -Werten. Starke unspezifische Bindungen können durch die Überlagerung der TetR-Ablösung auch zu insgesamt positiven ΔRU -Werten führen. Im besten Fall (keine oder wenig unspezifische Bindung) liegt das Signal bei der Probeninjektion nahe dem Wert, der durch die Injektion von Puffer hervorgerufen wird.

Mikrobiologischer Abbau

Es wurde untersucht, ob durch einen mikrobiologischen Abbau der Zucker mit Bäckerhefe die unspezifische Bindung an die Chipoberfläche verringert werden kann.

Für die Untersuchung wurden neben einem Mischhonig (Honig 1) Honige ausgewählt, die in vorangegangenen Messungen durch hohe unspezifische Wechselwirkungen aufgefallen waren. Die Honige wurden mit Puffer verdünnt und mit je 20 mg Trockenhefe 18 h bei 35 °C unter Schütteln inkubiert. Die Proben wurden zur Abtrennung der Hefen vor der Injektion zentrifugiert.

Tabelle 6-41: unspezifische Matrixbindung verschiedener Honigproben vor und nach der Inkubation mit Hefe, Mittelwerte aus drei Injektionen; Inkubation von Honiglösung (0,5 g Honig in 9,5 g Probenpuffer) mit 20 mg Trockenhefe 18 h, 35 °C unter Schütteln Proben wurden vor der Messung zur Abtrennung der Hefen zentrifugiert. Injektionsvolumen Probe: 30 µl bei einer Flussrate von 5 µl/min

Signal	Honig 1 [Δ RU]	Honig 7 [Δ RU]	Honig 15 [Δ RU]	Honig 30 [Δ RU]
unbehandelt	-46,5	-50,9	-106,3	271,7
nach Verhefung	230,1	162,3	85,1	28,9

Nur im Fall des Heidehonigs (Honig 30) erfolgt durch die Verhefung eine Minderung der unspezifischen Bindung von Matrixbestandteilen. Bei den weiteren Honigproben wurden deutlich positive ΔRU-Werte erhalten, die zeigen, dass Matrixinterferenzen deutlich zugenommen haben. Dies ist darauf zurückzuführen, dass von der Hefe Stoffwechselprodukte gebildet werden, die in höherem Maße als die Zucker vor der Verhefung an die Chipoberfläche binden. Beim Heidehonig könnten durch Hefen neben den Zuckern auch andere Bestandteile, beispielsweise Proteine abgebaut worden sein, die vor der Verhefung der Probe zu einer sehr hohen Bindung an die Chipoberfläche führten und in den übrigen Honigen nicht enthalten waren.

Ein mikrobiologischer Abbau der Zucker durch Hefen führt nur in Einzelfällen zur Reduktion unspezifischer Wechselwirkungen und ist somit nicht als Probenaufarbeitung geeignet.

Chemischer Abbau

Zum chemischen Abbau der Zucker wurden diese einer oxidativen Spaltung mit Periodsäure unterzogen werden. Dabei bildet sich mit zwei vicinalen Hydroxylgruppen unter Wasserabspaltung ein zyklischer Periodsäure-Diester. Dieser zerfällt durch zyklische Elektronenverschiebung in zwei Carbonylfragmente und Iodsäure. Zucker können auf diese Weise zu C1-Körpern abgebaut werden, je nach Konfiguration der Zucker bilden sich unterschiedliche Mengen Ameisensäure, Formaldehyd und Kohlendioxid. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 6-52 dargestellt:

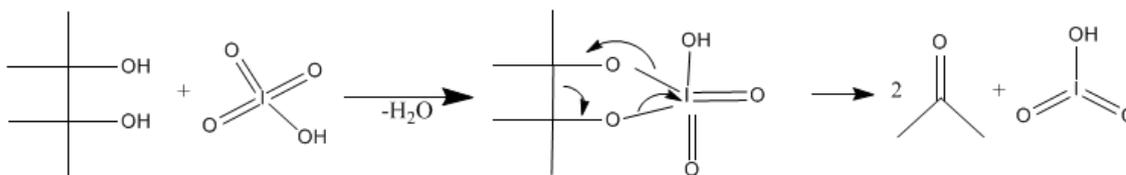


Abbildung 6-52: Mechanismus der Periodatspaltung vicinaler Hydroxyfunktionen nach Malaprade (schematische Darstellung)

Ein Mischhonig, sowie Zuckerlösung (Honigimitat), wurden mit stöchiometrischen Mengen Periodsäure umgesetzt, und über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Nach der Reaktion wurden die Reaktionsansätze im Verhältnis 1:5 und 1:10 mit Probenpuffer verdünnt. Der stark saure pH-Wert der Lösungen wurde vor der Injektion der Probenlösungen auf pH 7,4 korrigiert, wodurch sich eine erhebliche zusätzliche Verdünnung der Proben ergab. Eine Filtration der Proben wurde vorgenommen, da sich in den weniger verdünnten Proben ein feiner, weißer Niederschlag zeigte.

Tabelle 6-42: Matrixbindung nach Periodatoxidation von Mischhonig (Honig 1) und Honigimitat, verschiedene Verdünnungen gemessen gegen Blindwerte von Puffer, unbehandeltem Honig und Honigimitat. Dargestellte Werte sind Mittelwerte aus Zweifachinjektionen.

Verdünnung	Blindwert			nach Zuckerspaltung	
	Probenpuffer [Δ RU]	Honigimitat [Δ RU]	Honig 1 [Δ RU]	Honigimitat [Δ RU]	Honig 1 [Δ RU]
1/5	-44	-26	-24	-182	-187
1/10	-43	-31	-30,4	-144	-149

Tabelle 6-42 zeigt die nach der Periodatoxidation erhaltenen Δ RU-Werte. Proben, die mit Periodsäure behandelt wurden, lieferten deutlich negativere Δ RU-Werte als unbehandelte. Das stark negative Signal ist auch auf die hohe Ionenstärke der mit Periodsäure oxidierten Proben zurückzuführen. Neben der Periodsäure trug das Einstellen des pH-Wertes mit NaOH zur Erhöhung der Ionenfracht bei. Die verdünnten Proben zeigen daher weniger Ablösung von TetR. Die Oxidation der Zucker mittels Periodat ist als Probenaufarbeitung für die SPR-Messungen nicht geeignet, da die dabei auftretenden hohen Ionenfrachten zu einer unspezifischen Ablösung von TetR führen (siehe Kapitel 6.3.8).

6.5.1.2 Entfernung und Abbau von Proteinen

Bekanntermaßen führen Proteine in der SPR häufig zu Problemen durch unspezifische Bindungen an die Sensoroberfläche [219]. In Honig sind 0,3 – 0,4% Stickstoffverbindungen (berechnet als Protein) enthalten, der überwiegende Teil davon sind Proteine und Aminosäuren. Die Proteinbestandteile stammen mehrheitlich aus den Sekreten, die Bienen dem Honig zusetzen. Auch Pollen tragen in geringer Menge zu den Stickstoffverbindungen bei [220]. Honig enthält eine Reihe von Enzymen wie beispielsweise Diastase, Invertase und Glucoseoxidase [220]. Verschiedene Techniken wurden eingesetzt, um Proteine aus den verdünnten Honigproben zu entfernen.

Hitzebehandlung

Durch eine Hitzebehandlung kann die Denaturierung von Proteinen erreicht werden, eine anschließende Zentrifugation kann zur Abtrennung der denaturierten Proteine dienen. Durch Erhitzung auf 85 – 90 °C im Wasserbad für 15 min konnte jedoch keine signifikante Abnahme der Matrixeffekte bei den Honigen 2, 12, 13a, 15, 16 und 20a beobachtet werden. Im Weiteren wäre zu prüfen gewesen, wie sich Tetracyclinrückstände bei der Erhitzung verhalten.

Ultrafiltration

Verdünnte Honigproben wurden über verschiedene Ultrafiltrationseinheiten filtriert, um zu prüfen, ob auf diesem Wege Proteine oder andere hochmolekulare Stoffe aus den Honigproben entfernt werden können und daraus geringere Matrixinterferenzen der ultrafiltrierten Proben resultieren.

Tabelle 6-43: Entfernung von Proteinen aus verschiedenen Honigen mittels Ultrafiltration. Mittelwerte aus drei Injektionen. Eingesetzte Filtrationseinheiten: Vivascience vivaspin 5000, Polyethersulfon (PES), Cut-Off 5000 Da; Millipore Microcon YM-10, regenerierte Cellulose, Cut-off 10000 Da. Zentrifugation der Filter bei 5200xg bis zu einem Filtratvolumen >300 µl (Volumen zur Filtration 500 µl)

	Honig 1 [Δ RU]	Honig 7 [Δ RU]	Honig 15 [Δ RU]	Honig 30 [Δ RU]	Honig 39 [Δ RU]
Unfiltriert	-75	-82	-58	81	-8
Filtriert, PES MWCO 5kDa	-35	-36	-47	-30	-19
Filtriert, MWCO 10kDa Reg. Cellulose	-73	-66	-16	-45	-15

Die Filtrate der Filtration über Polyethersulfon mit Cut-Off von 5000 Da waren farblos, eine Anlagerung von farbgebenden Komponenten an der Membran war deutlich zu erkennen. Bei der Filtration über regenerierte Cellulose mit Cut-Off von 10000 Da wurden teils farblose, teils blassgelb gefärbte Filtrate erhalten. Tabelle 6-43 zeigt die Wirkung der Ultrafiltration auf die unspezifischen Wechselwirkungen verschiedener Honige: Bei den Honigen 1, 7 und 15 führt die Ultrafiltration nicht zu einer Verbesserung. Bei Honig 30 ist allerdings eine deutliche Reduktion der unspezifischen Wechselwirkungen durch die Ultrafiltration zu erkennen. Dies lässt darauf schließen, dass die hohen unspezifischen Wechselwirkungen von Honig 30 auf Makromoleküle wie beispielsweise Proteine zurückzuführen sind, die bei der Ultrafiltration abgetrennt werden. Ein Ultrafiltrationsschritt zur Entfernung störender Matrixproteine wird auch von Johnsson et al. beschrieben [219].

Material und Cut-Off der verwendeten Filtereinheiten unterschieden sich; und damit auch die Filtrationseigenschaften. Es kann ohne weitergehende Studien keine Aussage getroffen werden, welche Filtrationseinheiten besser geeignet sind, da sich bei den verschiedenen Honigen ein sehr uneinheitliches Bild ergab. Honige 1, 7 und 30 zeigten nach der Ultrafiltration durch regenerierte Cellulose geringere Wechselwirkungen, Honige 15 und 39 zeigten nach der Ultrafiltration durch PES bessere Ergebnisse. **Ein Ultrafiltrationsschritt kann demnach dazu beitragen, Komponenten zu entfernen, die unspezifisch mit der Chipoberfläche wechselwirken.** Die Ultrafiltration ist jedoch

nicht für alle Honige effektiv und kann daher nicht standardmäßig als Probenvorbereitung eingesetzt werden, da manche Honige nach der Ultrafiltration positivere Signale zeigten und vor der Messung nicht bekannt ist, welche Honige wie stark an die Chipoberfläche binden.

Abbau durch Protease

Eine weitere Möglichkeit bietet der enzymatische Abbau von Proteinen zu Peptiden und Aminosäuren, wobei sich sinnvollerweise an den enzymatischen Abbau eine Ultrafiltration anschließen sollte, um Proteasen zu entfernen, die anderenfalls wiederum unspezifisch an die Chipoberfläche binden oder das Streptavidin auf dem SA-Chips angreifen könnten [221]. Es sollte geprüft werden, ob nach einem enzymatischen Abbau der Proteine geringere Matrixinterferenzen gemessen werden. Verdünnte Honigproben wurden mit 50 µl Subtilisinlösung (10 mg/ml) für 2 h bei 60 °C inkubiert. Aliquote des Verdau wurden unfiltriert und nach Ultrafiltration injiziert und die erhaltenen Messwerte verglichen (Tabelle 6-44).

Tabelle 6-44: Proteasebehandlung verschiedener Honige : je Probe 50 µl Subtilisinlösung (10 mg/ml), Inkubation 2 h bei 60 °C. Anschließend Ultrafiltration durch Vivascience vivaspin 500, Polyethersulfon (PES), Cut-Off 5000 Da; Millipore Microcon YM-10, regenerierte Cellulose, Cut-off 10000 Da. Mittelwerte aus n=3

	blank	Verdau unfiltriert	Verdau filtriert Microcon YM 10	Verdau filtriert Vivaspin 5000
	[Δ RU]	[Δ RU]	[Δ RU]	[Δ RU]
Honig 1	-73	-83	-54	-40
Honig 7	-121	-285	-86	-64
Honig 30	226	-106	-41	-24

Die Proteasebehandlung mit anschließender Ultrafiltration lieferte vergleichbare Ergebnisse zur Ultrafiltration ohne vorherige Proteasebehandlung: nur für Honig 30 ist nach der Ultrafiltration der Messwert negativer als der Wert vor dem enzymatischen Proteinabbau und Ultrafiltration (Tabelle 6-44). Allerdings zeigten die durch Filtereinheiten aus regenerierter Cellulose filtrierten Honigproben negativere Messwerte. Bei der Injektion von enzymbehandelten Honigproben, aus denen Protease (Subtilisin) nicht abgetrennt wurde, wurden deutlich negativere Δ RU-Werte erhalten als bei unbehandelten Honigen, dies wird im Folgenden diskutiert.

Einfluss der Protease auf das Messsystem

Der Effekt, dass beim proteasebehandelten Honig stark negative Signale auftraten, ist möglicherweise auf das Vorhandensein des Enzyms in der Messlösung zurückzuführen. Da die Protease in der Lösung noch aktiv ist, können in der Flusszelle mehrere Komponenten angegriffen werden: das an *tetO* gebundene TetR kann proteolytisch abgebaut werden, und zu einer detektierbaren Massenänderung an der Oberfläche führen. Die Ablösung des TetR lässt sich am Signal für die Probeninjektion ablesen, nicht jedoch der Grund für die Ablösung. Für eine Einschätzung der Auswirkungen von Subtilisin im Assay wurden Mehrfachinjektionen von Probenpuffer ohne und mit 10 mg/ml Subtilisin vorgenommen und die Signale für TetR-Bindung und Basislinie aufgezeichnet.

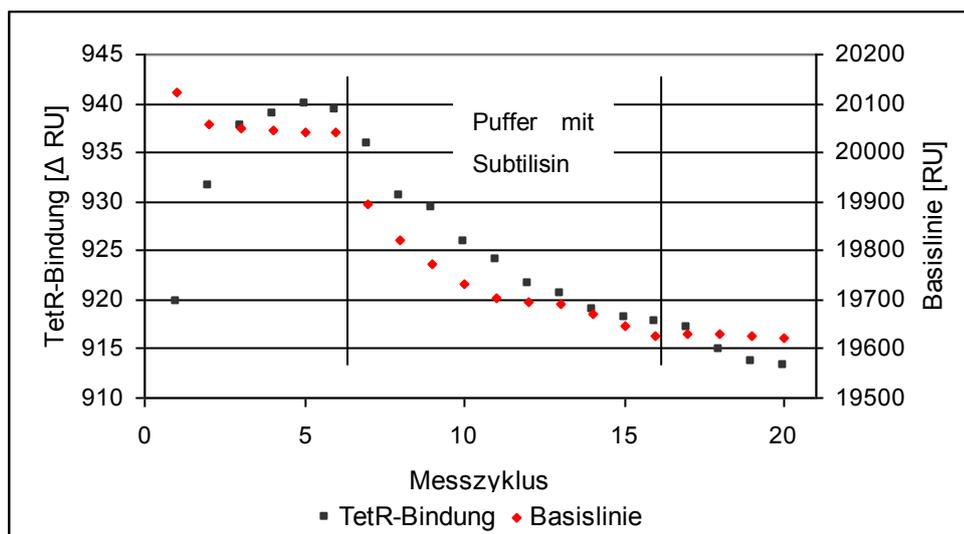


Abbildung 6-53: Verlauf von Basislinie und TetR-Bindung bei Injektion von Subtilisin in Puffer. Messzyklus 1 - 5 und 16 - 20: Injektion von Probenpuffer, Messzyklen 6 - 15: Injektion von Subtilisinlösung 10 mg/ml

Abbildung 6-53 zeigt, dass die TetR-Bindung während der ersten 6 Zyklen- also der Injektion von Probenpuffer erwartungsgemäß ansteigt, danach jedoch kontinuierlich abfällt, entgegen dem sonst beobachteten Anstieg der TetR-Bindung. Bei der Injektion von Probenpuffer ab Zyklus 16 ist weiterhin ein leichter Abfall der TetR-Bindung zu beobachten. Die Basislinie ist während der Injektion von Probenpuffer relativ konstant, fällt aber während den Messzyklen, in denen Subtilisin injiziert wurde um ca. 300 RU ab. Diese Beobachtung kann durch den enzymatischen Abbau von Streptavidin erklärt

werden, die Ablösung beziehungsweise der Abbau von Streptavidin führt aufgrund des hohen Molekulargewichtes zu einem Absinken der Basislinie. Die Ursache der abnehmenden TetR-Bindung bleibt dabei unklar.

In einer weiteren Messung wurde die Subtilisinlösung vor der Injektion für 2 Stunden bei 60 °C inkubiert, wie es der Probenvorbereitung für Honig entspricht (Tabelle 6-45).

Tabelle 6-45: Gegenüberstellung der Signaldifferenz vor und nach der Injektion von Subtilisinlösungen im Verlauf von 10 Messzyklen und Differenz der Messwerte für die Basislinie zwischen den Messpunkten t_1 zweier aufeinanderfolgenden Zyklen. Die Injektion von Subtilisin erfolgte nach der Beladung des Operators mit TetR.

Zyklus	Basislinie [Δ RU]	Signal [Δ RU]
6	-145	-255
7	-73	-186
8	-50	-164
9	-38	-153
10	-31	-147
11	nicht auswertbar	nicht auswertbar
12	nicht auswertbar	nicht auswertbar
13	-23	-143
14	-21	-135
15	-21	-135

Die Δ RU-Werte für die Subtilisininjektionen nehmen mit steigender Zyklenzahl ab. Eine Abnahme derselben Größenordnung zeigt auch die Basislinie (Differenz von Messwerten an t_1 zweier aufeinanderfolgender Zyklen). Daher ist wahrscheinlich, dass die Abnahme der Signaldifferenz auf den Abfall der Basislinie zurückgeführt werden kann.

TetR wird in jeder Messung vor der Injektion der Probenlösung injiziert, ein Abbau des TetR durch die Protease wäre daher nur denkbar, wenn die Protease dauerhaft im Flusssystem vorhanden ist und durch die Regeneration mit SDS nicht inaktiviert wird. Ein Abbau von TetR durch die Protease würde das Signal verändern, sich aber nicht

negativ auf das Messsystem auswirken. Möglich wäre allerdings, dass durch den enzymatischen Abbau von TetR Fragmente des Repressors an der DNA verbleiben und diese für die Repressorbindung in nachfolgenden Zyklen blockieren. Es bleibt auch zu prüfen, ob beim immobilisierten Streptavidin gegenüber in Lösung vorliegendem Veränderungen in der Molekülstruktur auftreten.

Um den Einfluss von Protease auf *tetO* zu ermitteln, wurde eine Subtilisinlösung injiziert, ohne dass *tetO* vorher mit Repressor beladen wurde. Das Signal wurde nach der Injektion 60 Minuten lang aufgezeichnet und mit dem Signal einer Probenpufferinjektion verglichen. Die Sensorgramme sind in Abbildung 6-54 übereinandergelegt.

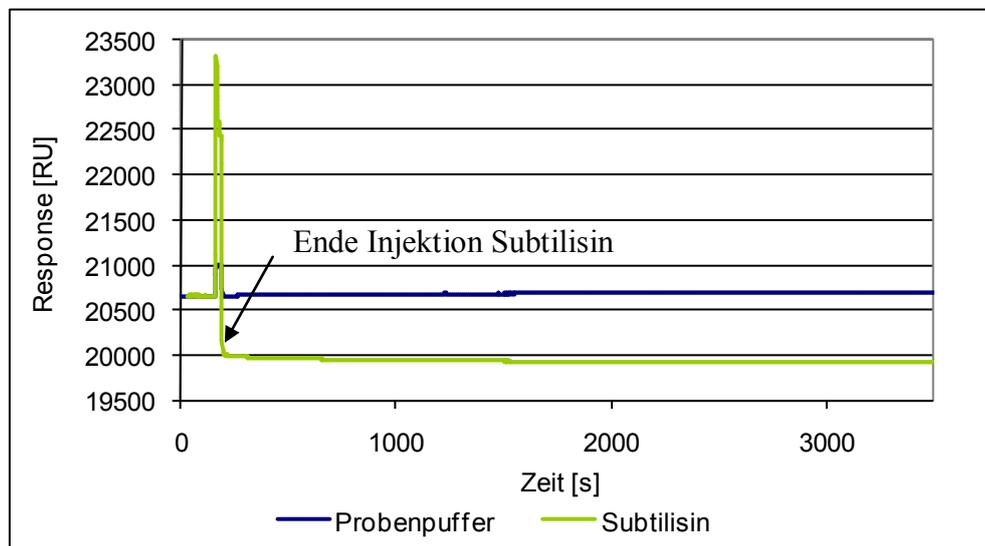


Abbildung 6-54: Vergleich der Injektion von Probenpuffer (blaue Linie) und Subtilisinlösung (10 mg/ml Probenpuffer) (grüne Linie). Das Sensorgramm für die Subtilisininjektion zeigt einen deutlichen Signalabfall während und auch noch nach der Injektion. Injektionsvolumen 5 μ l bei einer Flussrate von 10 μ l/min

Nach der Injektion von Probenpuffer (blaue Linie in Abbildung 6-54) steigt das Signal leicht an. Dahingegen zeigt die Injektion von Subtilisinlösung einen deutlichen Abfall des Signals um etwa 680 RU während der Injektion und weitere 75 RU nach der Injektion.

Die Injektion von proteasehaltigen Lösungen führt zu einem Abfall des Basisliniensignals, der auf den Abbau von Streptavidin zurückzuführen sein kann. Wird die Bindung Streptavidin-Biotin durch den enzymatischen Abbau von Streptavidin beeinträchtigt, so wäre eine Ablösung des biotinmarkierten *tetO* von der Oberfläche die

Folge. Damit einhergehend wäre eine geringere Repressorbindung zu erwarten. Die Fixierung von *tetO* an der Chipoberfläche erfolgt über eine Biotin-Streptavidin-Bindung. Untersuchungen von Ellison et al. mit Avidin und Proteinase K – eine dem Subtilisin ähnliche Serinprotease – zeigen, dass Avidin durch die Proteinase abgebaut wird. Eine Absättigung von Avidin mit Biotin verhindert diesen Abbau [221]. Übertragen auf die Situation an der Sensorchipoberfläche ist daher ein proteolytischer Abbau von Streptavidin wahrscheinlich. Eine vollständige Sättigung des Streptavidins mit biotinmarkierter DNA kann für die Sensoroberfläche aufgrund der sterischen Hinderung durch den DNA-Rest nicht postuliert werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Abtrennung der Protease vor der SPR-Messung erfolgen muss, ein Regenerationsschritt mit SDS reicht nicht aus. Die Abtrennung der Protease durch Ultrafiltration führte bei verschiedenen Honigproben zu uneinheitlichen Ergebnissen. Daher ist der enzymatische Proteinabbau als routinemäßige Probenvorbereitung nicht geeignet.

6.5.1.3 Abtrennen von Lipiden

Honig enthält geringe Mengen Lipide [222], die unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen eingehen könnten. Zwei Honigproben mit starker unspezifischer Bindung an den Chip wurden mit Hexan ausgeschüttelt, um Lipide und Wachse aus dem Honig zu entfernen und zu prüfen, ob sich dadurch die unspezifische Bindung der Honige verringern lässt.

Tabelle 6-46: Vergleich von Sonnenblumenhonig (Honig 39) und Heidehonig (Honig 30) vor und nach der Reinigung mit Hexan zur Entfernung von Lipiden. Mittelwerte aus Dreifachinjektion

	Honig 39 Signal [ΔRU]	Honig 30 Signal [ΔRU]
unbehandelt	-16	374
mit Hexan gereinigt	329	384

Die Hexanbehandlung der Honige führte im Fall von Honig 39 zu einem stark positiven Signal, im Fall von Honig 30 bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der hexanbehandelten und der unbehandelten Probe.

Die üblicherweise eingesetzte Regeneration war bei den hexangereinigten Honigproben nicht ausreichend. Im Fall von Honig 39 stieg die Basislinie sprunghaft (~250 RU) nach der Injektion der mit Hexan extrahierten Proben, im Fall von Honig 30 kontinuierlich. In Kombination mit dem positiven Signal bei der Probeninjektion deutet dies darauf hin, dass durch Ausschütteln mit Hexan entweder Komponenten in die Honigproben eingetragen werden oder mit Bestandteilen aus Honig reagieren, die an die Chipoberfläche binden. Durch das Ausschütteln der Honigproben mit Hexan wurde keine Verringerung der unspezifischen Wechselwirkungen erreicht.

6.5.2 Flüssig/Flüssig-Extraktion und Festphasenextraktion von Tetracyclinen

Zur Verbesserung der Entscheidungsgrenze für die Bestimmung von Tetracyclin in Honig müssen Verfahren zur Probenvorbereitung eingesetzt werden, die störende Matrixbestandteile abtrennen. Gleichzeitig kann eine Anreicherung von Tetracyclin stattfinden und so die Empfindlichkeit des Assays erhöht werden. Gängige Verfahren für die Reinigung von Proben und die Anreicherung von Analyten sind Extraktionsverfahren. Man unterscheidet zwischen Flüssig/Flüssig-Extraktion (LLE) und Festphasenextraktion (SPE). Bei ersterer stellt sich ein Verteilungsgleichgewicht des Analyten zwischen zwei flüssigen Phasen ein; bei der Festphasenextraktion wird der Analyt an einer festen Phase adsorbiert und nach Waschen der Phase zur Entfernung von Matrixkomponenten mit einem geeigneten Fließmittel eluiert.

6.5.2.1 Flüssig/Flüssig-Extraktion

Von Ræzke wird zur Anreicherung von Tetracyclin aus Honig eine Flüssig/Flüssig-Extraktion vorgeschlagen [223]. Die Verteilung der Tetracycline erfolgt zwischen einer wässrigen Phase (Oxalsäure) und einer organischen Phase (Acetonitril). Acetonitril ist mit Wasser mischbar, beim Ausschütteln von verdünntem Honig mit Acetonitril bilden sich jedoch aufgrund der hohen Zuckerkonzentration im Honig zwei Phasen. Die Tetracycline sollen sich überwiegend in der organischen Phase befinden. Nach dem Ausschütteln wurde ein Aliquot der organischen Phase abgenommen und im Stickstoffstrom zur Trockne eingengt, der Rückstand wurde in Probenpuffer

aufgenommen (siehe Abschnitt 9.4.6, Seite 249) und unter Standardbedingungen untersucht.

Tabelle 6-47: Messdaten nach der Honigextraktion mit Acetonitril, Kalibrierlösungen dotiert nach Lösen der Extraktionsrückstände, Proben dotiert mit 100 µg/kg Tetracyclin und 50 µg/kg Tetracyclin vor der Extraktion. Dargestellte Messwerte sind Mittelwerte aus Fünffach-Injektionen

Kalibrierung		Messwerte [Δ RU] für 100 µg/kg Tetracyclin		
Konzentration Tetracyclin [µg/kg]	Messwert [ΔRU]	Probe 1	Probe 2	Probe 3
0	34			
20	22	11	7	13
40	5			
		Messwerte [Δ RU] für 50 µg/kg Tetracyclin		
60	16			
80	3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
100	4	16	14	29

Sowohl die Proben als auch die Kalibrierlösungen zeigten positive Signale, die keine Abhängigkeit von der Tetracyclinkonzentration erkennen ließen. Die Basislinie stieg in der Messung um 20 RU je Zyklus, obwohl die Regeneration, den Sensorgrammen nach zu urteilen, vollständig war. Die positiven Signale für Proben und Kalibrierlösungen zeigen, dass nach der Extraktion der Honigproben mit Acetonitril verstärkte Matrixinterferenzen auftraten. Dies deutet darauf hin, dass in Acetonitril unpolare Komponenten selektiv angereichert werden, die nach dem Einengen zur Trockne und Aufnahme in Probenpuffer in höheren Konzentrationen vorliegen und unspezifisch an die Chipoberfläche binden. Die Extraktionsrückstände wurden ausgewogen und betragen im Mittel 19,6 mg. Bei einer Einwaage von 1 g Honig gingen 2,4% des Honiggewichtes in die organische Phase über.

In einer HPLC-Messung wurde die Extraktionsausbeute von Tetracyclin aus einer Zuckerlösung untersucht, um abzuschätzen, welches Verteilungsgleichgewicht sich für Tetracyclin zwischen wässriger und organischer Phase einstellt. Die Chromatogramme sind in Abbildung 6-55 gezeigt.

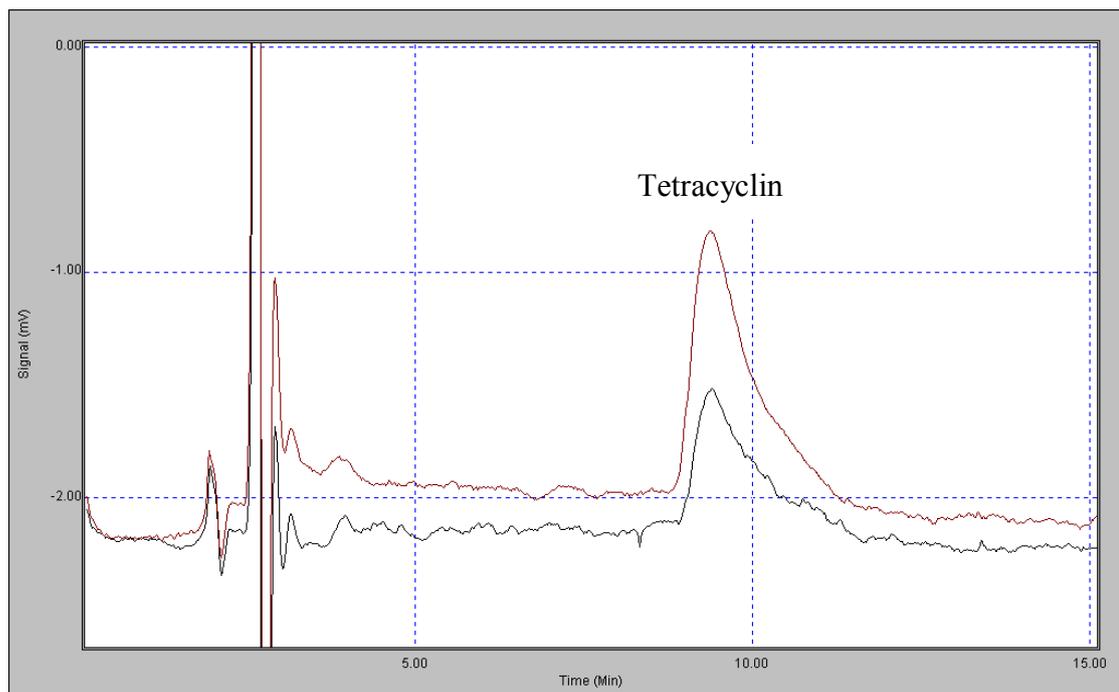


Abbildung 6-55: HPLC-Vergleich von wässriger und organischer Phase nach der Extraktion von Tetracyclin aus Zuckerlösung. Rotes Chromatogramm: wässrige Phase (vor der Messung 1:1 mit Oxalsäure verdünnt). Schwarzes Chromatogramm: organische Phase (unverdünnt). HPLC-Analyse mit online-Anreicherung auf LiChrospher RP18 (4x4) Kartuschen, Injektionsvolumen 2 ml, Elutionsvolumen 1,5 ml, Trennsäule: Merck 50995 LiChrospher 100 RP-18, 5 μ m 250-4 endcapped, Fließmittel: ACN / Oxalsäure 0,01 mol/l (20/80 v/v), Fluss 1 ml/min, UV-Detektion bei 360 nm

Der Anteil Tetracyclin, der nach der Extraktion in der organischen Phase ermittelt wurde lag bei 20% des insgesamt bestimmten Tetracyclins. 80% Tetracyclin lagen in der wässrigen Phase vor. Frühere Messdaten aus dem eigenen Arbeitskreis, die zeigten, dass bei der ersten Extraktion ca. 70% des Tetracyclins in der organischen Phase vorlagen, konnten nicht reproduziert werden.

Die Flüssig/Flüssig-Extraktion mit Acetonitril konnte nicht erfolgreich als Probenvorbereitung eingesetzt werden, da in der organischen Phase angereicherte Substanzen bei der SPR in die Flusszelle gelangen, an der Sensoroberfläche unspezifisch binden und so eine empfindliche und reproduzierbare Analytik verhindern.

6.5.2.2 Festphasenextraktion (SPE)

Verschiedene Autoren beschreiben den erfolgreichen Einsatz der Festphasenextraktion als Probenvorbereitung für die chromatographische Bestimmung von Tetracyclin in den verschiedensten Matrices [130, 140, 156, 224, 225]. Von Huq et al. wurde die Festphasenextraktion an schwachen Kationentauscher-Sorbentien erfolgreich für die Extraktion von Tetracyclin aus Honig eingesetzt [156], während von Pena et al. und Khong et al. die Festphasenextraktion an Reversed-Phase-Copolymeren für die Aufreinigung von Tetracyclin aus Honig beschreiben [135, 140].

6.5.2.3 Festphasenextraktion mit Reversed-Phase-Copolymer

Von Pena et al. wird über die Aufreinigung von Tetracyclin aus Honigproben mit Oasis HLB[®]-Kartuschen berichtet [135]. Entsprechend des dort beschriebenen Verfahrens wurde die Honigeinwaage in McIlvaine-Puffer gelöst und nach dem Konditionieren der Kartuschen mit Wasser und Methanol auf die Kartuschen aufgebracht. Nach einem wässrigen Waschschrift und Trocknung der Kartuschen erfolgte die Elution mit Methanol. Die Eluate wurden zur Trockne eingeeengt und der Elutionsrückstand in Probenpuffer aufgenommen (Details zur Aufarbeitung siehe 9.4.6).

Tabelle 6-48: Messdaten nach der SPE mit Oasis-HLB-Kartuschen, für die Herstellung der Kalibrierlösungen wurden die Extraktionsrückstände von Honigleerproben (Orangenblütenhonig, Honig2) nach der SPE mit Tetracyclin dotiert, Einwaage Honig 3 g, Honigproben dotiert mit Tetracyclin 2,5; 10 und 20 ng/500 µl. Dargestellte Messwerte sind Mittelwerte aus 4 Injektionen (Kalibrierung) und 5 Injektionen (Proben, je Konzentration n=2)

Kalibrierung		Messwert [Δ RU]		
		20 ng/500µl	10 ng/500µl	2,5 ng/500µl
Konzentration Tetracyclin [ng/500µl]	Messwert [Δ RU]			
0,0	-23			
2,5	-20			
5,0	-16	-28	-27	-17
10,0	-9	-22	-4	-17
20,0	-20			
25,0	-24			

Die aufgearbeiteten Proben konnten ohne erkennbare Störungen des Systems gemessen werden, allerdings lösten weder Proben, die vor der Extraktion noch die nach der SPE dotierten Kalibrierlösungen TetR von der Oberfläche ab. Für alle Lösungen wurde während der Injektion ein Anstieg des SPR-Signals beobachtet, der die Bindung von Matrixbestandteilen anzeigt. Über die Auswaage der Extraktionsrückstände ließ sich ermitteln, dass 1% der auf die Kartusche aufgebrachten Honigbestandteile im Eluat vorhanden war. Für die Aufarbeitung von Pufferlösung ohne Tetracyclin als Reagenzienblank mit Oasis HLB-Kartuschen wurde in einer weiteren Messung ein Signal von -158 RU erhalten (Mittelwert aus 3 Injektionen). Die Tabelle 6-48 gezeigten Werte liegen allesamt höher als dieser Reagenzienblindwert, was Matrixinterferenzen in den Honigextrakten zeigt. Alle erhaltenen Messwerte liegen in der Größenordnung des Honigblanks. Eine Unterscheidung der verschiedenen Konzentrationen war aufgrund störender Matrixinterferenzen nicht möglich.

Es wurde geprüft, ob durch eine Modifikation des Waschschruttes bei der Extraktion mehr störende Matrixkomponenten entfernt werden können, dazu wurde die

Elutionskraft der Waschlösung durch Zugabe von Methanol erhöht. Eine Verringerung der Probeneinwaage wurde ebenfalls geprüft.

Tabelle 6-49: Einfluss von Probeneinwaage, Waschschrift bei der SPE, und Tetracyclinkonzentration auf die Messung, als Probe wurde Orangenblütenhonig (Honig2) verwendet, Messwerte sind Mittelwerte aus 5 Injektionen

Probe	Einwaage [g]	Kartusche gewaschen mit 5 ml	Tetracyclin- Konzentration [µg/kg]	Messwert [Δ RU]
A	3	H ₂ O	0	3
B	3	H ₂ O	50	-24
C	3	5% MeOH	50	-22
D	3	10% MeOH	50	-291
E	1	5% MeOH	50	-618

Bei den Proben A, B und C zeigte sich während der Injektion ein Signalanstieg, die Ablösung von TetR durch Tetracyclin wird durch Matrixinterferenzen überlagert. Probe D und E zeigten einen Abfall des Signals, hier überwog demnach die Ablösung von TetR der Bindung von Matrixkomponenten. Durch Probe E wurden etwa 75% des auf der Oberfläche gebundenen TetR abgelöst (Abbildung 6-56).

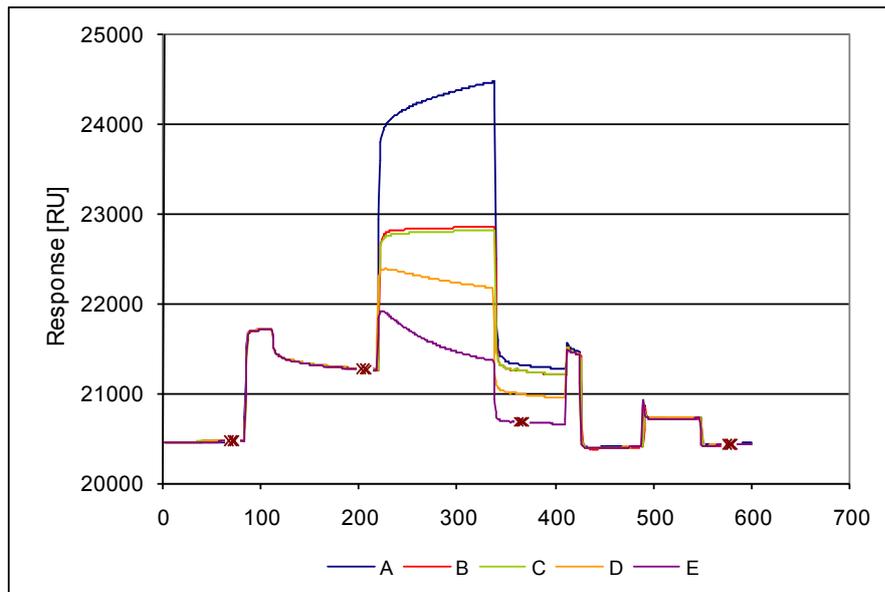


Abbildung 6-56: SPE-Aufreinigung von Honig an Oasis HLB-Kartuschen. Modifikation von Probeneinwaage, und Waschlösung bei der Extraktion. Zur Erklärung der verschiedenen Parameter siehe Tabelle 6-49

Abbildung 6-56 und Tabelle 6-49 zeigen, dass die unspezifische Bindung von Bestandteilen der Honigmatrix abnimmt, wenn der Methanolanteil der Waschlösung auf 10% erhöht wird, aber auch, wenn der Methanolanteil 5% beträgt und weniger Honig eingesetzt wird. **Die unspezifische Bindung von Matrixkomponenten konnte durch eine Modifikation des Waschschrtes bei der Extraktion sowie durch Variation der Probeneinwaage verringert werden.**

Neben der Abtrennung von störenden Probenbestandteilen und der Anreicherung des Analyten muss bei Extraktionsverfahren eine hinreichende Wiederfindung des Analyten sichergestellt werden. Eine Kontrolle der Wiederfindung erfolgte durch den Vergleich von vor und nach der Extraktion dotierten Proben mit 1 g Probeneinwaage und einem Waschschrtschritt mit 5% Methanol.

Tabelle 6-50: Vergleich vor und nach der SPE dotierter Honigproben (Honig 1), dargestellte Messwerte sind Mittelwerte aus 4 Injektionen

Tetracyclin- Konzentration [µg/kg]	dotiert nach Aufnahme des Elutionsrückstandes	dotiert vor SPE
	Messwert [ΔRU]	Messwert [Δ RU]
0	74	44
5	37	10
10	40	-118
20	24	-75
50	-21	-286
100	-63	-520

Bei den nach der SPE dotierten Proben wurde erst ab einer Tetracyclin-Konzentration von 50 ng/g TetR abgelöst. Bei geringeren Tetracyclin-Konzentrationen überwogen Matrixinterferenzen, so dass positive Signale erhalten wurden.

Während der Messung wurde ein Anstieg der Basislinie um etwa 10 RU je Zyklus beobachtet, der in vorangegangenen Messungen auf derselben Flusszelle nicht beobachtet worden war. Die TetR-Bindung im Verlauf der Zyklen zeigte keine Auffälligkeiten, die Sensorgramme zeigten vollständige Regeneration. Bei der Messung von ACN-Extrakten wurde ebenfalls ein Anstieg der Basislinie beobachtet, diese Messung wurde unmittelbar vor der hier gezeigten auf derselben Flusszelle durchgeführt. Allerdings war keine „Schädigung“ der Flusszelle erkennbar, da die zu Beginn der Messreihe der SPE-Extrakte vorgenommene Fünffachinjektion von Probenpuffer keinerlei Auffälligkeiten im Hinblick auf Basislinie oder TetR-Bindung erkennen ließen. Es ist daher unwahrscheinlich, dass der Anstieg der Basislinie auf die Verschleppung von Acetonitril aus der vorangegangenen Messreihe zurückzuführen ist.

Weiterhin war auffällig, dass die TetR-Ablösung durch Probelösung mit zunehmender Zyklenzahl stieg, das heißt, dass dieselbe Probe mehr TetR ablöste, wenn sie zu einem späteren Zeitpunkt der Messreihe injiziert wurde. Dieser Trend wurde nur für die

Probenlösungen und nicht für die davor und danach als Vergleich injizierten Pufferlösungen beobachtet.

Diskussion der Ergebnisse

Besonders auffällig ist, dass bei der Injektion der vor der SPE dotierten Proben jeweils deutlich mehr TetR abgelöst wurde als durch die Injektion der nach dem Lösen der Extraktückstände dotierten Proben. Theoretischen Überlegungen zufolge kann die stärkere TetR-Ablösung bei den vor der SPE dotierten Proben mehrere Ursachen haben: a) in der Probe liegt eine höhere Tetracyclin-Konzentration vor. b) in der Probe sind weniger Bestandteile, die unspezifisch an die Chipoberflächen binden. c) die Probe hat eine höhere Ionenstärke. d) In der Probe liegen Abbauprodukte von Tetracyclin vor, die eine höhere Affinität gegenüber TetR haben. e) die Struktur/Oberfläche des *tetO*-Chips ist verändert f) es werden Bestandteile aus dem Kartuschenmaterial gelöst, die in der SPR-Messung stören.

Die Honige wurden mit identischen Tetracyclin-Konzentrationen dotiert. Während der SPE ist mit Analytverlusten beim Waschen und der Elution zu rechnen, so dass ausgeschlossen ist, dass die stärkere Ablösung von TetR durch eine höhere Tetracyclin-Konzentration hervorgerufen wird. Die Auswaagen der vor der SPE dotierten Extrakte betragen im Mittel 12 mg, die für die nach der SPE dotierten Extrakte im Mittel 11 mg (Probeneinwaage 1g), der Unterschied ist nicht signifikant, so dass dadurch belegt ist, dass sich die Menge der gelösten Matrixbestandteile bei beiden Probenserien nicht unterscheidet. Auch die Ionenstärke kann als Ursache ausgeschlossen werden, da bei beiden Probenreihen dieselben Reagenzien verwendet wurden. Denkbar ist hingegen, dass bei der SPE Abbauprodukte von Tetracyclin entstehen. Bei stark sauren pH-Werten (<2) beispielsweise wird Wasser von Tetracyclin abgespalten und dadurch Anhydrotetracyclin gebildet. Anhydrotetracyclin hat eine höhere Bindungsaffinität zu TetR als Tetracyclin [208]. Von Möller wurde die Kreuzreaktivität von Anhydrotetracyclin gegenüber Tetracyclin im vorliegenden Assay untersucht und gefunden, dass Anhydrotetracyclin etwa 40% mehr TetR von *tetO* ablöst [188]. Gegen die Theorie der Bildung von Anhydrotetracyclin spricht allerdings, dass der pH-Wert des zum Lösen von Honig verwendeten Puffers bei 4 lag und somit eine Epimerisierung

zum epi-Tetracyclin wesentlich wahrscheinlicher ist als die Abspaltung von Wasser zum Anhydrotetracyclin. Die Epimere hingegen haben gegenüber den Tetracyclinen eine deutlich geringere Affinität zu TetR und führen im Assay zu geringerer TetR-Ablösung [188]. Von Khong und Pena wurden dotierte Honige über Oasis HLB-Kartuschen aufgereinigt und per HPLC beziehungsweise LC-MS untersucht. Weder von Khong et al. noch von Pena et al. wird das Vorkommen von Anhydrotetracyclin im Extrakt berichtet [135, 140]. Die Ursache der höheren TetR-Ablösung durch die vor der Extraktion dotierten Proben muss in weiteren Studien untersucht werden.

Unter den hier dargestellten Umständen ist eine Quantifizierung von Tetracyclin in Honig nach der SPE nicht möglich.

6.5.2.4 SPE mit schwachen Kationentauscher-Sorbentien (strata X-CW)

Die verwendeten schwachen Kationentauscher-Sorbentien sind im Gegensatz zum in 6.5.2.3 beschriebenen Copolymer mit einer Carboxylfunktionalität ausgestattet, die mit der basischen Dimethylaminofunktion von Tetracyclin ionisch wechselwirken und darüber hinaus auch Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann. Durch die ionischen Wechselwirkungen ist es möglich, einen Waschschriff mit reinem Methanol durchzuführen, ohne dass dabei Tetracyclin vom Sorbens abgelöst wird [156]. Gegenüber der in 6.5.2.3 beschriebenen Methode soll das Waschen mit Methanol zu reineren Extrakten führen.

Für die Extraktion wurden 1 g Honig in 2 ml Acetatpuffer pH 5 gelöst und auf die SPE-Kartusche gegeben, die zuvor mit Methanol und Reinstwasser konditioniert wurde. Nach der Probenaufgabe wurde die Kartusche mit Reinstwasser und Methanol gewaschen. Die Elution von Tetracyclin wurde durch 2% Ameisensäure in Methanol bewirkt. Unter diesen Bedingungen sind sowohl die Carboxylgruppen des Sorbens als auch die enolischen Reste am Tetracyclin protoniert, so dass keine ionischen Wechselwirkungen mit dem Austauscher stattfinden können.

Tabelle 6-51: Kalibrierkurve und dotierte Honigproben(Honig 2), gereinigt über Strata-X-CW-SPE-Kartusche, Einwaage Honig 1 g, Honigproben dotiert mit Tetracyclin 25 ng/g. Dargestellte Messwerte sind Mittelwerte aus vier Injektionen

Kalibrierung		Messwert [Δ RU] für 25 μ g/kg Tetracyclin		
Konzentration Tetracyclin [μ g/kg]	Messwert [Δ RU]			
0,0	-170	Probe 1	Probe 2	Probe 3
2,5	-181			
5,0	-166	-160	-95	-80
10,0	-150			
20,0	-187			
50,0	-222			

Zwischen den Signalen für die einzelnen Probeninjektionen zeigte sich kein Trend, die Streuung der Einzelwerte war relativ gering (<10 RU). Die Injektionen wurden jeweils in der Reihenfolge Probe 1, 2, 3 in 4 Blöcken durchgeführt, so dass die scheinbare Abnahme des Signals von Probe 1 zu Probe 3 hin nicht auf die Reihenfolge der Injektion zurückzuführen sein kann.

Bei der Kalibrierung konnte keine deutliche Konzentrationsabhängigkeit des Signals für die verschiedenen Konzentrationen beobachtet werden, es ließ sich kein Arbeitsbereich ermitteln. **Mit der Aufarbeitung der Honigproben geht also ein Verlust an Empfindlichkeit des Assays einher.** Die Vierfachinjektion zeigte eine schlechte Präzision. Die Proben konnten nicht ausgewertet werden, da die erhaltenen Signale außerhalb der Kalibrierkurven lagen. Die Auswaagen der Honigextrakte zeigten, dass durch die SPE eine Abreicherung von Honigbestandteilen erfolgte. Die im Extrakt verbleibenden Bestandteile führten allerdings in einer weiteren Messung in Abhängigkeit der spezifischen Zusammensetzung der untersuchten Honige zu erheblichen Störungen bei der SPR-Messung.

Die geringere TetR-Ablösung durch die vor der Extraktion dotierten Proben kann darauf zurückzuführen sein, dass während der SPE Verluste an Tetracyclin auftreten, beispielsweise durch unvollständige Elution. Auch der pH-Wert bei der Elution und beim Einengen der Probe kann sich negativ auswirken: da die Proben mit Ameisensäure in Methanol eluiert werden, liegt ein pH-Wert vor, der die Epimerisierung von Tetracyclin begünstigen kann. Insbesondere kann dies auch beim Einengen zur Trockne geschehen, Methanol wird verdampft, dadurch wird Ameisensäure in der Lösung konzentriert und der pH-Wert sinkt. Bei der Verdampfungstemperatur (40 °C) fördert der niedrige pH-Wert wahrscheinlich die Epimerisierung oder den Zerfall von Tetracyclin und bedingt somit eine Abreicherung von Tetracyclin in der Probelösung bedingt. Ähnliche Beobachtungen wurden von Oka et al. und Mulders et al. beim Einengen methanolischer Oxalsäurelösungen zur Trockne beschrieben, beide beobachteten dabei einen deutlichen Verlust an Tetracyclin [226, 227].

Bei der Aufreinigung der Honigproben über Strata-X-CW-Kartuschen muss aufgrund der ionischen Wechselwirkungen am Kationentauscher-Sorbens eine Elution mit Methanol/Ameisensäure erfolgen, um alle Gruppen zu protonieren und so die ionischen Wechselwirkungen zu unterbinden. Während der Messungen wurde deutlich, dass eine Verschleppung von Ameisensäure *tetO* an der Chipoberfläche beeinträchtigt, so dass weniger TetR gebunden werden konnte und sich auch die Signalform der TetR-Bindung nach der Injektion von ameisensäurehaltigen Lösungen deutlich veränderte (Abbildung 6-57).

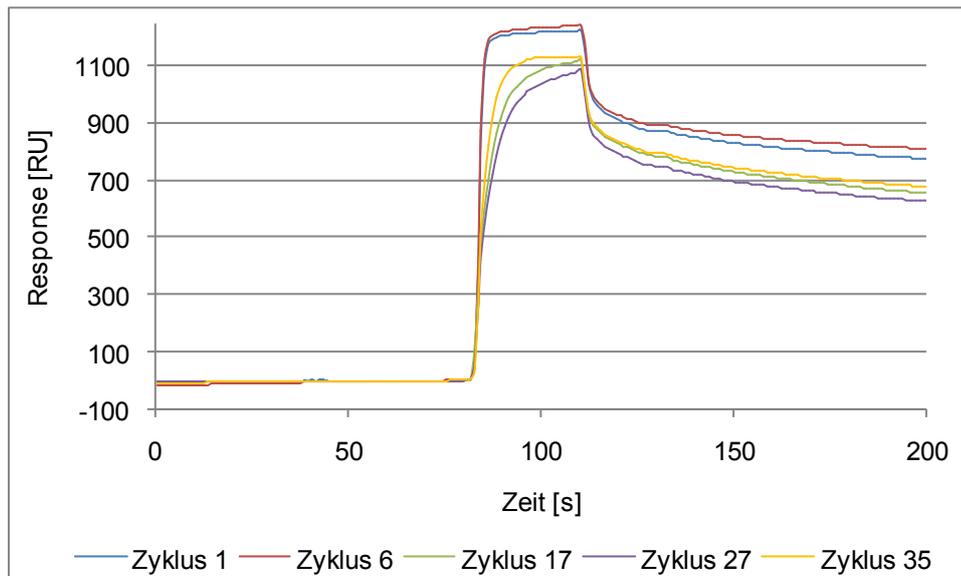


Abbildung 6-57: Veränderung des Profils der TetR-Bindung im Verlauf der Messung von Honigextrakten aus Strata-X-CW-Kartuschen

Die Änderung der Signalform zeigt, dass die Kinetik der TetR-Bindung nach der Injektion von ameisensäurehaltigen Proben verändert ist. Auch bei Messungen, bei denen durch pH-Kontrolle der gelösten Extraktreste sichergestellt ist, dass Ameisensäure neutralisiert wurde, ist zu beobachten, dass die TetR-Bindung stetig abnimmt. Dies zeigt eine permanente leichte Schädigung der Chipoberfläche, die sich negativ auf die Lebensdauer des Sensorchips auswirkt (Abbildung 6-57).

Für eine Probenaufarbeitung ist die SPE an schwachen Kationentauscher-Sorbentien nicht geeignet, da die Extrakte verschiedener Honige zu unterschiedlichen Matrixinterferenzen führen, die je nach spezifischer Zusammensetzung des Honigs unterschiedlich stark ausgeprägt sind. Daher ist davon auszugehen, dass auch durch die Festphasenextraktion an strata-X-CW-Kartuschen keine Verbesserung der Entscheidungsgrenze erreicht werden kann. Darüber hinaus wird durch die Extrakte die Chipoberfläche geschädigt.

6.5.3 Fazit der Versuche zur Verbesserung der Entscheidungsgrenze für Tetracycline in Honig

Zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit für Tetracycline in Honig wurden zuerst die Arbeitsparameter optimiert. Die beste Empfindlichkeit wurde bei einer Verdünnung des Honigs 1:10 mit Probenpuffer erhalten. Stärkere Verdünnungen zeigten eine schlechtere Empfindlichkeit. Allerdings zeigte sich, dass bei einer Verdünnung 1:20 mit Probenpuffer eine bessere Quantifizierung von Tetracyclin in Honig erreicht wurde, so dass im Folgenden standardmäßig alle Proben im Verhältnis 1:20 mit Probenpuffer verdünnt wurden. Eine Erhöhung des Injektionsvolumens der Probe führte zu einer deutlich verbesserten Empfindlichkeit, als Standard wurde daraufhin ein Injektionsvolumen von 30 μl bei 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ gewählt. Die Gesamt-Analysendauer konnte durch Kürzung der TetR-Injektion kurz gehalten werden. Die Flussrate bei der Probeninjektion beeinflusste die Messungen- bei höherer Flussrate wurde mehr TetR von *tetO* abgelöst. Der Einfluss der Flussrate ist jedoch gegenüber dem des Injektionsvolumens zu vernachlässigen. In der Summe führte die Optimierung der Arbeitsparameter nicht zu einer geringeren Entscheidungsgrenze, da sich die unspezifische Bindung störender Matrixkomponenten einzelner Honige hier deutlich stärker auswirkte.

Die Resultate der Versuche zur selektiven Entfernung einzelner Honigbestandteile unterstreichen den Einfluss der Zusammensetzung von Honigproben. Es wurde gezeigt, dass Zucker in gewissem Maße unspezifisch an die Chipoberfläche binden. Ein chemischer oder mikrobiologischer Abbau der Zucker führte nicht zum Erfolg. Ultrafiltration lieferte im Fall von Heidehonig eine Verringerung der unspezifischen Bindung von Matrixbestandteilen, wirkte sich jedoch bei anderen Honigen negativ aus. Aus den Ergebnissen der Ultrafiltration lässt sich folgern, dass die hohen unspezifischen Bindungen, die bei Heidehonig beobachtet werden, auf hochmolekulare Proteine zurückzuführen sind, die in anderen Honigen nicht enthalten sind. Ein Abbau störender Proteine durch Protease erwies sich aufgrund der Uneinheitlichkeit der Ergebnisse bei

verschiedenen Honigen sowie der Schädigung der Chipbooberfläche als ungeeignet für die Probenaufarbeitung.

Bei der Flüssig/Flüssig-Extraktion des Honigs mit Acetonitril zeigte sich eine schlechte Extraktionsausbeute von Tetracyclin im Acetonitril sowie Interferenzen mit dem SPR-System. Auch die Probenaufarbeitung mit verschiedenen SPE-Kartuschen führte nicht zum gewünschten Erfolg. Eine Abreicherung von störenden Matrixbestandteilen unabhängig von der spezifischen Honigzusammensetzung wurde durch keines der getesteten Verfahren zur Probenvorbereitung erreicht.

Diskussion des Matrixeinflusses von Honig

Die chemische Zusammensetzung von Honig unterliegt je nach geographischer Herkunft, Tracht, Bienenart und klimatischen Bedingungen starken Schwankungen. Die Hauptbestandteile von Honig stellen Monosaccharide dar, daneben sind nennenswerte Mengen Disaccharide und Wasser enthalten. Stickstoffverbindungen wie Enzyme, Aminosäuren oder Proteine sowie Mineralstoffe stellen im Honig Minorbestandteile dar, daneben sind auch Lipide in geringen Mengen im Honig enthalten [222, 228].

Pena et al. [135] und Oka et al. [153] berichten, dass in HPLC-Messungen, denen ein Clean-up mittels Oasis HLB-Kartuschen und Baker10C₁₈ Kartuschen vorangegangen war, viele Störsignale detektiert wurden, die auf die Honigmatrix zurückzuführen waren. Um eine ausreichende Abtrennung störender Matrixbestandteile zu gewährleisten, wurde sowohl von Pena et al. als auch von Oka et al. ein zusätzlicher SPE-Schritt an Kationentauscher-Sorbentien durchgeführt, durch den die Reinheit der Extrakte deutlich verbessert werden konnte. [135, 153]. Dieses Vorgehen erschien für einen Screening-Test, dessen Vorzüge in einer leichten Durchführbarkeit, geringen Probenaufarbeitung und hohem Durchsatz liegen sollen zu aufwändig und wurde daher nicht eingesetzt. Von Khong et al. [140] wurden verschiedene Honige mittels LC-MS/MS untersucht und die Matrixeffekte verschiedener Honige beschrieben; dabei konnte gezeigt werden, dass für manche Honige erhebliche Matrixinterferenzen beobachtet wurden (33% Ionensuppression), während andere Honige sich unproblematisch verhielten (5% Ionensuppression). Lopez et al. [145] beschreiben ebenfalls die Matrixeffekte verschiedener Blütenhonige in LC-MS/MS-Messungen und

kommen zu dem Schluss, dass die Quantifizierung von Proben stark von der Honigart abhängt, mit der die Matrixkalibrierung durchgeführt wird. Aufgrund des stark ausgeprägten Einflusses des geographischen und botanischen Ursprungs ist es nicht möglich, einen Referenzhonig für Matrixkalibrierungen heranzuziehen. Lopez et al schlagen daher vor, als Auswahlkriterium für einen geeigneten Honig die Honigfarbe heranzuziehen [145]. Verzegnassi et al. versuchten, die Ionensuppression durch Matrixbestandteile aus Honig bei der Bestimmung von Sulfonamidrückständen in Honig mit der chemischen Zusammensetzung der Honige zu korrelieren, konnte jedoch keine Korrelation zu Zuckerprofil oder HMF-Gehalt der Honige aufstellen [229].

Chromatographische Bestimmungen haben gegenüber der SPR-Messung den Vorteil, dass ein chromatographischer Trennschritt der Detektion vorangeht. Flüssig/Flüssig- und Festphasenextraktion können oft erfolgreich als Probenvorbereitung für eine folgende chromatographische Tetracyclinbestimmung eingesetzt werden. Bei der SPR-Messung erfolgt nach der Extraktion hingegen keine weitere Abtrennung von Probenbestandteilen, so dass nach der Extraktion noch vorhandene Probenbestandteile zu Matrixinterferenzen führen können.

Die Imitation eines biologischen Systems setzt der Probenaufarbeitung weitere Grenzen. Hinsichtlich der Probenaufarbeitung sind diesbezüglich insbesondere der pH-Wert, die Ionenstärke sowie die Verwendung organischer Lösungsmittel zu beachten: niedrige pH-Werte (<4) schädigen die Chipoberfläche, was sich in einer geringeren Bindungsfähigkeit für Repressor und einem Abfall der Basislinie bemerkbar macht. Eine pH-Kontrolle und gegebenenfalls Korrektur auf pH 7,4 ist daher unerlässlich. Hohe Ionenstärken führen wie in Kapitel 6.3.8 beschrieben zu einer unspezifischen Ablösung von TetR und sollten daher ebenfalls vermieden werden. Organische Lösungsmittel, die bei der Extraktion oder Elution verwendet werden, zeigen mitunter eine schlechte Mischbarkeit mit Puffern oder Interferenzen bei der Messung (Acetonitril, Hexan), daher wurden in organischen Lösungsmitteln erhaltene Extrakte zur Trockne eingengt und in Probenpuffer wieder aufgenommen. Durch diesen Schritt können Analytverluste auftreten.

Die Aufreinigung von Tetracyclinen aus einer komplex zusammengesetzten Matrix wie Honig, stellt aufgrund der Analyteigenschaften in Kombination mit dem biologischen Testsystem eine Herausforderung dar, die weitergehender Studien bedarf. Weitere Möglichkeiten zur Aufreinigung sind in Kapitel 8 beschrieben.

6.6 Vergleich der beiden Assayformate

Es wurden zwei verschiedene Assayformate untersucht, die dem Nachweis von Tetracyclinrückständen dienen sollten. Bei beiden Formaten wird Tetracyclin indirekt nachgewiesen. Im nicht-kompetitiven Screeningtest mit *tetO* und TetR erfolgt der Nachweis durch die Ablösung des Repressorproteins TetR von einem fixierten DNA-Fragment, im kompetitiven Assayformat wird TetR vor der Injektion mit der Probe inkubiert und die Anwesenheit von Tetracyclin durch eine geringere TetR-Bindung an ein fixiertes Doxycyclinderivat bestimmt. In beiden Fällen wird TetR als Bindungspartner für Tetracyclin aus der Probe eingesetzt und verbraucht. Das Format mit *tetO* und TetR erfordert zusätzlich als Bindungspartner für TetR das *tetO*-Fragment, wohingegen im kompetitiven Assay Doxycyclinderivate notwendig sind. Im nicht-kompetitiven Assayformat mit *tetO* müssen daher zwei Komplexe berücksichtigt werden: zum einen die Bindung des Tet-Repressors an *tetO*, zum anderen die Bindung von Tetracyclin an TetR. Es wurde erwartet, dass das Format mit Doxycyclinderivaten weniger anfällig ist, beispielsweise hinsichtlich hoher Ionenstärken. Auch war zu erwarten, dass sich das kompetitive Format bei der Untersuchung verschiedener Matrices durch geringere Matrixinterferenzen auszeichnet, da hier keine DNA Matrixbestandteile wie beispielsweise Proteine unspezifisch binden könnte.

In der praktischen Anwendung des kompetitiven Assay-Formates ergaben sich keine Vorteile. Es wurden keine Regenerationsbedingungen gefunden, die eine stabile Oberfläche gewährleisten konnten. Vielmehr konnte aufgrund der Instabilität des Systems, die mit einer hohen Unpräzision und schlechten Reproduzierbarkeit von Ergebnissen einherging, keine empfindliche Analytik mit diesem Assayformat betrieben werden. Zum Nachweis von Tetracyclinrückständen in Lebensmitteln ist das kompetitive Assayformat nach derzeitigem Kenntnisstand aufgrund der kurzlebigen „Aktivität“ der Doxycyclinderivate nicht geeignet.

Bei dem Format mit *tetO* ließ sich die Oberfläche sehr gut regenerieren und vor jedem Messzyklus frisch mit Repressor beladen. Dieser nicht-kompetitive Screeningtest zeichnete sich durch eine hohe Robustheit und gute Empfindlichkeit aus und ist durchaus für den Nachweis von Tetracyclinrückständen in Lebensmitteln einsetzbar.

6.7 Expression und Isolierung des Repressor-Proteins TetR(BD)

Die Expression und Isolierung des Tet-Repressors wurde an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführt. Die Expression erfolgte durch gentechnisch modifizierten *E.coli* Bakterien, die Reinigung des Proteins wurde mittels Kationenaustausch und Gelfiltration erreicht. Die Reinheit des Proteins wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Es wurden etwa 4 ml Proteinlösung erhalten (Für eine detaillierte Beschreibung der Vorgehensweise bei der Expression und Aufreinigung siehe Kapitel 9.1, Seite 224 ff).

Die Konzentration des Proteins wurde photometrisch bei 280 nm bestimmt, bei dieser Wellenlänge absorbieren die im Protein vorhandenen aromatischen Aminosäuren. Die Aktivität des Repressors – also die Bindefähigkeit für Tetracyclin wurde mittels Fluoreszenzmessung ermittelt. Dabei nutzt man aus, dass Tetracycline stärker fluoreszieren, wenn sie an den Tet-Repressor gebunden sind [86]. Die Ergebnisse von Konzentrations- und Aktivitätsbestimmung sind in Tabelle 6-52 gezeigt. Siehe dazu auch 9.1.4 und 9.1.5.

Tabelle 6-52: Konzentration und errechnete Aktivität des isolierten Repressor-Proteins TetR(BD).
* Die Konzentrationsangabe in $\mu\text{Mol/l}$ bezieht sich auf das Monomer.

Repressor	Konzentration [mg/ml]	Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]*	errechnete Aktivität [%]
BD	18,2	781	100

7 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die Möglichkeit untersucht, ein kompetitives Assayformat auf Grundlage der Oberflächenplasmonresonanz zum Nachweis von Tetracyclinen zu entwickeln. Mit TetR, einem in einigen tetracyclinresistenten Bakterien vorkommenden Rezeptorprotein, stand ein sehr spezifischer Bindungspartner für Tetracycline zur Verfügung. Doxycyclinderivate wurden als Bindungspartner für TetR und als Kompetitor zu in der Probe vorhandenen Tetracyclinen eingesetzt. Doxycyclinderivate mit verschiedenen langen Spacern wurden an Sensorchipoberflächen mit Carboxy-funktionalitäten immobilisiert. Es konnte gezeigt werden, dass TetR an die immobilisierten Derivate gebunden wurde und dass das Signal für die TetR-Bindung von der Anwesenheit und Konzentration von Tetracyclin in der Probelösung abhängig war. Dadurch wurde gezeigt, dass ein kompetitives Assayformat mit Doxycyclinderivaten und TetR als Rezeptor durchführbar ist.

Der Einfluss verschiedener Parameter auf das Assayformat wurde studiert. Dabei wurde deutlich, dass ein komplexes System mit vielen wechselseitigen Abhängigkeiten vorlag. Verschiedene Sensorchips wurden untersucht und deren Eigenschaften insbesondere hinsichtlich der Immobilisierungsdichte der Derivate und Verfügbarkeit der Derivate an der Oberfläche für die Bindung von TetR beschrieben. Die Immobilisierung der Derivate war von verschiedenen Faktoren abhängig: neben dem pH-Wert der Derivatlösung wirkten sich auch deren Konzentration sowie die Länge des Spacers aus. Den größten Einfluss zeigte jedoch die Dicke der Oberflächenschicht des Sensorchips. Mit steigender Schichtdicke (Oberflächenkapazität) wurde mehr Derivat immobilisiert.

Die Spezifität und Stabilität der TetR-Bindung an die immobilisierten Derivate auf den verschiedenen Sensorchips unterschieden sich deutlich und ließen erkennen, dass von den getesteten Oberflächenmaterialien Carboxymethyldextran die besten Eigenschaften aufwies. Die Länge des Spacers zeigte einen deutlichen Einfluss auf die immobilisierte Derivatmenge und die folgende Bindung von TetR. Längere Spacer führten zu einer höheren Immobilisierungsdichte von Derivat; gleichzeitig führte ein längerer Spacer

allerdings zu einer schlechteren Erkennung des Derivates durch TetR. Durch Messungen der Derivate als Probenlösungen im Screening-Test mit *tetO* wurde gezeigt, dass – verglichen mit Doxycyclin - die Bindungsaktivität durch die Derivatisierung auf 50% für die Derivate mit einer Spacerlänge von 5 und 8 C-Atomen sank, und auf 25% für das Derivat mit einer Spacerlänge von 11 C-Atomen. Für eine 100 nm dicke Carboxymethyl-dextran-Oberfläche (CM5-Chip) konnte durch den Vergleich von Immobilisierungslevel und TetR-Bindung darauf geschlossen werden, dass die immobilisierten Derivate sich analog den frei in Lösung vorliegenden verhalten. Dem gegenüber schien bei planaren Chipoberflächen ein längerer Spacer vorteilhaft zu sein, da hier das Derivat mit dem längsten Spacer gegenüber den anderen Derivaten keine schlechtere Rezeptorbindung zeigte. Der Einfluss von Art und Länge des zur Derivatisierung verwendeten Spacers sollte daher bei der Optimierung eines Assay-formates Berücksichtigung finden. Als bester pH-Wert für die Immobilisierung der Derivate an CM5-Oberflächen wurde pH 7,4 ermittelt.

Die Spezifität und Stabilität der TetR-Bindung an immobilisierte Doxycyclinderivate wurde auf den verschiedenen Chipoberflächen geprüft. Auf einer dünnen Oberfläche aus carboxymethyliertem Tetraethylenglycol konnte im Gegensatz zu allen anderen Oberflächen keine spezifische TetR-Bindung detektiert werden. Auf allen anderen Oberflächen konnte eine Abhängigkeit des Signals von der TetR-Konzentration festgestellt werden; je höher die TetR-Konzentration, desto mehr TetR wurde gebunden. Auch eine Erhöhung der Injektionsdauer führte zu einer erhöhten TetR-Bindung.

Die Detektion von Tetracyclinen war abhängig von der eingesetzten TetR-Konzentration und auch von der vorliegenden Tetracyclinkonzentration. Eine Abhängigkeit von der Dauer der vorherigen Inkubation der Tetracyclinlösungen mit TetR konnte nicht festgestellt werden. Es handelt sich bei der Bindung von Tetracyclin an TetR um eine sehr schnelle Reaktion. Eine nachgeschaltete Konkurrenzreaktion, bei der die Oberfläche zunächst mit TetR beladen und durch nachträglich injiziertes Tetracyclin von der Oberfläche gelöst wird, war möglich. Diese erfolgte jedoch nur sehr langsam und eignete sich aufgrund der daraus resultierenden langen Analysendauer nicht als Messprinzip.

Für die Regeneration der Oberfläche wurden verschiedene Regenerationsreagenzien für die unterschiedlichen Chipoberflächen betrachtet. Durch chelatisierende Regenerationslösungen allein konnte keine Regeneration erreicht werden, nur in der Kombination mit einer hohen Ionenstärke. Regeneration mit dieser Kombination wirkte sich allerdings auf die TetR-Bindung in den nachfolgenden Zyklen aus und beeinträchtigte die Reproduzierbarkeit von Messungen. SDS erwies sich als effektives Regenerationsreagenz, hatte jedoch den Nachteil, dass es sich in die Carboxymethyldextranschicht des CM5-Chips einlagerte und der Chip vor einem neuen Zyklus einige Zeit mit Laufpuffer gespült werden musste.

Da die Carboxymethyldextran-Oberfläche des CM5-Chips den geringsten Anteil unspezifischer Bindung von TetR und eine gute Immobilisierung der Derivate lieferte, wurde das Assayformat auf diesem Oberflächentyp weiter optimiert.

Als geeignete Derivatkonzentration für die Immobilisierung wurde 0,5 mg/ml ermittelt. Höhere Konzentrationen führten zwar zu einem höheren Immobilisierungslevel, nicht aber zu einer höheren TetR-Bindung. Der Einfluss der TetR-Konzentration auf die Empfindlichkeit des Assays wurde ermittelt. Wie bei einem indirekten kompetitiven Assay zu erwarten, stieg die Empfindlichkeit bei geringeren Rezeptorkonzentrationen.

Die Anwendung des kompetitiven Assays für die Analytik von Tetracyclinen war limitiert: Im Gegensatz zum nicht-kompetitiven Assay mit *tetO* wurde im Assay mit Doxycyclinderivaten eine Instabilität des Systems mit einem Trend zu geringeren TetR-Bindungen bei späteren Messungen beobachtet. Diese Instabilität trat auf allen Chipoberflächen auf. Gründe für die Instabilität sind wahrscheinlich bei den immobilisierten Doxycyclinderivaten zu suchen, da TetR eine sehr hohe Lagerstabilität zeigte. Für einen erfolgreichen Einsatz des kompetitiven Assayformates müsste ein Weg gefunden werden, die Derivate auf der Oberfläche zu stabilisieren, so dass reproduzierbare Messwerte für die TetR-Bindung erhalten werden. Die Empfindlichkeit des kompetitiven Assayformates war geringer als die des Screening-Tests nach Möller. Der nicht-kompetitive Screening-Test mit *tetO* ist trotz des komplizierteren Aufbaus robuster und empfindlicher.

Parallel zu den Arbeiten mit dem kompetitiven Assayformat wurde die Robustheit des von Möller entwickelten Screening-Tests zum Nachweis von Tetracyclinrückständen

untersucht. Es sollte geprüft werden, ob die wesentlichen Anforderungen der Entscheidung 2002/657/EG zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG erfüllt werden. Ein Einsatz des Screening-Tests in Europa setzte zudem die Verbesserung der Nachweisgrenze für Tetracycline in Honig voraus.

Der von Möller beschriebene Screening-Test basiert auf der durch Tetracyclin induzierten Ablösung des Repressorproteins (TetR) von einer DNA-Operator-Sequenz (*tetO*). Die SPR wurde für die Detektion der Massenänderung, die sich durch die Ablösung des TetR ergibt, eingesetzt. Möller hatte bereits gezeigt, dass der Screening-Test für Rohmilchproben und Honig einsetzbar war.

Zunächst wurden geeignete Lagerbedingungen für die verwendeten Sensorchips ermittelt, da es in den Arbeiten von Möller nicht gelang, diese ohne Stabilitätsverlust zu lagern. Eine trockene, kühle Lagerung (4 °C) nach der Aufbringung von Repressorprotein auf die Chipoberfläche brachte die gewünschte Lagerstabilität. In systematischen Lagerstudien (Lagerung bei 4 - 37 °C über verschiedene Zeiträume) wurden die verwendeten Reagenzien getestet. TetR zeigte eine sehr gute Lagerstabilität unter allen getesteten Bedingungen. Auch die mit *tetO* belegten Sensorchips waren sehr stabil. Die Lagerbedingungen von Tetracyclinlösungen wurden optimiert, um eine möglichst lange Haltbarkeit zu erreichen, die besten Resultate wurden bei Lagerung der Stammlösung in Methanol bei 4 °C erzielt.

Da mit TetR und *tetO* biologische Reagenzien verwendet wurden, deren Herstellung in aller Regel Schwankungen unterworfen ist, wurden verschiedene Chargen der Reagenzien verglichen. TetR-Chargen, die im Abstand von etwa 2 Jahren von verschiedenen Personen gewonnen wurden zeigten lediglich einen Unterschied in Ausbeute, Konzentration und Volumen; die Aktivität – bezogen auf die Verstärkung der Fluoreszenz durch die Bindung von Anhydrotetracyclin - betrug bei beiden Chargen 100%. Die verdünnten TetR-Lösungen der beiden Chargen zeigte hinsichtlich der Bindung an *tetO* und der Ablösung durch Tetracyclin eine exzellente Übereinstimmung. Die zur Herstellung verschiedener *tetO*-Chargen benötigten Oligonucleotide wurden durch eine Auftragssynthese erhalten. Bei der Immobilisierung auf mehreren Chipchargen ließ sich kein signifikanter Unterschied der *tetO*-Chargen erkennen. Deutlich wurde allerdings, dass sich häufige Gefrier- und Tauzyklen negativ auf die Stabilität der

verdünnten *tetO*-Lösung auswirkten, ebenso wie längeres Stehen bei Raumtemperatur. Unterschiede in den *tetO*-oder Sensorchipchargen zeigten sich im Immobilisierungslevel und können durch unterschiedliche Injektionsvolumina *tetO* auf einen Standard-Immobilisierungslevel gebracht werden, bei dem die Chargenunterschiede keine Rolle mehr spielen.

Die Ionenstärke der Messlösung konnte in dieser Arbeit als kritischer Parameter für den Screening-Test identifiziert werden. Hohe Ionenstärken führten zur unspezifischen Ablösung des TetR von *tetO* und können daher bei der Anwendung des Screenings zu falsch-positiven Resultaten führen. Es wurde gezeigt, dass sich nicht nur die Konzentration sondern auch die Art der vorliegenden Ionen auswirkte. Bei einer hohen Ionenstärke an Magnesiumionen war die Erkennung von Tetracyclin durch TetR beeinträchtigt. Es wurde darüber hinaus festgestellt, dass die Injektion von Proben mit niedrigem pH-Wert die Chipoberfläche irreversibel schädigte, und dass durch Injektion proteasehaltiger Lösungen die Lebensdauer der Sensorchips deutlich verkürzt wurde.

Der Screening-Test ist als recht robust einzustufen, da die Reagenzien eine hohe Stabilität zeigten. Auch die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen mit verschiedenen Reagenzienchargen war sehr gut. Durch Messungen mit einer für Honig optimierten Methode in einem Labor in Japan konnten die in Wuppertal erhaltenen Ergebnisse und die Rückschlüsse, die daraus hinsichtlich der Praxistauglichkeit des Systems abgeleitet wurden, gestützt werden.

Zum Herabsetzen der Nachweisgrenze für Tetracycline in Honig erfolgte zunächst eine Optimierung der Arbeitsparameter. Über die Probenverdünnung sowie Kontaktzeit und Injektionsvolumen der Probe konnte die Empfindlichkeit des Assays beeinflusst werden. Diese Parameter wurden in einzelnen Messungen optimiert. In der Summe führte dies jedoch nicht zu einer Verbesserung der Entscheidungsgrenze für den Nachweis von Tetracyclin in Honig. Dies ist auf Matrixinterferenzen zurückzuführen, die bei den untersuchten Honigen verschieden stark ausgeprägt waren. Insbesondere dunkle Honige (beispielsweise Heidehonig und Waldhonig) wurden als problematisch eingestuft, aber auch Sonnenblumenhonig zeigte große Matrixinterferenzen. Durch die

Optimierung der Parameter wurden unspezifische Wechselwirkungen mit der Sensorchipoberfläche nicht unterbunden. In den folgenden Untersuchungen wurden einzelne Honigbestandteile selektiv entfernt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die hohen Matrixinterferenzen bei Heidehonig höchstwahrscheinlich auf das Vorkommen hochmolekularer Proteine zurückzuführen waren. Keines der eingesetzten Verfahren war jedoch in der Lage, die Matrixinterferenzen für alle problematischen Honige in gleichem Maße zu unterdrücken, oftmals zeigte sich hier ein differenziertes Bild: während die Methode bei einigen Honigen zur Verringerung der Matrixinterferenzen führte, wurden diese dafür bei anderen Honigen erhöht. Der Einsatz von Flüssig-Flüssig- und Festphasenextraktion zur Probenaufarbeitung war nicht erfolgreich.

Mit keinem der untersuchten Verfahren konnte eine Abreicherung störender Matrixbestandteile unabhängig von der spezifischen Zusammensetzung des Honigs erreicht werden. Der Probenaufarbeitung waren dadurch Grenzen gesetzt, dass der Mechanismus ein biologisches System imitiert, das nur unter physiologischen Bedingungen zuverlässig abläuft.

8 AUSBLICK

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Screening-Test für den Nachweis von Tetracyclinen eine sehr gute Robustheit zeigt. Die Vorteile dieses Assays gegenüber anderen Verfahren liegen im hohen Probendurchsatz sowie in einer leichten Automatisierbarkeit.

Die Entscheidungsgrenze für Tetracycline in Honig lag für den Screening-Test bei 14 µg/kg. Sie liegt damit deutlich unter der in Japan zulässigen Höchstmenge von 300 µg/kg für die Summe von Tetracyclinen [230]; so dass ein Einsatz des Tests in Japan ohne Veränderung möglich wäre. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Untersuchung von Honigproben mit sogenannten „gewachsenen“ Rückständen; also Rückständen, die durch die Medikation von Bienenvölkern in den Honig eingetragen werden.

Soll der Test auch auf dem europäischen Markt Einsatz in der Untersuchung von Honig finden, so muss die Sensitivität des Assays erhöht werden. Tetracycline sind für die Behandlung von Honigbienen in Europa nicht zugelassen, somit müssen deutlich geringere Konzentrationen von ≤ 5 µg/kg detektierbar sein. Die Steigerung der Empfindlichkeit kann nur durch die Minimierung der Matrixeinflüsse beziehungsweise durch eine Vereinheitlichung der Probenmatrix unabhängig von der spezifischen Zusammensetzung des untersuchten Honigs erfolgen. Diesbezüglich könnten verschiedene Verfahren eingesetzt werden. Eine selektive Anreicherung von Analyten kann gegebenenfalls durch die Verwendung so genannter „Molecular Imprinted Polymers“ (MIP) erfolgen. Hierbei werden durch Copolymerisierung von funktionalen und quervernetzenden Monomeren in Anwesenheit des Analyten Polymere geschaffen, die nach dem Auswaschen der Template Analytmoleküle aus der Probe selektiv aufnehmen. Applikationen dieser Technologie für die Anreicherung von Tetracyclinen in Fisch sind von Xiong et al. beschrieben [125]. Shi et al. setzten Molecular Imprinted Polymers für die Anreicherung von Chloramphenicol aus Fisch und Milch ein.[231]

Ein weiterer Ansatz zur Entfernung störender Matrixbestandteile ist der Einsatz von „Restricted Access Materials“ (RAM). Dies sind poröse Materialien, deren

Porenoberfläche mit verschiedenen Funktionalitäten modifiziert werden kann. Kleine Moleküle wie Tetracycline können in die Poren eindringen, wohingegen größere Moleküle wie Proteine ausgeschlossen werden. Im Eluat sind somit nur kleine Moleküle vorhanden, die wahrscheinlich während einer SPR-Messung weniger stark interferieren als Proteine. Von Chico et al. wurden restricted-access Materialien erfolgreich für die Probenaufarbeitung zur Bestimmung von Tetracyclinen in Milch und Wasser eingesetzt [232].

Für eine kommerzielle Verwendung des Screening-Tests ist auch die Anwendung auf weitere Matrices von großem Interesse. In der europäischen Union sind für einige Lebensmittel Höchstmengen festgelegt; beispielsweise liegt die zulässige Höchstmenge für Niere (Rind, Schwein, Geflügel) bei 600 µg/kg, für Leber bei 300 µg/kg und für Eier bei 200 µg/kg für die Summe aus Muttersubstanz und Epimer [91]. Die genannten Lebensmittel besitzen - verglichen mit Honig – einen weit höheren Eiweiß- und Fettgehalt. Bei der Untersuchung dieser Proben ist zu erwarten, dass eine Probenaufarbeitung notwendig sein wird, um die Proteine abzutrennen, da diese in der SPR-Messung durch unspezifische Bindung an die Chipoberfläche stören. Dies kann entweder durch die Entfernung der Proteine (beispielsweise durch Ultrafiltration oder Präzipitation) oder durch Extraktion der Analyten erfolgen.

Bei der Untersuchung von Honig führte aus verschiedenen Gründen eine Festphasenextraktion nicht zum Erfolg. Dennoch sollte bei der Untersuchung anderer Matrices die Möglichkeit der Festphasenextraktion erneut geprüft werden, da sich die Matrices Honig und Fleisch zu sehr unterscheiden, als dass auf der Grundlage der Ergebnisse der Extraktion von Honigproben Voraussagen für die Erfolgswahrscheinlichkeit bei Fleisch zulässig wären. Das Augenmerk ist auch hier darauf zu richten, dass in der injizierten Probelösung nach der Extraktion physiologische Bedingungen vorliegen.

Bei hauptsächlich proteinhaltigen Matrices besteht neben der Festphasenextraktion zudem die Möglichkeit eines proteolytischen Abbaus der Proteinmatrix. Vor der Messung muss jedoch Deaktivierung oder Entfernung der Protease erfolgen, um den Abbau des Rezeptorproteins oder des Streptavidins, mit Hilfe dessen der Bindungspartner für das Rezeptorprotein an der Sensoroberfläche fixiert ist, durch die Protease zu vermeiden.

9 MATERIAL UND METHODEN

9.1 Isolierung und Reinigung des Repressor-Proteins TetR(BD)

Materialien und Geräte

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

Elektrophoresegerät Mini V8-10 (Whatman Biometra, Göttingen)

Vertical Gel Electrophoresis Apparatus (GIBCO BRL, Eggenstein)

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

Kationenaustauschersäule für die Ionenaustauschchromatographie, Volumen 63 ml, gefüllt mit SP-Sepharose (GE Healthcare Europe GmbH, München)

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

Gelfiltrationsanlage (Äkta Prime, Trennsäule: Superdex C75, Volumen 120 ml, beides Amersham Biosciences, Freiburg)

Ultraschall Zellhomogenisator (Labsonic U, Braun, Melsungen)

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

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

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

Fluorimeter (Fluorolog ISA Horiba Group, Jedin Yvon Spex)

Reagenzien

Ammoniumperoxodisulfat (APS) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Ammoniumsulfat, wasserfrei (Merck KGaA, Darmstadt)

Ampicillin-Natriumsalz (Fluka, Seelze)

Anhydrotetracyclin-Hydrochlorid (Acros Organics, Geel, Belgien)

Bromphenolblau-Natrium (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)

Glycerin (Fluka, Seelze)

Glycin (Fluka, Seelze)

Hefeextrakt (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Isopropylgalactopyranosid (IPTG) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Natriumchlorid (Fluka, Seelze)

NaH₂PO₄, wasserfrei (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Natriumdodecylsulfat (SDS) (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

BLUPrint-Färbelösung (GIBCO-BRL, Eggenstein)

Protein-Marker (peqGold, Proteinmarker II, peqLab, Erlangen)

Tetramethylethyldiamin (TEMED) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Tris-Borsäure (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Tris-HCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Trypton (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

β-Mercaptoethanol (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)

Medium zur Anzucht von E.coli BR 791

1% (w/v) Trypton

0,5% (w/v) Hefeextrakt

1% (w/v) NaCl

100 mg/l Ampicillin

pH 7,0

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

Proteinauftragungspuffer

140 mM Tris-HCl, pH 7,0

16% (v/v) β -Mercaptoethanol

4 % (w/v) SDS

0,1 % (w/v) Bromphenolblau

30% (v/v) Glycerin

Elektrophoresepuffer

500 mmol/l Tris

1,92 mol/l Glycin

1% (w/v) SDS

Sammelgel (4%ig)

40% Acrylamid / Bisacrylamid (19:1)	1,5 ml
1 mol/l Tris-HCl pH 6,8	1,3 ml
bidest. Wasser	10,7 ml
2% SDS	750 μ l
10% APS	750 μ l
TEMED	20 μ l

Trenngel (10%ig)

40% Acrylamid / Bisacrylamid (19:1)	3,5 ml
1 mol/l Tris-HCl, pH 6,8	1,3 ml
1 mol/l Tris-Borsäure, pH 8,8	1,5 ml
bidest. Wasser	6,9 ml
2% (w/v) SDS	800 μ l
APS	400 μ l
TEMED	5 μ l

Lagerungspuffer für den isolierten Tet-Repressor

16,7 mmol/l Tris

333,3 mmol/l NaCl

83% Glycerin

pH 8,0

Färbelösung für Elektrophoresegele

16% (v/v) BLUPrint-Lösung

9% Methanol

2% Eisessig

73% bidest. Wasser

Die Isolierung und Reinigung von TetR(BD) wurde in folgenden Schritten durchgeführt:

- Anzucht des transformierten Bakteriums und Induktion der Proteinexpression
- Isolierung und Aufreinigung des Tet-Repressorproteins durch Ionenaustausch- und Gelfiltrationschromatographie, in Anlehnung an Ettner et al. [233]. Nach der Ionenaustauscherchromatographie wurde eine Ammoniumsulfatfällung des Proteins durchgeführt, um das Probenvolumen zu verringern. Die Aufreinigungsschritte wurden durch Gelelektrophorese (SDS-PAGE) kontrolliert.
- Quantifizierung des Proteingehaltes durch photometrische Bestimmung
- Aktivitätsbestimmung des Proteins durch Fluoreszenztitration mit Anhydrotetracyclin

9.1.1 Expression des Proteins und Aufschluss der Zellen

Da die Überexpression des Tet-Repressors in E.coli das Zellwachstum stark beeinträchtigt, wurden die Repressorgene in dem Expressionsplasmid pWH610⁸ unter die Transkriptionskontrolle des synthetischen Promotors P_{tac} gestellt [234]. Zwischen

⁸ Bezeichnung pWH610: p = Plasmid; WH = Wolfgang Hillen (Leiter der Arbeitsgruppe, in der das Plasmid hergestellt wurde); 610 = laborinterne Nummerierung

Promotor und Genstart ist ein *lac*-Operator lokalisiert. Die Expressionskontrolle wird dadurch erreicht, dass das Plasmid in einen *E.coli*-Stamm transformiert wird, der den Lac-Repressor konstitutiv exprimiert (RB791). Der Lac-Repressor bindet an seinen Operator und blockiert dadurch den P_{lac} -Promotor. Durch die Induktion mit Isopropylgalactopyranosid verliert der lac-Repressor seine Bindefähigkeit und gibt den P_{lac} -Promotor frei, so dass eine Expression von TetR erfolgen kann. Das Plasmid trug darüber hinaus eine Ampicillin-Resistenz-Kassette, die Zellen konnten daher in ampicillinhaltigem Medium unter Selektionsdruck kultiviert werden.

Eine Übernachtskultur von mit Plasmid pWH610 transformierten *E.coli*-Zellen wurde mir freundlicherweise vom Arbeitskreis Prof. Dr. W. Hillen zur Verfügung gestellt. Für die Expression von TetR waren 10 ml der Übernachtskultur in einen Schikanekolben mit 1 L sterilem Medium überführt und bei 28 °C und 200 rpm inkubiert worden. Insgesamt wurden 4x 1 L Medium angeimpft. Die optische Dichte wurde in regelmäßigen Abständen überprüft und bei einer optischen Dichte von 0,52 die Expression des Tet-Repressors mit IPTG (Endkonzentration im Medium 1 mmol/l) induziert. Nach vier Stunden Inkubation (28 °C, 200 rpm) wurden die Zellen durch Zentrifugation (7500 g, 10 min, 4 °C) geerntet. Das Pellet wurde mit 50 ml kaltem Puffer (50 mmol/l NaCl in 20 mmol/l Phosphatpuffer, pH 6,6) gewaschen, erneut zentrifugiert (7500 g, 10 min, 4 °C) und in 90 ml Puffer resuspendiert. Die Zelllyse erfolgte durch Ultraschallbehandlung (5x 30 sec, 200 W) auf Eis. Zelltrümmer wurden nach dem Zellaufschluss durch eine Ultrazentrifugation (144000g, 60 min, 4 °C) abgetrennt, der Überstand wurde im Folgenden durch Ionenaustauscherchromatographie und Gelfiltration aufgereinigt.

9.1.2 Isolierung und Reinigung des Proteins

Der proteinhaltige Zellextrakt wurde auf eine Kationentauschersäule gegeben (SP-Sepharose), die Elution der Proteine erfolgte durch einen Natriumchlorid-Gradienten von 50 mmol/l bis 620 mmol/l in Gegenwart eines 20 mmol/l Phosphatpuffers, pH 6,6. Die Flussrate betrug 2 ml/min. Das Eluat der Säule wurde in Fraktionen à 6 ml aufgefangen. Die Elution wurde über die UV-Absorption des Eluates bei 280 nm kontrolliert, gleichzeitig wurde die Leitfähigkeit im Eluat kontinuierlich aufgezeichnet.

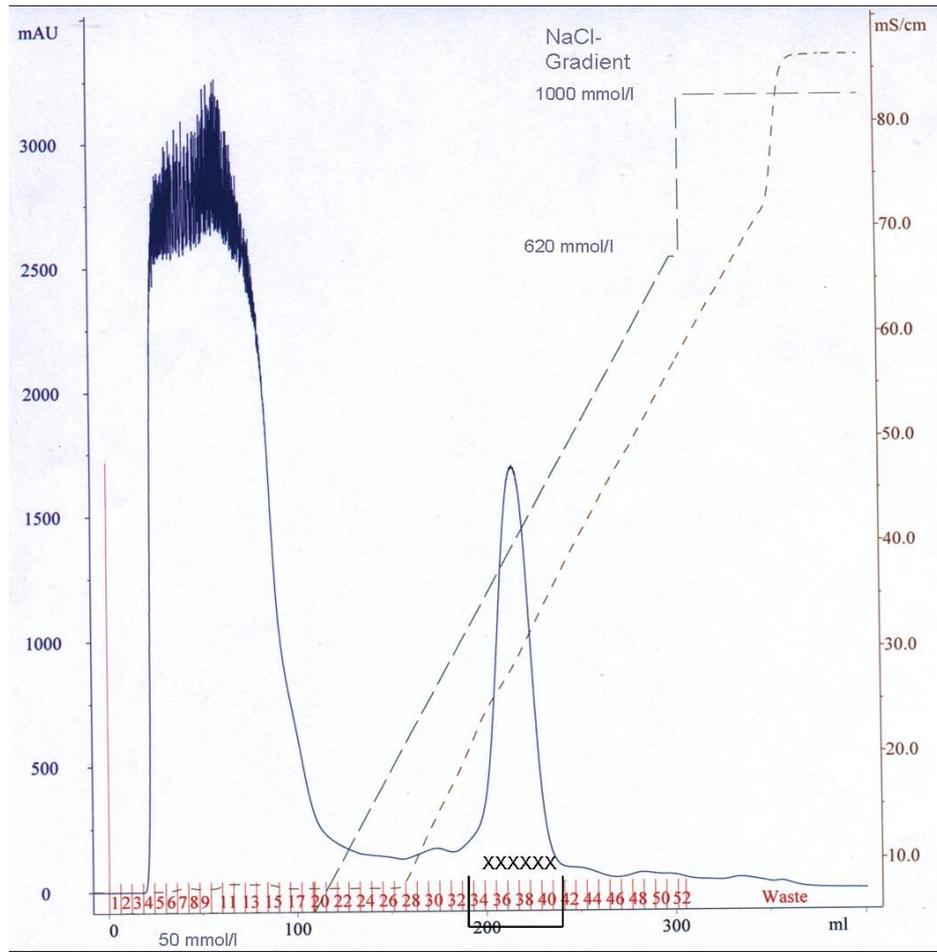


Abbildung 9-1: Elutionsprofil der Kationenaustauscher-Säule für die Aufreinigung von TetR(BD). In blau aufgetragen ist die UV-Absorption der Proteine bei 280 nm, in braun eingezeichnet die gemessene Leitfähigkeit als Kontrolle des NaCl-Gradienten. Die geschweifte Klammer kennzeichnet Fraktionen, die mittels SDS-PAGE untersucht wurden, die Kreuze kennzeichnen Fraktionen, mit denen nach der elektrophoretischen Trennung weitergearbeitet wurde.

Die TetR-haltigen Fraktionen von zwei Chromatographie-Läufen (zwei Läufe waren aufgrund des maximalen Ladevolumens der Säule notwendig) wurden vereinigt und der Tet-Repressor mit Ammoniumsulfat gefällt. Dazu wurde den vereinigten Fraktionen das eineinhalbfache Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung (in 50 mmol/l Tris-HCl, pH 8,0) unter Kühlung und vorsichtigem Rühren mit einer Peristaltikpumpe zugetropft. Das präzipitierte Protein wurde abzentrifugiert (3500 g, 10 Minuten, 4 °C) und das Pellet in insgesamt 15 ml Tris-Puffer (10 mmol/l Tris-HCl, 200 mmol/l NaCl, pH 8,0) gelöst.

Anschließend wurde eine Gelfiltration durchgeführt; 5 ml der Proteinlösung wurden dazu auf eine Superdex D75-Säule aufgebracht. Das maximale Ladevolumen der Säule betrug 5 ml, so dass 3 nacheinander durchgeführte Gelfiltrationsläufe notwendig waren.

Für die Elution wurde Tris-Puffer verwendet (10 mmol/l Tris-HCl, 200 mmol/l NaCl, pH 8,0), die Flussrate betrug 1 ml/min. Das Eluat wurde in Fraktionen à 4 ml gesammelt. Während der Gelfiltration wurde sowohl die UV-Absorption des Eluates bei 280 nm als auch die Leitfähigkeit aufgezeichnet.

Die Fraktionen, die TetR enthielten wurden vereinigt und aufkonzentriert, dazu wurden sie einer Ultrafiltration mit Zentrifugationsfiltereinheiten (Größenausschluss 30 kDa) unterzogen. (3500 g, 4 °C, unterschiedliche Zeiten). Das Volumen der konzentrierten Proteinlösung betrug etwa 1,6 ml. Zur Lagerung wurde der Tet-Repressor im Verhältnis 2:3 mit glycerinhaltigem Lagerpuffer verdünnt und in Aliquots von 100 µl bei -20 °C aufbewahrt. Diese Lösung wird im Folgenden als TetR-Stammlösung bezeichnet.

9.1.3 Gelelektrophorese

Eine Kontrolle der verschiedenen Schritte der Proteinaufreinigung erfolgte durch die elektrophoretische Trennung der Proteine auf Polyacrylamid-Gelen. Dabei wurden die Fraktionen aus Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration aufgetragen, bei denen eine hohe UV-Absorption einen entsprechenden Proteingehalt anzeigte. Die elektrophoretische Trennung lässt Rückschlüsse auf Menge und Größe der getrennten Proteine zu. 5 µl der Proben wurde mit demselben Volumen Proteinauftragepuffer verdünnt, jeweils 10 µl der verdünnten Proben wurden auf das Gel aufgetragen. Als Standard für verschiedene Molekulargewichte wurde ein Proteinmarker aufgetragen (peqGold II). Die Trennung erfolgte in Elektrophoresepuffer bei 160 – 170 V.

Vor dem Färben wurden die Gele mit einer Waschlösung (45% Methanol und 10% Essigsäure in Wasser) gewaschen (10 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken). Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte durch 20-minütiges Behandeln der Gele mit Färbelösung, anschließend wurden die Gele mit 10%iger Essigsäure entfärbt. Exemplarisch ist das Gel der SDS-Page nach der Gelfiltration in Abbildung 9-2 dargestellt.

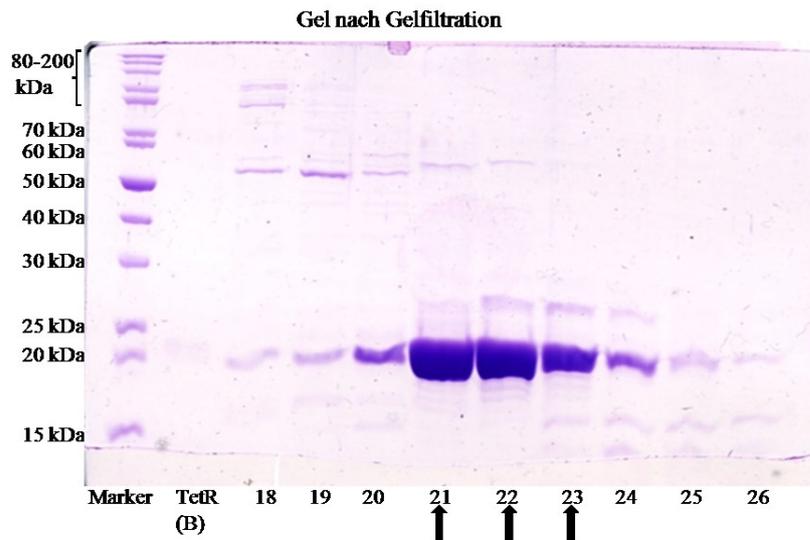


Abbildung 9-2: Kontrolle der Reinigung von TetR(BD) nach Gelfiltration mittels SDS-Page. Aufgetragen sind ein Molekulargewichtsstandard (Marker), TetR(B) als Positivkontrolle der Aufreinigung (2 ng in Puffer) sowie die TetR-haltigen Fraktionen der Gelfiltration. Volumen 10 μ l (Verdünnung 5 μ l Eluat + 5 μ l Proteinauftragepuffer), Pfeile kennzeichnen die Fraktionen, die im Anschluss vereinigt und aufkonzentriert wurden.

9.1.4 Photometrische Bestimmung der Konzentration

Die Proteinmenge wurde mittels der UV-Absorption bei 280 nm bestimmt. Die UV-Absorption von Proteinen beruht auf dem Vorhandensein aromatischer Aminosäuren (hauptsächlich Tryptophan). Der Extinktionskoeffizient des zu quantifizierenden Proteins lässt sich mit Hilfe der molaren Extinktionskoeffizienten von Tyrosin und Tryptophan [235] durch Multiplikation mit der Anzahl der entsprechenden Aminosäure im Protein berechnen.

$$\epsilon_{280} = 5700 \times (\text{Anzahl Tryptophane}) + 1300 \times (\text{Anzahl Tyrosine}) \quad [\text{l/mol} \cdot \text{cm}]$$

Der Tet-Repressor enthält je Monomer 2x Tryptophan und 5x Tyrosin, so dass sich ein Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{280} = 17900 \text{ L/mol} \cdot \text{cm}$ für das Monomer errechnet.

Für die Absorptionsmessung wurde die Proteinlösung im Verhältnis 1:100 und 1:50 mit Tris-Puffer verdünnt und die Absorption gegen Tris-Puffer bei 280 nm gemessen.

Für die Berechnung der Proteinkonzentration gilt:

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot d} \cdot VF \cdot 1000 [\text{mmol/l}]$$

$$\rho = \frac{A}{\varepsilon \cdot d} \cdot VF \cdot M_R [\text{mg/ml}]$$

c = Konzentration [mmol/l]

ρ = Massenkonzentration [mg/ml]

A = Absorption (280 nm)

VF = Verdünnungsfaktor

M_R = Molekulargewicht TetR (46.600 g/mol)

ε = Extinktionskoeffizient, Monomer (17.900) [L/(mol·cm)]

d = Schichtdicke der Quartzküvette [cm]

Tabelle 9-1: Messwerte der Absorption von TetR(BD)-Lösung zur Berechnung der Proteinkonzentration, UV-Absorption bei 280 nm

Verdünnung	Absorption	Konzentration [mg/ml]	Konzentration [mmol/l]
1:100	0,140	18,22	0,782
1:50	0,279	18,15	0,779

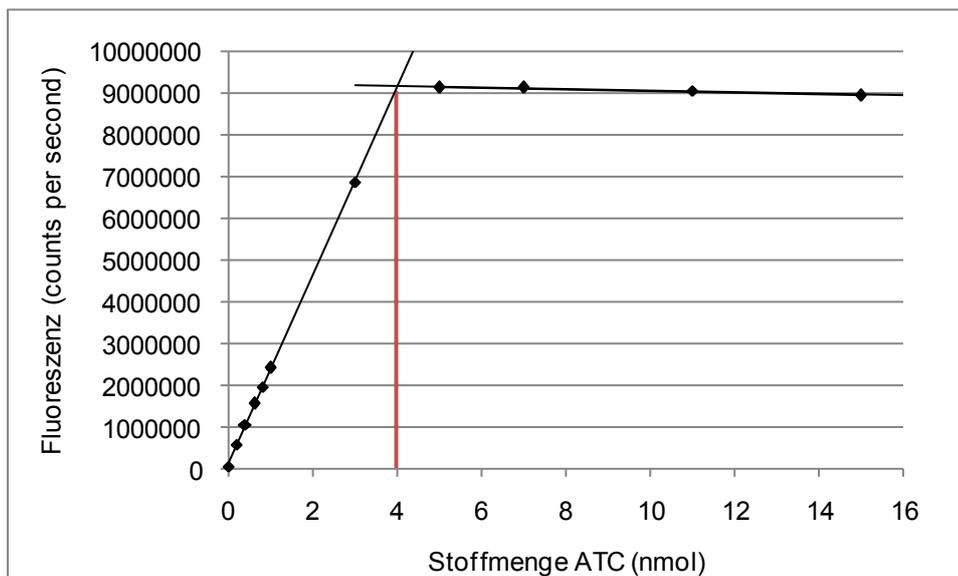
9.1.5 Aktivitätsbestimmung mittels Fluoreszenz-Titration

Bei der fluorimetrischen Aktivitätsbestimmung nutzt man die Tatsache, dass an TetR gebundene Tetracycline eine stärkere Fluoreszenz zeigen als freie [86].

Für die Messung wurde eine Stoffmenge von 4 nmol TetR(BD) in Tris-Puffer (500 mmol/l Tris-HCl mit 25 mmol/l Magnesium, pH 7,4) in eine Küvette gegeben. Zur Titration wurden verschiedene Volumina einer 20 bzw. 200 $\mu\text{Mol/l}$ Anhydrotetracyclin-Lösung (ATC) nacheinander zugegeben, 15 Sekunden gerührt und nach einer Inkubationsdauer von drei Minuten die Fluoreszenz gemessen. Die Fluoreszenz wurde bei 455 nm angeregt, die Emissionswellenlänge betrug 545 nm.

Tabelle 9-2: Volumen der zum TetR pipettierten ATC-Lösung und Stoffmenge ATC in der Küvette zur Aktivitätsbestimmung von TetR(BD)

	Volumen ATC-Lösung [μ l]	Stoffmenge ATC in Küvette [nmol]
ATC (20 μ Mol/l)	10	0,2
	10	0,4
	10	0,6
	10	0,8
	10	1,0
ATC (200 μ Mol/l)	10	3,0
	10	5,0
	10	7,0
	20	11,0
	20	15,0

**Abbildung 9-3: Aktivitätsbestimmung von 4 nmol TetR(BD) mittels Fluoreszenztitration**

In Abbildung 9-3 ist die gemessene Fluoreszenz gegen die Stoffmenge Anhydrotetracyclin aufgetragen, dabei ergeben sich zwei Geraden. Der Anstieg der linken Gerade zeigt, dass mit steigender Stoffmenge die Fluoreszenz zunimmt, dass also in diesem Bereich Anhydrotetracyclin vom Repressor gebunden wird. Der leichte Abfall der rechten Gerade zeigt hingegen, dass alle Bindestellen des Repressors mit

Anhydrotetracyclin belegt sind (keine Zunahme der Fluoreszenz mit steigender Stoffmenge). Über den Schnittpunkt der Geraden lässt sich die Menge Anhydrotetracyclin ermitteln, die nötig ist, um alle Bindestellen im Protein abzusättigen. Der Quotient aus eingesetzter Stoffmenge TetR und für die Sättigung benötigter Stoffmenge ATC beschreibt die Aktivität des Proteins, die hier 100% betrug.

9.2 Herstellung von *tet*-Operatoren

Zwei unterschiedliche Varianten *tet*-Operator wurden für diese Arbeit verwendet. Die DNA-Einzelstränge wurden von der Firma MWG Biotech als Lyophilisat bezogen. Für die Herstellung der *tet*-Operatoren wurde die 48 Basenpaare enthaltende Sequenz des *tetO1* und ein dazu komplementärer Strang eingesetzt, die Sequenz des *tetO1* ist bei Kamionka beschrieben [84]:

5'-CCTAATTTTTGTTGACACTCTATCATTGATAGAGTTATTTTACCATCT-3'

Die hervorgehobenen Bereiche kennzeichnen den palindromen Bereich des *tetO1*, in dessen Symmetriezentrum ein T steht. Über den palindromen Bereich (18 Basen) kann der Operator-Strang mit einem weiteren Operator-Einzelstrang einen Doppelstrang bilden, es resultiert dann ein funktionsfähiger Operator. Der Begriff „palindrome Sequenz“ bezeichnet eine doppelsträngige DNA-Sequenz, die auf beiden Strängen in einer Richtung (z.B. 5'-3') dieselbe Basenabfolge zeigt.

Das Lyophilisat der DNA-Einzelstränge wurde in sterilem Tris-Puffer (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mol/l NaCl, 0,1 mmol/l EDTA; pH 7,4) nach den Angaben des Herstellers auf eine Konzentration von 100 µmol/l verdünnt. Anschließend wurden die benötigten Oligonucleotide in einem bestimmten Mischungsverhältnis, das von Möller beschrieben wurde unter sterilen Bedingungen gemischt [188]. Die Ausbildung des Doppelstrangs erfolgte durch Erhitzen der Mischung auf 97 °C für 7 Minuten und anschließendes langsames Abkühlen auf Raumtemperatur (Annealing) in Anlehnung an Kamionka [84].

Tabelle 9-3: Mischungsverhältnisse der Oligonucleotide zur Herstellung der tetO-Varianten 1x und 2x Biotin. "tetO Biotin" bezeichnet das am 5'-Ende biotinylierte Oligonucleotid mit oben angegebener Sequenz, "tetO" das underivatisierte Oligonucleotid derselben Sequenz

<i>tetO</i> -Variante	Oligonucleotide	Volumen [μ l]
„2x Biotin“	<i>tetO</i> Biotin	10
	<i>tetO</i> Biotin	10
„1x Biotin“	<i>tetO</i> Biotin	5
	<i>tetO</i>	45

Die Temperaturführung während des Annealings erfolgte in einem PCR-Thermocycler der Marke Biometra T personal (Biometra, Göttingen), das Temperaturprogramm ist in Tabelle 9-4 wiedergegeben.

Tabelle 9-4: Temperatur- und Zeitverlauf während des Annealings der tet-Operatoren

Temperatur [°C]	Zeit [Minuten]
97	7
93	5
90	5
86	5
83	5
...	
20	5
-3	Ende

Die Lagerung der Operatoren erfolgte bei -20 °C.

9.3 SPR-Analysen im System mit Doxycyclinderivaten

Geräte und Materialien

Anlage zur Reinstwasserherstellung (Milli-Q plus; Millipore GmbH, Schwalbach)

Analysenwaage Modell 1712MP8 (Sartorius, Göttingen)

Flachbettschüttler SM25 (Edmund Bühler Labortechnik, Hechingen)

Heizblock Multi-Blok (Labline Instruments, Ill, USA)

Mikrotiterplatten und Autosamplergefäße (Biacore International AB, Uppsala, Schweden)

Schüttler Vortex-Genie (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz)

Sensorchips CM5 mit Carboxymethyldextranoberfläche (Biacore International AB, Uppsala, Schweden)

Sensorchips CMTEG, Oberfläche carboxyliertes Tetraethylenglycol (XanTec bioanalytics GmbH, Münster)

Sensorchips CMDP mit Carboxymethyldextranoberfläche 5 nm (XanTec bioanalytics GmbH, Münster)

Sensorchips HC1000m, Oberfläche lineares Polycarboxylat-Hydrogel, 1000 nm (XanTec bioanalytics GmbH, Münster)

SPR-Gerät Biacore Q[®] (Biacore International AB, Uppsala, Schweden)

Zentrifuge (Hermle Z200 A mit Rotor 220.96 V01, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen)

Reagenzien und Lösungen

Amine coupling kit; beinhaltet Ethyldiaminopropylcarbodiimid (EDC), N-Hydroxysuccinimid (NHS) und Ethanolamin (Biacore International AB, Uppsala, Schweden)

Anhydrotetracyclin-HCl (Acros Organics, Geel, Belgien)

di-Natriumtetraborat (Merck KGaA, Darmstadt)

Doxycyclin-HCl · ½ H₂O · 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)

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

HBS-N-Puffer (10 mM 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure, 150 mM NaCl; pH 7,4) (Biacore International AB, Uppsala, Schweden)

Laufpuffer (HBS-P-Puffer dotiert mit 5 mmol/l MgSO_4)

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (Merck KGaA, Darmstadt)

Natriumacetat-Trihydrat (Merck KGaA, Darmstadt)

NaCl (Fluka, Seelze)

NaOH (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

N-Hydroxysulfosuccinimid, Natriumsalz (Fluka, Seelze)

Probenpuffer (HBS-P-Puffer dotiert mit 5 mmol/l MgSO_4 und 35 mmol/l NaCl)

SDS (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Tetracyclin-HCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Software

Bezüglich der zur Steuerung und Auswertung von SPR-Messungen verwendeten Software siehe 9.4.

9.3.1 Präparation von Sensorchips für das Assay-Format mit Doxycyclinderivaten

Die Immobilisierung der Doxycyclinderivate auf den Sensorchips erfolgte mittels Aminkopplung modifiziert nach Johnsson et al. [236]. Die Chipoberfläche wurde durch Injektion von 35 μl einer 1:1-Mischung von EDC (0,4 M) und NHS oder Sulfo-NHS (je 0,1M) aktiviert. Die Immobilisierung der Doxycyclinderivate erfolgte durch Injektion von 150 μl Derivatlösung (0,5 mg ml^{-1} in HBS-EP-Puffer pH 7,4; sofern nicht anders angegeben). 15 μl Ethanolamin (1 M, pH 8,5) wurden abschließend injiziert, um noch verbliebene NHS-Ester zu deaktivieren. Alle Injektionen wurden bei 25 °C und einer Flussrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchgeführt; als Laufpuffer wurde HBS-EP-Puffer (pH 7,4) verwendet.

Anschließend wurden 5 Injektionen von SDS vorgenommen, um ungebundenes Material von der Chipoberfläche zu spülen (SDS 0,2% in Laufpuffer, 5 μ l bei 20 μ l/min), zum Auswaschen von SDS, das sich in die Carboxymethyl-dextran-schicht einlagert, wurde danach HBS-EP-Puffer injiziert (20 μ l bei 20 μ l/min).

9.3.2 Standardbedingungen für SPR-Messungen mit immobilisierten Doxycyclinderivaten

Sofern keine anderen Angaben gemacht wurden, diente Laufpuffer als Verdünnungspuffer für TetR, Tetracycline und SDS, darüber hinaus auch als Puffer für die SPR-Messungen. Die Flussrate während der Messungen und Injektionen betrug 5 μ l/min, bei allen Messungen wurden die Flusszellen auf 25 °C temperiert. Es wurden standardmäßig 25 μ l TetR-Lösung oder von Mischungen von TetR und Tetracyclinlösungen injiziert, Abweichungen davon sind explizit erwähnt. Tetracyclinlösungen verschiedener Konzentrationen wurden durch Verdünnen einer Tetracyclin-Stammlösung (1 mg/ml Laufpuffer) erhalten. Die Stammlösung wurde unter Lichtausschluss bei 4-8 °C aufbewahrt und nach maximal 7 Tagen verworfen. Für die Messreihen wurde die Stammlösung jeweils frisch mit Laufpuffer auf die gewünschten Tetracyclin-Konzentrationen verdünnt (1 – 10000 ng/ml Tetracyclin).

Das Mischen von TetR und Tetracyclinlösungen wurde automatisch im Gerät durchgeführt. Konzentrationsangaben für TetR und Tetracyclin bei Mischungen der Komponenten sind jeweils für die Messlösung angegeben. Bei der Injektion reiner TetR-Lösungen wurde, soweit nicht anders vermerkt, eine Konzentration von 1 μ M verwendet.

Der Messpunkt „Basislinie“ wurde 10 Sekunden vor der ersten Injektion eines Zyklus aufgezeichnet. 60 Sekunden nach Ende der Injektion (TetR oder TetR/Tetracyclinmischung) wurde ein weiterer Messpunkt aufgezeichnet. Aus der Differenz der beiden Messpunkte (Δ RU) wurde die TetR-Bindung berechnet. 60 Sekunden nach Ende der Injektion der letzten Regenerationslösung wurde ein weiterer Messpunkt „Regeneration“ gesetzt, um durch den Vergleich von diesem Messpunkt mit dem Messpunkt „Basislinie“ den Grad der Regeneration berechnen zu können.

9.3.3 Charakterisierung der TetR-Bindung

Für die Bestimmung der Stabilität der Bindung wurden 40 μl TetR (1 μM ; im Falle der CMTEG-Oberfläche wurde die Konzentration von TetR 3 μM gewählt und dafür das Injektionsvolumen verringert, da hier generell niedrige TetR-Bindungen beobachtet wurden) injiziert. Anschließend lief für 60 Minuten Laufpuffer mit einer Flussrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ durch die Flusszelle, das Signal wurde währenddessen aufgezeichnet. Die Menge des dissoziierten TetR wurde relativ zur vorher gebundenen Menge berechnet.

Die Spezifität der Bindung (unspezifische Bindung des Rezeptors an die Chipoberfläche) wurde ermittelt, indem die Mengen TetR verglichen wurden, die bei der Injektion von TetR in An- und in Abwesenheit von Magnesiumionen im Puffer gebunden wurden. TetR wurde dazu in Laufpuffer (enthält Magnesiumionen), ein zweiter Ansatz in HBS-EP-Puffer (ohne Magnesiumionen) auf 1 μM verdünnt.

Die Abhängigkeit des Messsignals von der TetR-Konzentration wurde durch Injektion von TetR-Lösungen im Konzentrationsbereich von 0,1 μM bis 3 μM bestimmt. Die Konzentrationen wurden durch Verdünnung der TetR-Stammlösung in Laufpuffer hergestellt.

Der Einfluss der Kontaktzeit beziehungsweise des Injektionsvolumens auf das Signal wurde geprüft, indem verschiedene Volumina (30, 40, 50 μl) TetR-Lösung (1 μM) bei Flussraten von 5, 10 und 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ injiziert wurden.

9.3.4 Konkurrenz von Tetracyclinen mit den Doxycyclinderivaten um die Bindestellen des TetR

Bei den Konkurrenzexperimenten wurden Tetracyclinlösungen vor der Injektion mit TetR inkubiert. Der Einfluss der Inkubationsdauer für die Bindung TetR-Tetracyclin wurde geprüft, wie im Folgenden beschrieben: TetR 2 μM in Laufpuffer und Tetracyclinlösung (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurden im Verhältnis 1:1 manuell gemischt. Nach definierter Inkubationsdauer bei Raumtemperatur wurde am Autosampler der Startbefehl für die Injektion gegeben. Im Gerät sind der Injektion diverse Spülschritte vorangestellt, so dass die eigentliche Injektion etwa 2 Minuten nach dem Startbefehl erfolgte. Es wurden Gesamt-Inkubationszeiten von 3 bis 12 Minuten getestet.

Nachdem festgestellt wurde, dass die Inkubationsdauer keinen Einfluss auf die TetR-Bindung hat, wurden bei weiteren Konkurrenzexperimenten TetR- und Tetracyclinlösungen automatisch im Gerät direkt vor der Injektion gemischt.

Die Langzeitstabilität der Sensoroberflächen wurde getestet, indem wiederholte Injektionen einer TetR-Lösung sowie einer Mischung TetR/Tetracyclin über mehr als 50 Zyklen erfolgten. Der Vergleich der erhaltenen Werte für die TetR-Bindung wurde zur Beurteilung der Stabilität der Derivate herangezogen.

Die Einstellung des pH-Wertes des Laufpuffers für Messungen mit Laufpuffer pH 6,0 erfolgte mit HCl 4 mol/l.

9.3.5 Ermittlung geeigneter Regenerationsbedingungen

Zur Ermittlung geeigneter Regenerationsbedingungen wurden verschiedene Kombinationen von 6 Regenerationsstammlösungen nach einem Schema von Andersson getestet. [207, 237]. Dazu wurde der Chip zunächst mit TetR belegt (Injektion: 25 μ L, 5 μ l/min, TetR 3 μ M, im Fall von CM5-Chips aufgrund der besseren TetR-Bindung 2 μ M). Die Chipoberfläche wurde mit der jeweiligen Regenerationslösung regeneriert (Injektionsvolumina CMTEG-Chip 30 μ l, HC1000m und CMDP-Chip 20 μ l, CM5-Chip 5; 6,7 und 8,3 μ l). Alle Regenerationslösungen wurden mit einer Flussgeschwindigkeit von 20 μ l/min injiziert. Die Regenerationskraft der Lösung wurde berechnet als die Menge an TetR, die durch die Regeneration vom Chip gelöst werden konnte bezogen auf die Menge, die sich vor der Regeneration auf dem Chip befunden hat.

Es wurden die im Folgenden aufgeführten Regenerations-Stammlösungen hergestellt. Die dafür erforderlichen Chemikalien wurden alle von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG (Karlsruhe), von Fluka (Seelze) oder von der Carl Roth GmbH & Co. KG (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 der Stammlösungen wurde zu einem 3-Komponentengemisch mit entweder einer anderen Stammlösungen und einem Anteil Wasser (w) oder mit 2 Teilen Wasser gemischt. Die Mischungen BIw, BUw und ISw zeigten einen Niederschlag und wurden daher nicht injiziert; die Mischung IUw wurde ebenfalls nicht injiziert, da diese die Chipoberflächen angreifen kann [207]. Alle anderen Kombinationen wurden getestet, wobei die Mischungen mit basischen und aciden Komponenten nur auf CM5-Oberflächen getestet wurden.

Für die verschiedenen Chipoberflächen konnten keine einheitlich wirksame Regenerationsbedingungen ermittelt werden, SDS und ICw erwiesen sich in den meisten Fällen als wirksame Regenerationslösungen, für die Vor- und Nachteile der beiden Lösungen siehe Kapitel 6.1.6.2, Seite 99. Die Regeneration von CM5-Oberflächen erfolgte nach Optimierung der Regenerationsbedingungen durch Injektion einer 0,2% (w/v) SDS-Lösung (5 μ l, 20 μ l/min). HC1000m und CMTEG-Oberflächen wurden durch Injektion von 20 μ l einer 0,4%igen (w/v) SDS-Lösung (Flussrate 20 μ l/min) regeneriert. Auf den oben genannte Chips wurde zum Auswaschen des in das Chipmaterial eingelagerten SDS eine Injektion von Laufpuffer vorgenommen (20 μ l, 20 μ l/min). Für die Regeneration der CMDP-Oberfläche wurde eine 0,5%ige (w/v) SDS-Lösung eingesetzt (20 μ l; 20 μ l/min); eine anschließende Injektion von Puffer war überflüssig, da kein SDS in die dünne Dextranschicht eingelagert wurde.

9.4 SPR-Analysen mittels des *tetO*/TetR-Systems

Geräte und Materialien

Anlage zur Reinstwasserherstellung (Milli-Q plus; Millipore GmbH, Schwalbach)

Analysenwaage Modell 1712MP8 (Sartorius, Göttingen)

Flachbettschüttler SM25 (Edmund Bühler Labortechnik, Hechingen)

Heizblock Multi-Blok (Labline Instruments, Ill, USA)

Mikrotiterplatten und Autosamplergefäße (Biacore International AB, Uppsala, Schweden)

Schüttler Vortex-Genie (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz)

Sensorchips SA mit Streptavidin-Oberfläche (Biacore International AB, Uppsala, Schweden)

SPE-Kartuschen Strata-X-CW 60 mg/3 ml (Phenomenex Ltd Deutschland, Aschaffenburg)

SPE-Kartuschen Waters Oasis[®] HLB 6cc (Waters GmbH, Eschborn)

Sample Preparation Unit Adsorbex, (Merck KGaA, Darmstadt)

SPR-Gerät Biacore Q[®] (Biacore International AB, Uppsala, Schweden)

Ultrafiltrationseinheiten Microcon YM-10, MWCO 10kDa, regenerierte Cellulose (Millipore GmbH, Schwalbach)

Ultrafiltrationseinheiten Vivascience, Vivaspin500; MWCO 5000 Da, PES (Sartorius Group, Göttingen)

Vakuumpumpe Typ EKF56CX-4 (Greifenberger Antriebstechnik GmbH, Marktredwitz)

Wasserbad Julabo SW1, Temperiereinheit Julabo VC (Julabo Labortechnik, Seelbach)

Zentrifuge (Hermle Z200 A mit Rotor 220.96 V01, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen)

Zentrifuge Millifuge[™] Centrifuge (Millipore GmbH, Schwalbach)

Reagenzien und Lösungen

4-epi-Chlortetracyclin-HCl (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)

Ameisensäure p.a. (Fluka, Seelze)

Anhydrotetracyclin-HCl (Acros Organics, Geel, Belgien)

Citronensäure · H₂O (Merck KGaA, Darmstadt)

Doxycyclin-HCl · ½ H₂O · ½ Ethanol (Fluka, Seelze)

Dinatriumhydrogenphosphat (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Ethanol abs. (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) · 2 H₂O, Di-Natriumsalz (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

D-(-) Fructose (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

D-(+)-Glucose · H₂O (Merck KGaA, Darmstadt)

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)

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

HBS-N-Puffer (10 mM 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure, 150 mM NaCl; pH 7,4) (Biacore International AB, Uppsala, Schweden)

Hexan (Fisher Scientific GmbH, Schwerte)

Laufpuffer (HBS-P-Puffer dotiert mit 5 mmol/l MgSO₄)

D-(+)Maltose·H₂O (Fluka, Seelze)

McIlvaine-Puffer (0,05 mol/l Citronensäure · H₂O; 0,1 mol/l Na₂HPO₄; 0,1 mol/l EDTA, mit HCl auf pH 4,0 eingestellt)

MgSO₄ · 7 H₂O (Merck KGaA, Darmstadt)

Methanol, HPLC grade (Acros Organics, Geel, Belgien)

Natriumazid, (Fluka, Seelze)

NaCl (Fluka, Seelze)

NaOH (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Oxalsäure · 2 H₂O (Fluka, Seelze)

Oxytetracyclin-HCl (Fluka, Seelze)

Periodsäure (Merck KGaA, Darmstadt)

Proteinase Typ VIII (Subtilisin) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Probenpuffer (HBS-P-Puffer dotiert mit 5 mmol/l MgSO₄ und 35 mmol/l NaCl)

Rinderserumalbumin, Fraktion V (BSA) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Saccharose (Merck KGaA, Darmstadt)

SDS (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Tetracyclin-HCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

Software

Daten, die mit dem SPR-Gerät Biacore Q[®] erhalten wurden, wurden mittels Biacore Evaluation Software, Version 1.0 ausgewertet; Tetracyclin-Quantifizierungen und Berechnungen der IB₅₀-Konzentrationen von Kalibrierkurven wurden mit der BIAevaluation Software Version 3.1 durchgeführt. Zur Steuerung des SPR-Gerätes und Aufzeichnung der Daten stand die Software Biacore Q Control Software, Version 3.0.3 zur Verfügung.

9.4.1 Präparation von SA-Sensorchips für den Screening-Test

Für die Durchführung von Messungen mit dem von Möller beschriebenen Screening-Test [188] wurden SA-Sensorchips verwendet. Bei diesem Chiptyp ist Streptavidin an die Carboxymethyldextranoberfläche gebunden, so dass die Immobilisierung des biotinylierten *tetO*- Operators über die Bindung zwischen Biotin und Streptavidin erfolgt.

Vor der Immobilisierung erfolgte nach den Herstellerangaben dreimal eine Injektion von 1 mol/l NaCl in 50 mmol/l NaOH, das Injektionsvolumen betrug 5 µl. Dieser Schritt

ist notwendig, um für die Lagerung aufgebrauchte Stabilisatoren zu entfernen. Anschließend wurde der Chip durch eine Injektion von 5 μ l Laufpuffer gespült, um die NaCl/NaOH-Lösung vollständig zu entfernen. Die Operator-Lösung (100 μ mol/l) wurde vor der Injektion mit Laufpuffer auf eine Konzentration von 20 nmol/l verdünnt und bei einer Flussrate von 4 μ l/min injiziert. Das Injektionsvolumen wurde je nach gewünschtem Immobilisierungslevel angepasst. Das Standardvolumen betrug 40 μ l und führte zu einem Immobilisierungslevel von etwa 1100 RU. Sensorchips, auf denen die Chipstabilität bei verschiedenen Temperaturen untersucht wurde, wurden standardmäßig mit 32 μ l Operator-Lösung immobilisiert.

Nach der *tetO*-Injektion wurde der Chip mit 5 μ l 0,3% SDS in Laufpuffer und 2x 5 μ l Laufpuffer gespült, um nicht gebundenes *tetO* von der Chipoberfläche zu spülen. Alle Injektionen mit Ausnahme der *tetO*-Injektion wurden bei einem Fluss von 5 μ l/min vorgenommen.

9.4.2 Beladung des immobilisierten Operators mit TetR

Die Beladung des immobilisierten Operators mit Repressor wurde durch Injektion einer 1 μ Mol/l-Lösung (Arbeitslösung) von TetR(BD) in Laufpuffer erreicht. Zur Herstellung der TetR-Arbeitslösung wurde ein Aliquot der TetR-Stammlösung (siehe Abschnitt 9.1.2) aufgetaut und daraus das benötigte Volumen zur Verdünnung entnommen. Die Verdünnung auf 1 μ Mol/l wurde mit Laufpuffer vorgenommen. Einmal aufgetaute Aliquots wurden bis zum vollständigen Aufbrauchen bei 4-8 °C aufbewahrt. Die TetR-Arbeitslösung wurde unmittelbar vor jeder Messreihe hergestellt und – sofern nicht anders beschrieben – wurden 5 μ l bei einem Fluss von 10 μ l/min injiziert. Die Höhe des erhaltenen Signals hängt von der Menge des immobilisierten Operators ab, bei Immobilisierungsleveln von 1000 RU wurde für die Injektion von TetR ein Signal in derselben Größenordnung erhalten.

9.4.3 Regeneration der Sensorchip-Oberfläche

Die Regeneration der Chipoberfläche, das heißt das Ablösen von auf der Oberfläche verbliebenem TetR sowie von unspezifisch gebundenen Matrixbestandteilen, wurde durch Injektion einer SDS-Lösung (0,2% w/v in Laufpuffer) erreicht. Das Injektionsvolumen betrug 5 μ l bei einer Flussrate von 20 μ l/min. Um ein schnelleres

Auswaschen von SDS zu erreichen, das sich in die Carboxymethyl-dextran-Schicht des Sensorchips einlagert, wurden anschließend 20 µl Probenpuffer injiziert (Flussrate 20 µl/min). Nach den Injektionen wurde ein zusätzlicher Spülschritt („extra wash“) durchgeführt, die Stabilisierungszeit nach dem Waschschrift vor einem neuen Zyklus betrug 60 Sekunden. Nur in Einzelfällen war diese Vorgehensweise zur Regeneration nicht ausreichend, in diesen Fällen wurde die Konzentration der SDS-Lösung auf 0,3% (w/v) erhöht und im Weiteren der beschriebenen Vorgehensweise gefolgt.

9.4.4 Herstellung von Kalibrierlösungen in Puffer und Matrix

Für die Herstellung von Tetracyclin-Lösungen zur Aufzeichnung von Kalibrierkurven wurde eine Tetracyclin-Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt (Einwaage von 10,8 mg Tetracyclin-Hydrochlorid, Lösen in 10 ml Probenpuffer). Die Stammlösung wurde bei 4 - 8 °C unter Lichtausschluss für maximal sieben Tage gelagert. Für die Analysenreihen wurde die Stammlösung jeweils frisch mit Probenpuffer auf die gewünschten Tetracyclin-Konzentrationen verdünnt (1 – 400 ng/ml Tetracyclin).

Für die Herstellung von Kalibrierlösungen in Honig wurden 0,5 g Mischhonig (Honig 1, soweit nichts anderes angegeben) in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen und in 9,5 g Probenpuffer verdünnt (Verdünnung 1:20). Die Kalibrierlösungen in Honig wurden durch Verdünnen der Tetracyclin-Stammlösung mit der Honiglösung erhalten. Die Dotierung verschiedener Honigproben zur Berechnung der Konzentration bei verschiedenen Verdünnungen wurde in derselben Weise vorgenommen, die Dotierung der Honige für Flüssig/Flüssig und Festphasenextraktion wird gesondert beschrieben.

Sofern nicht anders angegeben betrug das Injektionsvolumen bei der SPR-Messung von Kalibrierungen in Puffer 5 µl (Flussrate: 10 µl/min); bei Messungen von Honigproben und deren zugehöriger Kalibrierung 30 µl (Flussrate: 5 µl/min).

Der IB_{50} -Wert wurde nach folgender Formel berechnet:

$$IB_{50} [RU] = \frac{(\Delta RU_{(Tc\ max)} - \Delta RU_{(Tc\ min)})}{2} + \Delta RU_{(Tc\ min)}$$

Tc_{max} beschreibt dabei die höchste gemessene Tetracyclin-Konzentration, Tc_{min} die geringste.

Die Umrechnung in $\mu\text{g}/\text{kg}$ oder ng/ml erfolgte durch Einsetzen des IB_{50} -Wertes in die für die Kalibrierkurve erhaltene Funktion (Biacore Evaluation Software).

9.4.5 Honigproben

Honigproben wurden – soweit nicht anders beschrieben - nach Dotierung und Verdünnung mit Probenpuffer zentrifugiert ($4185 \times g$, 15 Minuten, Raumtemperatur), um Pollen und partikuläre Verunreinigungen zu entfernen. Nach der Zentrifugation wurden die Honiglösungen ohne weitere Aufarbeitungsschritte direkt eingesetzt.

Ultrafiltration

Es wurden die Ultrafiltrationseinheiten Microcon YM-10, MWCO 10kDa und Vivascience, Vivaspin 500; MWCO 5000 Da verwendet. Die Zentrifugation erfolgte bei $5200 \times g$ (Raumtemperatur) bis zu einem Filtratvolumen von etwa $300 \mu\text{l}$ (PES-Membranen: 20 min, regenerierte Cellulose: bis zu 40 min).

Mikrobiologische Entfernung von Zuckern

0,5 g Honig wurden im Verhältnis 1:20 mit Probenpuffer verdünnt und mit 20 mg Trockenhefe 18 h bei $35 \text{ }^\circ\text{C}$ unter Schütteln (91 rpm) inkubiert; vor der Messung erfolgte die Abtrennung der Hefen durch Zentrifugation bei $4185 \times g$ für 15 min, sowie Filtration der Proben (Spritzenfilter Millex GV $0,22\mu\text{m}$).

Chemische Oxidation von Zuckern

Der Bedarf an Periodsäure wurde für eine Einwaage von 1 g Honig berechnet, dabei wurde zur Vereinfachung ein Gehalt an Fructose von 75% für die Berechnung herangezogen (dies ist möglich aufgrund des identischen Molekulargewichtes von Fructose und Glucose). Über das Molekulargewicht lässt sich der Zuckergehalt in einem Gramm Honig zu 4,2 mmol berechnen (berechnet als Fructose) Da Fructose und Glucose je 5 vicinale OH-Gruppen tragen, wurden 20,8 mmol Periodsäure zur Oxidation der Zucker in einem Gramm Honig benötigt. Eine entsprechende Lösung von Periodsäure wurde in Reinstwasser hergestellt. Honig und Honigimitat wurden mit 10 Teilen Periodsäure versetzt (w/v), die Reaktionsansätze reagierten über Nacht bei Raumtemperatur. Ein Aliquot der Reaktionsansätze wurden im Verhältnis 1:10 und 1:5

mit Probenpuffer verdünnt und der pH-Wert mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Vor der Injektion erfolgte eine Filtration durch Spritzenfilter (PVDF 0,2µm), das Injektionsvolumen der Proben betrug 5µl bei einem Fluss von 10 µl/min.

Proteasebehandlung

Zur Entfernung von Proteinen wurden Honigproben mit Protease inkubiert, zu den im Verhältnis 1:20 verdünnten Honigen wurden je 50µl einer Subtilisinlösung (10 mg/ml) pipettiert. Die Inkubation erfolgte im Wasserbad (60 °C, 2 h). Anschließend erfolgte eine Ultrafiltration nach oben stehenden Angaben.

Extraktion von Lipidbestandteilen

Die Entfernung von Lipiden wurde durch Ausschütteln mit Hexan erreicht: 3 ml des 1:20 in Probenpuffer verdünnten Honigs wurden mit 1 ml Hexan 5 Minuten auf dem Schüttler extrahiert, die organische Phase wurde abgenommen und ein Aliquot der wässrigen Phase injiziert.

9.4.6 Extraktion von Honigproben

Flüssigextraktion mit Acetonitril

1 g Honig wurden in ein 15 ml- Zentrifugenröhrchen eingewogen und in 1 ml Oxalsäure (0,006 mol/l) vollständig gelöst. Die Dotierung mit 50 und 100 ng Tetracyclin erfolgte, indem 50µl einer Tetracyclinlösung (1µg/ml und 0,1µg/ml) zugegeben wurden. Die Probenlösung wurde mit 3,4 ml Acetonitril versetzt und 60 Minuten intensiv am Vortex-Schüttler bei höchster Drehzahl geschüttelt. Zur Phasentrennung wurde 4 min bei 2790 x g zentrifugiert. 2,75 ml der Acetonitrilphase wurde in ein 4 ml- Glasvial überführt und im Stickstoffstrom (0,25 bar) unter Erwärmen auf 40 °C zur Trockne eingeeengt. Die Extraktionsrückstände wurden in 500 µl Probenpuffer aufgenommen, indem 60 sec auf dem Vortex geschüttelt und anschließend die Vials 15 min im Ultraschallbad behandelt wurden. Das Injektionsvolumen bei der SPR-Messung betrug 20 µl bei einer Flussrate von 5 µl/min.

SPE mit Oasis[®] HLB- Kartuschen (modifiziert nach Pena et al. [135])

1 g Honig wurde mit 50 µl Dotierungslösung einer entsprechenden Tetracyclin-Konzentration dotiert und 20 Minuten auf dem Flachbettschüttler geschüttelt, die

Proben zur Erstellung einer Kalibrierkurve wurden erst später dotiert. Die Honigeinwaage wurde in 9 ml McIlvaine-Puffer gelöst. Die SPE-Kartuschen wurden vor dem Aufbringen der Proben mit 3 ml Methanol und anschließend 2 ml Reinstwasser konditioniert. Es wurden 9 ml Probe aufgebracht, die ohne das Anlegen eines Vakuums durch die Kartusche liefen. Nach der Aufgabe der Proben wurde die Kartusche mit 2+3 ml 5%igem Methanol gewaschen. Durch Anlegen eines starken Vakuums für 2 Minuten wurden die Kartuschen getrocknet, die Metallspitzen der Vakuumeinheit wurden anschließend gesäubert. Die Elution von Tetracyclin erfolgte mit 3 ml Methanol unter leichtem Vakuum. Das Eluat wurde bei 40 °C im Stickstoffstrom zur Trockne eingengt. Vor der Extraktion dotierte Proben wurden in 500 µl Probenpuffer, Matrixproben zur Erstellung einer Kalibrierkurve wurden in 475 µl Probenpuffer aufgenommen und mit 25 µl Kalibrierlösung der geforderten Konzentration dotiert. Um die Extraktreste vollständig zu lösen, wurden die Vials 60 sec auf dem Vortex geschüttelt und anschließend 15 min im Ultraschallbad behandelt. Das Injektionsvolumen für die SPR-Messung betrug 20 µl bei einer Flussrate von 10 µl/min. Die SPE-Kartuschen wurden jeweils nur einmal verwendet.

SPE mit strata X-CW- Kartuschen nach Huq [156]

1 g Honig wurde in ein 15 ml –Zentrifugenröhrchen eingewogen mit 25 µl Tetracyclinlösung (1 µg/ml) dotiert. Die Einwaage wurde in 2 ml Acetatpuffer (0,1 mol/l pH 5,0 mit Eisessig eingestellt) gelöst. Die SPE-Kartuschen wurden mit 2 ml Methanol, gefolgt von 2 ml Reinstwasser, konditioniert. 3 ml Probenlösung wurden auf die Kartuschen aufgebracht. Nach der Probenaufgabe wurden die Kartuschen mit 2x2 ml Reinstwasser, anschließend mit 2x2 ml Methanol gewaschen. Das Trocknen der Kartuschen wurde durch Anlegen eines starken Vakuums erreicht, die nachfolgende Elution von Tetracyclin erfolgte mit 2 ml 2%iger Ameisensäure in Methanol (v/v). Mit den Eluaten wurde verfahren, wie im voran stehenden Absatz beschrieben.

9.4.7 Bestimmung der Entscheidungsgrenze für Tetracycline in Honig

Die Bestimmung der Entscheidungsgrenze (CC_a) erfolgte durch die Analyse von 20 verschiedenen Honigen nach der Entscheidung 2002/657/EG [210]; für die verwendeten Honige siehe Anhang. Die Honige wurden bei Raumtemperatur gelagert. Die Honige 2 - 21 und 22 – 41 wurden aufgearbeitet wie in 9.4.5 beschrieben und undotiert

gemessen. Die Kontaktdauer von Probe und Oberfläche betrug 6 Minuten bei einem Fluss von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Zur Berechnung von (CC_{α}) [$\mu\text{g}/\text{kg}$] wurde in Honig 1 eine Kalibrierkurve im Konzentrationsbereich von 0 bis 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aufgenommen. Die Berechnung der Entscheidungsgrenze erfolgt nach

$$CC_{\alpha} = \bar{x} - 3 \cdot s$$

wobei \bar{x} = Mittelwert der Honigmesswerte der Honige 2 - 21 und 22 - 41 und s die Standardabweichung dieser Werte beschreibt.

9.4.8 Herstellung einer Zuckerlösung (Honigimitat)

Für die Herstellung einer Zuckerlösung, deren Zuckerprofil dem von Honig entspricht, wurden folgende Bestandteile eingewogen:

Tabelle 9-5: Zusammensetzung von "Honigimitat"

Substanz	Einwaage [g]	Anteil [%]
Glucosemonohydrat	3,2076	32,4
Fructose	4,0578	41,0
Saccharose	0,1006	1,0
Maltosehydrat	0,7211	7,3
Reinstwasser	1,8000	18,2

Die Zucker wurden unter leichtem Erwärmen im Wasserbad komplett gelöst.

9.4.9 Messung der Lagerstabilität der Reagenzien

Sensorchips

Eine Flusszelle der zu lagernden Sensorchips wurde wie in 9.4.1 beschrieben immobilisiert, anschließend die maximale Repressorbindung bestimmt und eine Kalibrierkurve mit Tetracyclinlösungen aufgezeichnet. Nach der Lagerung unter definierten Bedingungen (Dauer, Temperatur) wurden die Messungen wiederholt und die Werte der Messungen verglichen.

Die Bestimmung der maximalen Repressorbindung erfolgte nach folgendem Schema:

Tabelle 9-6: Injektionsfolgen für die Bestimmung der maximalen Repressorbindung auf Sensorchips

Anzahl der Injektionsfolgen	Injektion von	Injektionsvolumen [μl]	Flussrate [$\mu\text{l}/\text{min}$]
2	SDS 0,2% in Laufpuffer	5	20
	Probenpuffer	10	10
2	SDS 0,2% in Laufpuffer	5	20
	Probenpuffer	20	20
	TetR 1 μM in Laufpuffer	10	10
1	SDS 0,2% in Laufpuffer	5	20
	Probenpuffer	20	20

Die ersten zwei Injektionen dienen zur Konditionierung des Sensorchips, da hierbei zur Lagerung auf den Chip aufgebracht TetR abgelöst wird. Es folgen zwei Injektionsfolgen mit Probenpuffer zum Konditionieren des Flusssystems und dann die Injektion des Repressors mit anschließender Regeneration der Chipoberfläche. Aliquots (1 μM) von Repressor in Laufpuffer wurden am Tag der Herstellung des ersten Chips eingefroren und für die Bestimmung der maximalen Repressorbindung verwendet.

Für die Aufzeichnung der Kalibrierkurven wurde eine Tetracyclin-Stammlösung (1 mg/ml) in Probenpuffer hergestellt und auf die Konzentrationen 10, 50, 100 und 200 ng/ml verdünnt, Probenpuffer wurde als Blindwert gemessen. Die Injektionsfolge für jeden Messzyklus lautete:

Tabelle 9-7: Injektionsfolge von Messzyklen zur Aufzeichnung von Kalibrierkurven für die Ermittlung der Chipstabilität

Injektion von	Injektionsvolumen [μl]	Flussrate [$\mu\text{l}/\text{min}$]
TetR in Laufpuffer	5	10
Tetracyclinlösung (Probe)	5	10
SDS 0,2% in Laufpuffer	5	20
Probenpuffer	20	20

Vor der Messreihe wurde das Flusssystem durch eine Injektionsfolge mit Probenpuffer anstelle von Tetracyclinlösung konditioniert.

Einen Überblick über die Lagerdauer und -temperaturen gibt die folgende Tabelle:

Tabelle 9-8: Lagerdauer und -temperatur zur Ermittlung der Lagerstabilität der Sensorchips, jeder Buchstabe kennzeichnet jeweils einen Chip, Tag 0 beschreibt den Tag, an dem die Chips mit tetO immobilisiert wurden, die angegebenen Wochen die Lagerzeit.

Temperatur [°C]	Tag 0	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5
-20	A – E	A	B	C	D	E
4-8	F	F	F	F	F	F
4-8	G					G
25	H - I	H	I			
37	J – K	J	K			

TetR

Für die Lagerstudien wurde TetR mit Laufpuffer auf eine Konzentration von 5 µmol/l in Lagerpuffer verdünnt (200 ml Laufpuffer + 0,195 g NaN₃ + 0,5 g BSA) und über Spritzenfilter 0,2 µm in Braunglasvials filtriert. Lagerung und Messungen der Aliquots erfolgten nach folgendem Schema:

Tabelle 9-9: Lagertemperaturen und -dauer für die Stabilitätsstudien am Tet-Repressor

Temperatur [°C]	Tag 0	Woche 1	Woche 3	Woche 6
4-8		X	X	X
25	X		X	X
37		X	X	

Aus jedem Aliquot wurden am Tag der Messung 3x 110 µl entnommen und mit 440 µl Laufpuffer verdünnt. Die Herstellung einer tetracyclinhaltigen Positivkontrolle erfolgte durch Verdünnung einer 1 mg/ml Tetracyclin-Stammlösung auf 12,5 ng/ml in Probenpuffer, als Negativkontrolle wurde undotierter Probenpuffer verwendet. Das Injektionsschema entsprach dem in Tabelle 9-7 dargestellten. Die Messungen wurden auf jeweils am Messtag frisch mit tetO belegten Flusszellen durchgeführt.

Tetracyclin-Lösungen

In der Messung wurde die Lagerstabilität von Stammlösungen und Arbeitslösungen verglichen. Die Tetracyclin-Stammlösung hatte eine Konzentration von 1 mg/ml, für die Arbeitslösungen wurde die Stammlösung mit Probenpuffer auf 10,50,100 und 200 ng/l verdünnt. Alle Lösungen wurden vor dem aliquotieren über Spritzenfilter 0,2µm filtriert und in Braunglasvials gelagert.

Tabelle 9-10: Übersicht über Lagerdauer und Lagertemperatur der Tetracyclinlösungen, mit X sind Lagerbedingungen markiert, nach denen die Tetracyclinlösungen gemessen wurden

Temperatur [°C]	Tag 0	Woche 1	Woche 3	Woche 6
-20		X	X	X
4-8		X	X	X
25	X	X	X	X
37		X	X	X

Die Messungen erfolgten auf einer am Messtag frisch mit *tetO* belegten Flusszelle. Die Arbeitslösungen wurden direkt zur Messung eingesetzt, die gelagerten Stammlösungen auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt, Probenpuffer wurde als weiterer Kalibrierpunkt gemessen. Die so hergestellten Lösungen wurden gegen am Messtag frisch hergestellte Tetracyclinlösungen gemessen. Die Injektionsfolge in den Messzyklen ist in Tabelle 9-7 wiedergegeben.

9.4.10 Herstellung von Pufferlösungen verschiedener Ionenstärke

Die Ionenstärke des Probenpuffers beträgt 0,185 M NaCl; Ionenstärken bis 0,5 M wurden durch Zusatz von Natriumchlorid, Magnesiumsulfat oder Ammoniumacetat zum Probenpuffer eingestellt. In allen verwendeten Puffern lagen 0,15 M NaCl sowie 5 mM MgSO₄ (für die Bindung von TetR notwendig) vor, dies wurde bei der Angabe der Ionenstärke der Pufferlösungen berücksichtigt. Bei der Einwaage der Salze wurde berücksichtigt, dass für Magnesiumsulfat als zweiwertiges Ion zwischen Konzentration und Ionenstärke folgender Zusammenhang besteht:

$$I(MgSO_4) = \frac{1}{2} \cdot (z^2(Mg^{2+}) \cdot c(Mg^{2+}) + z^2(SO_4^{2-}) \cdot c(SO_4^{2-}))$$

9.4.11 Messung von Doxycyclinderivaten in Lösung

Zur Bestimmung der Bindefähigkeit von Doxycyclinderivaten an den Tet-Repressor wurden die Doxycyclinderivate als Proben im SPR-System mit *tetO*/TetR injiziert und gegen eine Doxycyclinlösung als Referenz gemessen. Es wurden Stammlösungen von Doxycyclin und den Derivaten in der Konzentration 1 mg/ml in Probenpuffer hergestellt, die für die Messung auf Konzentrationen von 10 bis 100 ng/ml verdünnt wurden, der Nullwert wurde durch Injektion von Probenpuffer erhalten. Das Injektionsvolumen von TetR und Probe betrug 5 µl bei einem Fluss von 10 µl/min. Die Lagerung der Stammlösungen und der Verdünnungen der Derivatlösungen für die Untersuchung der Stabilität erfolgte unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur.

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

S	Standardabweichung
\bar{x}	Mittelwert
ADI	acceptable daily intake (duldbare Tagesdosis)
AK	Antikörper
APCI	atmospheric pressure chemical ionisation
ATC	Anhydrotetracyclin
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CC _α	Entscheidungsgrenze
CC _β	Nachweisvermögen
CE	Kapillarelektrophorese (capillary electrophoresis)
CMD	Carboxymethyldextran
CMTEG	carboxymethyliertes Tetraethylenglycol
CTC	Chlortetracyclin
Da	Dalton
DAD	Dioden-Array-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DIB	Deutscher Imkerbund
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOX	Doxycyclin
EDC	Ethylldiaminopropylcarbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ESI	electrospray ionisation
EU	Europäische Union
FAB	fast atom bombardement
FAO	Food and Agriculture Organisation
FDA	Food and Drug Administration (USA)

Fc	flow cell (Flusszelle)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBS-P	HEPES gepufferte Kochsalzlösung mit Surfactant P 20
HDPE	high density polyethylene
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horse radish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IB ₅₀	Tetracyclin-Konzentration bei 50 %iger TetR-Ablösung
IFC	integrated μ -fluidic cartridge
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JECFA	Joint Expert Committee on Food Additives
LED	light emitting diode
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
LOD	limit of detection (Nachweisgrenze)
LD ₅₀	letale Dosis (bezogen auf 50% der Population)
Min	Minute
MRL	maximum residue limit
MS	Massenspektrometrie
MWCO	molecular weight cut off
NADH	Nicotin-Adenin-Dinucleotid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen
OTC	Oxytetracyclin
OVA	Ovalbumin
Psi	pound per square inch
PB	particle beam
PES	Polyethersulfon
PVDF	Polyvinylidenfluorid

RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RP	reversed phase
Rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RTC	Rolitetracyclin
RU	response units
SDS	sodium dodecylsulfate
SDS PAGE	SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese
s	Sekunde
SPE	solid phase extraction
SPFIA	solid-phase fluorescent immunoassay
SPR	surface plasmon resonance (Oberflächenplasmonresonanz)
TC	Tetracyclin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tet(M)	ribosomales Schutzprotein
<i>tetO</i>	Gensequenz des Tetracyclin-Operators
TetR	Tetracyclin-Repressor-Protein
TLC	thin layer chromatography
TMB	Tetramethylbenzidin
v	Volumen
w	Wasser
WHO	World Health Organisation

11 LITERATUR

1. Möller, N., E. Müller-Seitz, O. Scholz, W. Hillen, A.A. Bergwerff, and M. Petz, *A new strategy for the analysis of tetracycline residues in foodstuffs by a surface plasmon resonance biosensor*. Eur Food Res Technol, 2007. 224(3): p. 285-292.
2. Michalova, E., P. Novotna, and J. Schlegelova, *Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them*. Vet Med - Czech, 2004. 29(3): p. 79-100.
3. FEDESA, Dtsch Tierärztebl, 1998. 11: p. 1093.
4. Schwarz, S. and C. Werckenthin, *Risiken des Antibiotika-Einsatzes in Veterinärmedizin und landwirtschaftlicher Tierproduktion*. Chemotherapie Journal, 2001. 10(6/2001): p. 197 - 202.
5. Duggar, B.M., *Aureomycin: A product of the continuing search for new antibiotics*. Ann NY Acad Sci, 1948. 51: p. 177-181.
6. Duggar, B.M., *Aureomycin and preparation of the same*. 1949.
7. Finlay, A.C. and J.H. Kane, *Terramycin and its production*. 1950.
8. Hochstein, F., C. Stephens, L. Conover, P. Regna, R. Pasternack, K. Brunings, and R. Woodward, *The structure of Terramycin*. J Am Chem Soc, 1953. 75: p. 5455-5475.
9. Stephens, C., L. Conover, R. Pasternack, F. Hochstein, W. Moreland, P. Regna, and F. Pilgrim, *The structure of Aureomycin*. J Am Chem Soc, 1954. 75: p. 3568-3575.
10. Conover, L., W. Moreland, A. English, C. Stephens, and F. Pilgrim, *Terramycin XI Tetracycline*. J Am Chem Soc, 1953. 75: p. 462.
11. Nelson, M., W. Hillen, and R.A. Greenwald, *Tetracyclines in biology, chemistry and medicine*. 2001, Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser Verlag.
12. Conover, L.H., K. Butler, J.D. Johnston, and J.J. Korst, *The total Synthesis of 6-Demethyl-6-Deoxytetracycline*. Journal of the American Chemical Society, 1962. 84: p. 3322 - 3324.
13. Muxfeldt, H. and W. Rogalski, *Tetracyclines. V. A Total Synthesis Of 6-Deoxy-6-Demethyltetracycline*. J Am Chem Soc, 1965. 87: p. 933-4.
14. Dürckheimer, W., *Tetracyclines: chemistry, biochemistry, and structure-activity relations*. Angew Chem Int Ed Engl, 1975. 14(11): p. 721-34.
15. Agwuh, K.N. and A. MacGowan, *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines*. J Antimicrob Chemother, 2006. 58(2): p. 256-65.
16. Sum, P.E., F.W. Sum, and S.J. Projan, *Recent developments in tetracycline antibiotics*. Current Pharmaceutical Design, 1998. 4(2): p. 119-132.
17. Chopra, I., *New developments in tetracycline antibiotics: glycylicyclines and tetracycline efflux pump inhibitors*. Drug Resist Updat, 2002. 5(3-4): p. 119-25.
18. Sum, P.-E. and P. Petersen, *Synthesis and structure-relationship of novel glycylicycline derivatives leading to the discovery of GAR-936*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1999. 9: p. 1459-1462.

19. *Drug Approval Report Tygacil*. 2005, Food and Drug Administration.
20. Mitscher, L.A., A.C. Bonacci, and T.D. Sokoloski, *Circular dichroism and solution conformation of the tetracycline antibiotics*. *Tetrahedron Lett*, 1968. 51: p. 5361-4.
21. Doerschuk, A.P., B.A. Bitler, and J.R.D. McCormick, *Reversible isomerizations in the tetracycline family*. *Journal of the American Chemical Society*, 1955. 77: p. 4687.
22. Remmers, E.G., G.M. Sieger, and A.P. Doerschuk, *some observations on the kinetics of the C4-epimerization of tetracycline*. *J Pharm Sci*, 1963. 52: p. 752-6.
23. Mitscher, L.A., *The Chemistry of the Tetracycline Antibiotics*, in *Medicinal Research*, G.L. Ed.: Grunewald, Editor. 1978, Marcel Dekker Inc.: New York.
24. Hussar, D.A., P.J. Niebergall, E.T. Sugita, and J.T. Doluisio, *Aspects of the epimerization of certain tetracycline derivatives*. *J Pharm Pharmacol*, 1968. 20(7): p. 539-46.
25. Yuen, P.H. and T.D. Sokoloski, *Kinetics of concomitant degradation of Tetracycline to Epitetracycline, Anhydrotetracycline and Epianhydrotetracycline in acid Phosphate solution*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1977. 66: p. 1648 - 1650.
26. Oliva, B., G. Gordon, P. McNicholas, G. Ellestad, and I. Chopra, *Evidence that tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome cause lysis of Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992. 36(5): p. 913-9.
27. Jin, L., X. Amaya-Mazo, M.E. Apel, S.S. Sankisa, E. Johnson, M.A. Zbyszynska, and A. Han, *Ca²⁺ and Mg²⁺ bind tetracycline with distinct stoichiometries and linked deprotonation*. *Biophys Chem*, 2007. 128(2-3): p. 185-96.
28. Schneider, S., M.O. Schmitt, G. Brehm, M. Reiher, P. Matousek, and M. Towrie, *Fluorescence kinetics of aqueous solutions of tetracycline and its complexes with Mg²⁺ and Ca²⁺*. *Photochem Photobiol Sci*, 2003. 2(11): p. 1107-1117.
29. Duarte, H.A., S. Carvalho, E.B. Paniago, and A.M. Simas, *Importance of tautomers in the chemical behavior of tetracyclines*. *J Pharm Sci*, 1999. 88(1): p. 111-20.
30. Qiang, Z.M. and C. Adams, *Potentiometric determination of acid dissociation constants (pK(a)) for human and veterinary antibiotics*. *Water Res*, 2004. 38(12): p. 2874-2890.
31. Nelson, M.L., M.Y. Ismail, L. McIntyre, B. Bhatia, P. Viski, P. Hawkins, G. Rennie, D. Andorsky, D. Messersmith, K. Stapleton, J. Dumornay, P. Sheahan, A.K. Verma, T. Warchol, and S.B. Levy, *Versatile and facile synthesis of diverse semisynthetic tetracycline derivatives via Pd-catalyzed reactions*. *J Org Chem*, 2003. 68(15): p. 5838-51.
32. Sum, P.-E., V.J. Lee, and F.P. Tally, *Synthesis of novel tetracycline derivatives with substitution at the C-8 position*. *Tetrahedron Lett*, 1994. 35(12): p. 1835 - 1836.
33. Koza, D.J., *Synthesis of 7-substituted tetracycline derivatives*. *Org Lett*, 2000. 2(6): p. 815-7.

34. Koza, D.J. and Y.A. Nsiah, *Synthesis and biological evaluation of 9-substituted tetracycline derivatives*. Bioorg Med Chem Lett, 2002. 12(16): p. 2163-5.
35. Koza, D.J., *The synthesis of 8-substituted tetracycline derivatives, the first 8-position carbon-carbon bond*. Tetrahedron Lett, 2000. 41: p. 5017 - 5020.
36. Zhang, Y., S. Lu, W. Liu, C. Zhao, and R. Xi, *Preparation of anti-tetracycline antibodies and development of an indirect heterologous competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracycline in milk*. J Agric Food Chem, 2007. 55(2): p. 211-8.
37. Pastor-Navarro, N., S. Morais, A. Maquieira, and R. Puchades, *Synthesis of haptens and development of a sensitive immunoassay for tetracycline residues. Application to honey samples*. Anal Chim Acta, 2007. 594(2): p. 211-8.
38. Usai, I., *Synthesis of Novel Bioactive Doxycycline Derivatives*. Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, 2008
39. Yamaguchi, A., H. Ohmori, M. Kaneko-Ohdera, T. Nomura, and T. Sawai, *Delta pH-dependent accumulation of tetracycline in Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 1991. 35(1): p. 53-6.
40. Lindley, E.V., G.R. Munske, and J.A. Magnuson, *Kinetic analysis of tetracycline accumulation by Streptococcus faecalis*. J Bacteriol, 1984. 158(1): p. 334-6.
41. McMurry, L. and S.B. Levy, *Two transport systems for tetracycline in sensitive Escherichia coli: critical role for an initial rapid uptake system insensitive to energy inhibitors*. Antimicrob Agents Chemother, 1978. 14(2): p. 201-9.
42. Chopra, I. and S.J. Eccles, *Diffusion of tetracycline across the outer membrane of Escherichia coli K-12: involvement of protein Ia*. Biochem Biophys Res Commun, 1978. 83(2): p. 550-7.
43. Schnappinger, D. and W. Hillen, *Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms*. Arch Microbiol, 1996. 165(6): p. 359-69.
44. Nikaido, H. and D.G. Thanassi, *Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples*. Antimicrob Agents Chemother, 1993. 37(7): p. 1393-9.
45. Chopra, I., P.M. Hawkey, and M. Hinton, *Tetracyclines, molecular and clinical aspects*. J Antimicrob Chemother, 1992. 29(3): p. 245-77.
46. Pioletti, M., F. Schlünzen, J. Harms, R. Zarivach, M. Glühman, H. Avila, A. Bashan, H. Bartels, T. Auerbach, C. Jacolbi, T. Hartsch, A. Yonath, and F. Franceschi, *Crystal structure of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine, IF3*. EMBO J, 2001. 20(8): p. 1829-39.
47. Kolesnikov, I.V., N.Y. Protasova, and A.T. Gudkov, *Tetracyclines induce changes in accessibility of ribosomal proteins to proteases*. Biochimie, 1996. 78(10): p. 868-73.
48. Strel'tsov, S.A., M.K. Kukhanova, G.V. Gurskii, A.A. Kraevskii, I.V. Beliavskaia, L.S. Viktorova, A.D. Treboganov, and B.P. Gottikh, *Binding of hydroxytetracycline to E. coli ribosomes*. Mol Biol, 1975. 9: p. 729-738.

49. Brodersen, D.E., W.M.J. Clemons, A.P. Carter, R.J. Morgan-Warren, B.T. Wimberly, and V. Ramakrishnan, *The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit*. Cell, 2000. 103: p. 1143-1154.
50. Auerbach, T., A. Bashan, J. Harms, F. Schluenzen, R. Zarivach, H. Bartels, I. Agmon, M. Kessler, M. Pioletti, F. Franceschi, and A. Yonath, *Antibiotics targeting ribosomes: crystallographic studies*. Curr Drug Targets Infect Disord, 2002. 2(2): p. 169-86.
51. Roberts, M.C., *Tetracycline therapy: update*. Clin Infect Dis, 2003. 36(4): p. 462-7.
52. Chopra, I. and M. Roberts, *Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance*. Microbiol Mol Biol Rev, 2001. 65(2): p. 232-260.
53. AHI, *Trends in sales of Livesaving Animal Medicines Continue*. 2006.
54. Evans, J.D., *Diverse origins of tetracycline resistance in honey bees bacterial pathogen Paenibacillus larvae*. Journal of Invertebrate Pathology, 2003. 83: p. 46 - 50.
55. Martel, A.C., S. Zeggane, P. Drajnudel, J.P. Faucon, and M. Aubert, *Tetracycline residues in honey after hive treatment*. Food Addit Contam, 2006. 23(3): p. 265-73.
56. *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. 1996.*
57. *Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung ABl. L 268: 29-43. 2003.*
58. JECFA, *Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. 1998.
59. *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)*.
60. Dietz, D.D., K.M. Abdo, J.K. Haseman, S.L. Eustis, and J.E. Huff, *Comparative toxicity and carcinogenicity studies of tetracycline and oxytetracycline in rats and mice*. Fundam Appl Toxicol, 1991. 17(2): p. 335-46.
61. Akiba, T., K. Koyama, Y. Ishiki, S. Kimura, and T. Fukushima, *On the mechanism of the development of multiple-drug-resistant clones of Shigella*. Jpn J Microbiol, 1960. 4: p. 219-27.
62. Lima, A.A., N.L. Lima, M.C. Pinho, E.A. Barros Junior, M.J. Teixeira, M.C. Martins, and R.L. Guerrant, *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, 1995. 39(1): p. 256-9.

63. Goldstein, F.W., M.D. Kitzis, and J.F. Acar, *N,N*-dimethylglycyl-amido derivative of minocycline and 6-demethyl-6-desoxytetracycline, two new glycyclines highly effective against tetracycline-resistant gram-positive cocci. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994. 38(9): p. 2218-20.
64. Roberts, M.C., *Update on acquired tetracycline resistance genes*. *FEMS Microbiol Lett*, 2005. 245(2): p. 195-203.
65. Yamaguchi, A., Y. Iwasakiohba, N. Ono, M. Kanekoohdera, and T. Sawai, *Stoichiometry of metal-tetracycline/H⁺ antiport mediated by transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein in Escherichia coli*. *Febs Letters*, 1991. 282(2): p. 415-418.
66. Eckert, B. and C.F. Beck, *Overproduction of transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein results in cell-death and loss of membrane-potential*. *J Bacteriol*, 1989. 171(6): p. 3557-3559.
67. Saenger, W., P. Orth, C. Kisker, W. Hillen, and W. Hinrichs, *The tetracycline repressor - a paradigm for a biological switch*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2000. 39(12): p. 2042-2052.
68. Teo, J.W., T.M. Tan, and C.L. Poh, *Genetic determinants of tetracycline resistance in Vibrio harveyi*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002. 46(4): p. 1038-45.
69. Schwarz, S., M. Cardoso, and H.C. Wegener, *Nucleotide sequence and phylogeny of the tet(L) tetracycline resistance determinant encoded by plasmid pSTE1 from Staphylococcus hyicus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992. 36(3): p. 580-8.
70. Wang, Y., E.R. Rotman, N.B. Shoemaker, and A.A. Salyers, *Translational control of tetracycline resistance and conjugation in the Bacteroides conjugative transposon CTnDOT*. *J Bacteriol*, 2005. 187(8): p. 2673-80.
71. Hoshino, T., T. Ikeda, N. Tomizuka, and K. Furukawa, *Nucleotide sequence of the tetracycline resistance gene of pTHT15, a thermophilic Bacillus plasmid: comparison with staphylococcal TcR controls*. *Gene*, 1985. 37(1-3): p. 131-8.
72. Connell, S.R., D.M. Tracz, K.H. Nierhaus, and D.E. Taylor, *Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003. 47(12): p. 3675-81.
73. Zakeri, B. and G.D. Wright, *Chemical biology of tetracycline antibiotics*. *Biochem Cell Biol*, 2008. 86(2): p. 124-36.
74. Moore, I.F., D.W. Hughes, and G.D. Wright, *Tigecycline is modified by the flavin-dependent monooxygenase TetX*. *Biochemistry*, 2005. 44(35): p. 11829-35.
75. Yang, W., I.F. Moore, K.P. Koteva, D.C. Bareich, D.W. Hughes, and G.D. Wright, *TetX is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics*. *J Biol Chem*, 2004. 279(50): p. 52346-52.
76. Ross, J.I., E.A. Eady, J.H. Cove, and W.J. Cunliffe, *16S rRNA mutation associated with tetracycline resistance in a gram-positive bacterium*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998. 42(7): p. 1702-5.

77. Levy, S.B., L. McMurry, T.M. Barbosa, V. Burdett, P. Courvalin, W. Hillen, M.C. Roberts, J.I. Rood, and D.E. Taylor, *Nomenclature for new tetracycline resistance determinants*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999. 43(6): p. 1523 - 1524.
78. Schubert, P., D. Schnappinger, K. Pfeleiderer, and W. Hillen, *Identification of a stability determinant on the edge of the Tet repressor four-helix bundle dimerization motif*. *Biochemistry*, 2001. 40(11): p. 3257-63.
79. Orth, P., *Der Regulationsmechanismus des Tetrazyklin-Repressors*. Dissertation, Fachbereich Chemie Freie Universität Berlin, 1998
80. Hinrichs, W., C. Kisker, M. Duvel, A. Muller, K. Tovar, W. Hillen, and W. Saenger, *Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance*. *Science*, 1994. 264(5157): p. 418-20.
81. Orth, P., D. Schnappinger, P.E. Sum, G.A. Ellestad, W. Hillen, W. Saenger, and W. Hinrichs, *Crystal structure of the tet repressor in complex with a novel tetracycline, 9-(N,N-dimethylglycylamido)- 6-demethyl-6-deoxy-tetracycline*. *J Mol Biol*, 1999. 285(2): p. 455-61.
82. Scholz, O., M. Köstner, M. Reich, S. Gastiger, and W. Hillen, *Teaching TetR to recognize a new inducer*. *J Mol Biol*, 2003. 329(2): p. 217-27.
83. Orth, P., D. Schnappinger, W. Hillen, W. Saenger, and W. Hinrichs, *Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system*. *Nat Struct Biol*, 2000. 7(3): p. 215-9.
84. Kamionka, A., J. Bogdanska-Urbaniak, O. Scholz, and W. Hillen, *Two mutations in the tetracycline repressor change the inducer anhydrotetracycline to a corepressor*. *Nucleic Acids Res*, 2004. 32(2): p. 842-7.
85. Scholz, O., P. Schubert, M. Kintrop, and W. Hillen, *Tet repressor induction without Mg²⁺*. *Biochemistry*, 2000. 39(35): p. 10914-20.
86. Takahashi, M., L. Altschmied, and W. Hillen, *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*, 1986. 187(3): p. 341-8.
87. Ettner, N., J.W. Metzger, T. Lederer, J.D. Hulmes, C. Kisker, W. Hinrichs, G.A. Ellestad, and W. Hillen, *Proximity mapping of the Tet repressor-tetracycline-Fe²⁺ complex by hydrogen peroxide mediated protein cleavage*. *Biochemistry*, 1995. 34(1): p. 22-31.
88. Orth, P., F. Cordes, D. Schnappinger, W. Hillen, W. Saenger, and W. Hinrichs, *Conformational changes of the Tet repressor induced by tetracycline trapping*. *J Mol Biol*, 1998. 279(2): p. 439-47.
89. *Council Regulation (EEC) No 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, Official Journal L 224, P. 1-8. 1990.*
90. *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. 1998.*

91. *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. 1990.
92. *Gesetz zur Neuordnung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts (LFBG) in der Fassung vom 1.09.2005 (BGBl I. S. 2618)*. 2005.
93. *FDA Database for Approved Animal Drug Products, relating to US Code of Federal Regulations, 21 CFR, April 1 2006*. <http://dil.vetmed.vt.edu/>.
94. *Establishment of Applicable Laws and Ordinances in Response to the Implementation of Paragraph 3, Article 11, Which Has Been Newly Added to the Food Sanitation Law, Based on the Law to Partially Amend the Food Sanitation Law (Director Notice Syoku-An No. 1129001, 2005)*. <http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/positivelist060228/dl/index-1b.pdf>, Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare.
95. *Codex Alimentarius Commission of the FAO/WHO Maximum residue limits for veterinary drugs in food*. 2006. p. CAC/MRL pp 1 - 31.
96. *Produktinformation Premi-Test, DSM Premi-Test, Heerlen, Niederlande*, www.dsm.com/en_US/html/premitest/home.htm.
97. Cantwell, H. and M. O'keeffe, *Evaluation of the Premi Test and Comparison with the One-plate-test for the detection of antimicrobials in kidney*. Food Addit Contam, 2006. 23(2): p. 120 - 125.
98. *Produktinformation Delvotest, DSM Food Specialities, Delft, Niederlande*, http://www.dsm.com/le/de_DE/delvotest/html/home.htm.
99. *Produktinformation Cowside test, Charm Sciences Inc., Lawrence, Massachusetts, USA*, <http://www.charm.com/images/stories/pdf/Cowside.pdf>.
100. *Produktinformation CMT - Copan Milk Test, Copan Italia, Brescia, Italien*, <http://www.copanswabs.com/products/cmt/>.
101. *Produktinformation BR-Test AS Brilliant, DSM Food Specialities, Delft, Niederlande*, www.dsm.com/en_US/html/dfs/dairy-products-tests.htm.
102. *Produktinformation BRT-Hemmstofftestsysteme, Analytik in Milch, Produktions- und Vertriebs-GmbH, München, Deutschland*, www.aim-bayern.de/deutsch/produkte/index.htm.
103. *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: Berlin*.
104. Nouws, J., H. van Egmond, I. Smulders, G. Loeffen, J. Schouten, and H. Stegeman, *A microbiological assay system for assessment of raw milk exceeding EU maximum residue levels*. Int Dairy J, 1999. 9(2): p. 85-90.
105. Nouws, J.F., G. Loeffen, J. Schouten, H. van Egmond, H. Keukens, and H. Stegeman, *Testing of raw milk for tetracycline residues*. J Dairy Sci, 1998. 81(9): p. 2341-5.
106. Nouws, J.F.M., G. Loeffen, J. Schouten, H. van Egmond, H. Keukens, and H. Stegeman, *Improvement of the tube diffusion test with respect to detection of antibiotic residues and sulphonamides in raw milk*. Arch Lebensm hyg, 1995. 46: p. 140-141.

107. Meyer, M.T., J.E. Bumgarner, J.L. Varns, J.V. Daughtridge, E.M. Thurman, and K.A. Hostetler, *Use of radioimmunoassay as a screen for antibiotics in confined animal feeding operations and confirmation by liquid chromatography/mass spectrometry*. *Sci Total Environ*, 2000. 248(2-3): p. 181-7.
108. Kim, S., H.S. Chung, J.Y. Ha, W.C. Jung, S.H. Heo, and H.J. Lee, *Application of a solid-phase fluorescence immunoassay to determine oxytetracycline and tetracycline residues in tissues of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)*. *J vet med Sci*, 2006. 68(11): p. 1243 - 1245.
109. Lang, B., E. Märtlbauer, and G. Terplan, *Ein enzymimmunologischer Nachweis von Tetracyclinen in Milch*. *Arch Lebensm hyg*, 1992. 43: p. 77-80.
110. Märtlbauer, E., *Enzymimmunotests für antimikrobiell wirksame Stoffe*. 1993, Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag.
111. *Produktinformation Ridascreen Tetracyclin, r-biopharm AG, Darmstadt, Deutschland*, http://www.r-biopharm.com/product_site.php.
112. Jeon, M., J. Kim, K.-J. Paeng, S.-W. Park, and I.R. Paeng, *Biotin-avidin mediated competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracyclines in milk*. *Microchemical Journal*, 2008. 88: p. 26-31.
113. Bartel, B. and M. Maczan, *Milchwirtschaftliche Mikrobiologie*, ed. I. Riemelt. 2003, Hamburg: Behr's Verlag.
114. *Produktinformation Charm II, Charm sciences inc., Lawrence, Massachusetts, USA*, <http://www.charm.com/content/view/144/364/lang,en/>.
115. Charm, S.E. and R. Chi, *Microbial receptor assay for rapid detection and identification of 7 families of antimicrobial drugs in milk - collaborative study*. *J Assoc Off Anal Chem*, 1988. 71(2): p. 304-316.
116. Reybroeck, W., S. Ooghe, H. De Brabander, and E. Daeseleire, *Validation of the tetrasensor honey test kit for the screening of tetracyclines in honey*. *J Agric Food Chem*, 2007. 55(21): p. 8359-66.
117. Okerman, L., S. Croubels, M. Cherlet, K. De Wasch, P. De Backer, and J. Van Hoof, *Evaluation and establishing the performance of different screening tests for tetracycline residues in animal tissues*. *Food Addit Contam*, 2004. 21(2): p. 145-153.
118. Link, N., W. Weber, and M. Fussenegger, *A novel generic dipstick-based technology for rapid and precise detection of tetracycline, streptogramin and macrolide antibiotics in food samples*. *J Biotechnol*, 2007. 128(3): p. 668-80.
119. Weber, C.C., N. Link, C. Fux, A.H. Zisch, W. Weber, and M. Fussenegger, *Broad-spectrum protein biosensors for class-specific detection of antibiotics*. *Biotechnol Bioeng*, 2005. 89(1): p. 9-17.
120. Ding, X. and S. Mou, *Ion chromatographic analysis of tetracyclines using polymeric column and acidic eluent*. *J Chromatogr A*, 2000. 897(1-2): p. 205-14.
121. Casado-Terrones, S., A. Segura-Carretero, S. Busi, G. Dinelli, and A. Fernandez-Gutierrez, *Determination of tetracycline residues in honey by CZE with ultraviolet absorbance detection*. *Electrophoresis*, 2007. 28(16): p. 2882-7.
122. Kowalski, P., *Capillary electrophoretic method for the simultaneous determination of tetracycline residues in fish samples*. *J Pharm Biomed Anal*, 2008. 47(3): p. 487-93.

123. Wang, S., P. Yang, and Y. Cheng, *Analysis of tetracycline residues in bovine milk by CE-MS with field-amplified sample stacking*. *Electrophoresis*, 2007. 28(22): p. 4173-9.
124. Halvatzis, S.A., M.M. Timotheou-Potamia, and A.C. Calokerinos, *Continuous-flow chemiluminometric determination of tetracyclines in pharmaceutical preparations and honey by oxidation with N-bromosuccinimide*. *Analyst*, 1993. 118(6): p. 633-7.
125. Xiong, Y., H. Zhou, Z. Zhang, D. He, and C. He, *Molecularly imprinted on-line solid-phase extraction combined with flow-injection chemiluminescence for the determination of tetracycline*. *Analyst*, 2006. 131(7): p. 829-34.
126. Yang, M., Y. Xu, and J.H. Wang, *Lab-on-valve system integrating a chemiluminescent entity and in situ generation of nascent bromine as oxidant for chemiluminescent determination of tetracycline*. *Anal Chem*, 2006. 78(16): p. 5900-5.
127. Pena, A., L.P. Palilis, C.M. Lino, I.M. Silveira, and A.C. Calokerinos, *Determination of tetracycline and its major degradation products by chemiluminescence*. *Analytica Chimica Acta*, 2000. 405: p. 51 - 56.
128. Samanidou, V.F., K.I. Nikolaidou, and I.N. Papadoyannis, *Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of tetracycline antibiotics residues in bovine muscle according to the European Union regulation 2002/657/EC*. *J Sep Sci*, 2005. 28(17): p. 2247-58.
129. Sokol, J. and E. Matisova, *Determination of tetracycline antibiotics in animal tissues of food-producing animals by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction*. *J Chromatogr A*, 1994. 669(1-2): p. 75-80.
130. Cinquina, A.L., F. Longo, G. Anastasi, L. Giannetti, and R. Cozzani, *Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle*. *J Chromatogr A*, 2003. 987(1-2): p. 227-33.
131. Furusawa, N., *Sample preparation followed by HPLC under harmless 100% aqueous conditions for determination of oxytetracycline in milk and eggs*. *J Sep Sci*, 2004. 27(7-8): p. 552-6.
132. Furusawa, N., *Simplified Liquid-Chromatographic Determination of Residues of Tetracycline Antibiotics in Eggs*. *Chromatographia*, 2001. 53(1/2): p. 47-50.
133. Posyniak, A., K. Mitrowska, J. Zmudzki, and J. Niedzielska, *Analytical procedure for the determination of chlortetracycline and 4-epi-chlortetracycline in pig kidneys*. *J Chromatogr A*, 2005. 1088(1-2): p. 169-74.
134. Croubels, S., H. Vermeersch, P. De Backer, M.D. Santos, J.P. Remon, and C. Van Peteghem, *Liquid chromatographic separation of doxycycline and 4-epidoxycycline in a tissue depletion study of doxycycline in turkeys*. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1998. 708(1-2): p. 145-52.
135. Pena, A., N. Pelantova, C.M. Lino, M.I. Silveira, and P. Solich, *Validation of an analytical methodology for determination of oxytetracycline and tetracycline residues in honey by HPLC with fluorescence detection*. *J Agric Food Chem*, 2005. 53(10): p. 3784-8.

136. Schneider, M.J., S.E. Braden, I. Reyes-Herrera, and D.J. Donoghue, *Simultaneous determination of fluoroquinolones and tetracyclines in chicken muscle using HPLC with fluorescence detection*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. 846(1-2): p. 8-13.
137. Schneider, M.J., A.M. Darwish, and D.W. Freeman, *Simultaneous multiresidue determination of tetracyclines and fluoroquinolones in catfish muscle using high performance liquid chromatography with fluorescence detection*. Anal Chim Acta, 2007. 586(1-2): p. 269-74.
138. Pena, A., A. Carmona, A. Barbosa, C. Lino, I. Silveira, and B. Castillo, *Determination of tetracycline and its major degradation products by liquid chromatography with fluorescence detection*. J Pharm Biomed Anal, 1998. 18(4-5): p. 839-45.
139. Heller, D.N., C.B. Nocketto, N.G. Rummel, and M.H. Thomas, *Development of multiclass methods for drug residues in eggs: hydrophilic solid-phase extraction cleanup and liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of tetracycline, fluoroquinolone, sulfonamide, and beta-lactam residues*. J Agric Food Chem, 2006. 54(15): p. 5267-78.
140. Khong, S.P., Y.A. Hammel, and P.A. Guy, *Analysis of tetracyclines in honey by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005. 19(4): p. 493-502.
141. Bogialli, S., R. Curini, A. Di Corcia, A. Lagana, and G. Rizzuti, *A rapid confirmatory method for analyzing tetracycline antibiotics in bovine, swine, and poultry muscle tissues: matrix solid-phase dispersion with heated water as extractant followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Agric Food Chem, 2006. 54(5): p. 1564-70.
142. Cherlet, M., P. De Backer, and S. Croubels, *Control of the keto-enol tautomerism of chlortetracycline for its straightforward quantitation in pig tissues by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2006. 1133(1-2): p. 135-41.
143. Pena, A., C.M. Lino, R. Alonso, and D. Barcelo, *Determination of tetracycline antibiotic residues in edible swine tissues by liquid chromatography with spectrofluorometric detection and confirmation by mass spectrometry*. J Agric Food Chem, 2007. 55(13): p. 4973-9.
144. De Ruyck, H. and H. De Ridder, *Determination of tetracycline antibiotics in cow's milk by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007. 21(9): p. 1511-20.
145. Lopez, M.I., J.S. Pettis, I.B. Smith, and P.S. Chu, *Multiclass determination and confirmation of antibiotic residues in honey using LC-MS/MS*. J Agric Food Chem, 2008. 56(5): p. 1553-9.
146. Debayle, D., G. Dessalces, and M.F. Grenier-Loustalot, *Multi-residue analysis of traces of pesticides and antibiotics in honey by HPLC-MS-MS*. Anal Bioanal Chem, 2008. 391(3): p. 1011-20.
147. Xu, J.Z., T. Ding, B. Wu, W.Q. Yang, X.Y. Zhang, Y. Liu, C.Y. Shen, and Y. Jiang, *Analysis of tetracycline residues in royal jelly by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008. 868(1-2): p. 42-8.

148. Carrasco-Pancorbo, A., S. Casado-Terrones, A. Segura-Carretero, and A. Fernandez-Gutierrez, *Reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to ultraviolet and electrospray time-of-flight mass spectrometry on-line detection for the separation of eight tetracyclines in honey samples*. J Chromatogr A, 2008. 1195(1-2): p. 107-16.
149. Kaufmann, A., P. Butcher, K. Maden, and M. Widmer, *Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub-2 μ m particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2008. 1194: p. 66-79.
150. Anderson, C.R., H.S. Rupp, and W.H. Wu, *Complexities in tetracycline analysis - chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography*. J Chromatogr A, 2005. 1075(1-2): p. 23-32.
151. Oka, H., Y. Ito, and H. Matsumoto, *Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods*. J Chromatogr A, 2000. 882(1-2): p. 109-33.
152. Kujawski, M.W. and J. Namiesnik, *Challenges in preparing honey samples for chromatographic determination of contaminants and trace residues*. Trends in Analytical Chemistry, 2008.
153. Oka, H., Y. Ikai, N. Kawamura, K. Uno, M. Yamada, K. Harada, M. Uchiyama, H. Asukabe, Y. Mori, and M. Suzuki, *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, 1987. 389(2): p. 417-26.
154. Oka, H., Y. Ikai, N. Kawamura, K. Uno, M. Yamada, K. Harada, and M. Suzuki, *Improvement of chemical analysis of antibiotics. XII. Simultaneous analysis of seven tetracyclines in honey*. J Chromatogr, 1987. 400: p. 253-61.
155. Oka, H., Y. Ikai, J. Hayakawa, K. Harada, H. Asukabe, M. Suzuki, R. Himei, M. Horie, H. Nakazawa, and J.D. MacNeil, *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, 1994. 42(10): p. 2215-2219.
156. Huq, S., M. Garriques, and K.M. Kallury, *Role of zwitterionic structures in the solid-phase extraction based method development for clean up of tetracycline and oxytetracycline from honey*. J Chromatogr A, 2006. 1135(1): p. 12-8.
157. *BVL (Hrsg), Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB 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.*
158. Nakazawa, H., S. Ino, K. Kato, T. Watanabe, Y. Ito, and H. Oka, *Simultaneous determination of residual tetracyclines in foods by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B, 1999. 732(1): p. 55-64.
159. Cacciatore, G. and M. Petz, *Optische Biosensoren, die neuen Augen der Rückstandsanalytiker*. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 2005. 101(11): p. 501-508.

160. Baeumner, A.J., *Biosensors for environmental pollutants and food contaminants*. Anal Bioanal Chem, 2003. 377(3): p. 434-45.
161. Nakamura, H. and I. Karube, *Current research activity in biosensors*. Anal Bioanal Chem, 2003. 377(3): p. 446-68.
162. Mello, L.D. and L.T. Kubota, *Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries*. Food Chem, 2002. 77(2): p. 237-256.
163. Kurittu, J., S. Lonnberg, M. Virta, and M. Karp, *A group-specific microbiological test for the detection of tetracycline residues in raw milk*. J Agric Food Chem, 2000. 48(8): p. 3372-7.
164. Pellinen, T., T. Huovinen, and M. Karp, *A cell-free biosensor for the detection of transcriptional inducers using firefly luciferase as a reporter*. Anal Biochem, 2004. 330(1): p. 52-7.
165. Hansen, L.H. and S.J. Sorensen, *Detection and quantification of tetracyclines by whole cell biosensors*. FEMS Microbiol Lett, 2000. 190(2): p. 273-8.
166. Bahl, M.I., L.H. Hansen, and S.J. Sorensen, *Construction of an extended range whole-cell tetracycline biosensor by use of the tet(M) resistance gene*. FEMS Microbiol Lett, 2005. 253(2): p. 201-5.
167. Indyk, H.E., B.S. Persson, M.C. Caselunghe, A. Moberg, E.L. Filonzi, and D.C. Woollard, *Determination of vitamin B12 in milk products and selected foods by optical biosensor protein-binding assay: method comparison*. J AOAC Int, 2002. 85(1): p. 72-81.
168. Indyk, H.E., E.A. Evans, M.C. Bostrom Caselunghe, B.S. Persson, P.M. Finglas, D.C. Woollard, and E.L. Filonzi, *Determination of biotin and folate in infant formula and milk by optical biosensor-based immunoassay*. J AOAC Int, 2000. 83(5): p. 1141-8.
169. Haughey, S.A., A.A. O'Kane, G.A. Baxter, A. Kalman, M.J. Trisconi, H.E. Indyk, and G.A. Watene, *Determination of pantothenic acid in foods by optical biosensor immunoassay*. J AOAC Int, 2005. 88(4): p. 1008-14.
170. Gillis, E.H., J.P. Gosling, J.M. Sreenan, and M. Kane, *Development and validation of a biosensor-based immunoassay for progesterone in bovine milk*. J Immunol Methods, 2002. 267(2): p. 131-8.
171. Daly, S.J., G.J. Keating, P.P. Dillon, B.M. Manning, R. O'Kennedy, H.A. Lee, and M.R. Morgan, *Development of surface plasmon resonance-based immunoassay for aflatoxin B(1)*. J Agric Food Chem, 2000. 48(11): p. 5097-104.
172. Tüdös, A.J., E.R. Lucas-van den Bos, and E.C. Stigter, *Rapid surface plasmon resonance-based inhibition assay of deoxynivalenol*. J Agric Food Chem, 2003. 51(20): p. 5843-8.
173. Waswa, J., J. Irudayaraj, and C. DebRoy, *Direct detection of E. Coli O157:H7 in selected food systems by a surface plasmon resonance biosensor*. LWT, 2007. 40: p. 187 - 192.
174. Bokken, G.C., R.J. Corbee, F. van Knapen, and A.A. Bergwerff, *Immunochemical detection of Salmonella group B, D and E using an optical surface plasmon resonance biosensor*. FEMS Microbiol Lett, 2003. 222(1): p. 75-82.

175. Haasnoot, W., K. Olieman, G. Cazemier, and R. Verheijen, *Direct biosensor immunoassays for the detection of nonmilk proteins in milk powder*. J Agric Food Chem, 2001. 49(11): p. 5201-6.
176. Ricci, F., G. Volpe, L. Micheli, and G. Palleschi, *A review of novel developments and applications of immunosensors in food analysis*. Analytica Chimica Acta, 2007. 605: p. 111 - 129.
177. Caldow, M., S.L. Stead, J. Day, M. Sharman, C. Situ, and C. Elliott, *Development and validation of an optical SPR biosensor assay for tylosin residues in honey*. J Agric Food Chem, 2005. 53(19): p. 7367-70.
178. Haasnoot, W., M. Bienenmann-Ploum, and F. Kohen, *Biosensor immunoassay for the detection of eight sulfonamides in chicken serum*. Analytica Chimica Acta, 2003. 483(1-2): p. 171-180.
179. Cacciatore, G., M. Petz, S. Rachid, R. Hakenbeck, and A.A. Bergwerff, *Development of an optical biosensor assay for detection of beta-lactam antibiotics in milk using the penicillin-binding protein 2x*. Anal Chim Acta, 2004. 520(1-2): p. 105-115.
180. Sternesjo, A. and E. Gustavsson, *Biosensor analysis of beta-lactams in milk using the carboxypeptidase activity of a bacterial penicillin binding protein*. J AOAC Int, 2006. 89(3): p. 832-7.
181. Haasnoot, W., E.E.M.G. Loomans, G. Cazemier, R. Dietrich, R. Verheijen, A.A. Bergwerff, and R.W. Stephany, *Direct versus competitive biosensor immunoassays for the detection of (dihydro)streptomycin residues in milk*. Food Agricultural Immunol, 2002. 14(1): p. 15-27.
182. Gaudin, V. and P. Maris, *Development of a biosensor-based immunoassay for screening of chloramphenicol residues in milk*. Food and Agricultural Immunology, 2001. 13(2): p. 77-86.
183. McCarney, B., I.M. Traynor, T.L. Fodey, S.R.H. Crooks, and C.T. Elliott, *Surface plasmon resonance biosensor screening of poultry liver and eggs for nicarbazin residues*. Analytica Chimica Acta, 2003. 483(1-2): p. 165-169.
184. Samsonova, J.V., G.A. Baxter, S.R. Crooks, and C.T. Elliott, *Biosensor immunoassay of ivermectin in bovine milk*. J AOAC Int, 2002. 85(4): p. 879-82.
185. Ferguson, J.P., G.A. Baxter, J.D. McEvoy, S. Stead, E. Rawlings, and M. Sharman, *Detection of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in milk, honey and meat samples using an optical biosensor*. Analyst, 2002. 127(7): p. 951-6.
186. Haughey, S.A. and G.A. Baxter, *Biosensor screening for veterinary drug residues in foodstuffs*. J AOAC Int, 2006. 89(3): p. 862-7.
187. Granier, B. and S. Lepage, *Method of in vitro diagnostics based on mechanisms of gene regulation and diagnostic reagent therefore*, in *de.espacenet.com*. 2001: Belgien. p. 1-15.
188. Möller, N., *Entwicklung eines optischen Biosensor-Assays mit Elementen aus der Resistenzforschung zum Screening auf Tetracyclin-Rückstände in Lebensmitteln*. Dissertation, Fachbereich C Lebensmittelchemie Bergische Universität Wuppertal, 2007

189. Homola, J., *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*. Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors, ed. O.S. Wolfbeis. Vol. 4. 2006: Berlin. 245.
190. Fägerstam, L.G., A. Frostell-Karlsson, R. Karlsson, B. Persson, and I. Rönnerberg, *Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis*. J Chromatogr, 1992. 597(1-2): p. 397-410.
191. Raether, H., *Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings*, in *Springer Tracts in Modern Physics*, G. Höhler, Editor. 1988, Springer-Verlag: Berlin.
192. Homola, J., S.S. Yee, and G. Gauglitz, *Surface plasmon resonance sensors: review*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1999. 54(1-2): p. 3-15.
193. Stenberg, E., B. Persson, H. Roos, and C. Urbaniczky, *Quantitative Determination of Surface Concentration of Protein with Surface Plasmon Resonance Using Radiolabelled Proteins*. Journal of Colloid and Interface Science, 1991. 143(2): p. 513-526.
194. Liedberg, B., C. Nylander, and I. Lundstrom, *Biosensing with surface plasmon resonance-how it all started*. Biosens Bioelectron, 1995. 10(8): p. i-ix.
195. Schasfoort, R.B.M. and A.J. Tudos, *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. 2008, Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
196. Fischer, T., M. Beyermann, and K.W. Koch, *Application of different surface plasmon resonance biosensor chips to monitor the interaction of the CaM-binding site of nitric oxide synthase I and calmodulin*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. 285(2): p. 463-9.
197. Löfas, S. and B. Johnsson, *A Novel Hydrogel Matrix on Gold Surfaces in Surface Plasmon Resonance Sensors for Fast and Efficient Covalent Immobilization of Ligands*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1990(21): p. 1526 - 1528.
198. Löfas, S. and A. McWhirter, *The Art of Immobilization for SPR-Biosensors*, in *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*, J. Homola, Editor. 2006, Springer Verlag. p. 117-151.
199. Gedig, Erk; Fa. XanTec, Münster (Westf.), *persönliche Mitteilung*
200. Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*. 1996: Academic Press.
201. Gedig, E.T., *Surface Chemistry in SPR Technology*, in *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, R.B.M. Schasfoort and A.J. Tudos, Editors. 2008. p. 173-220.
202. Davis, T.M. and W.D. Wilson, *Determination of the refractive index increments of small molecules for correction of surface plasmon resonance data*. Analytical Biochemistry, 2000. 284(2): p. 348-53.
203. Takahashi, M., J. Degenkolb, and W. Hillen, *Determination of the equilibrium association constant between Tet repressor and tetracycline at limiting Mg²⁺ concentrations: a generally applicable method for effector-depending high-affinity complexes*. anal Biochem, 1991. 199: p. 197-202.
204. Edwards, P.R., P.A. Lowe, and R.J. Leatherbarrow, *Ligand Loading at the Surface of an Optical Biosensor and its Effect upon the Kinetics of Protein-Protein Interactions*. Journal of Molecular Recognition, 1997. 10: p. 128 - 134.

205. Schuck, P., *Kinetics of ligand binding to receptor immobilized in a polymer matrix, as detected with an evanescent wave biosensor. I. A computer simulation of the influence of mass transport.* Biophys J, 1996. 70(3): p. 1230-49.
206. Witz, J., *Kinetic analysis of analyte binding by optical biosensors: hydrodynamic penetration of the analyte flow into the polymer matrix reduces the influence of mass transport.* Anal Biochem, 1999. 270(2): p. 201-6.
207. Andersson, K., M. Hamalainen, and M. Malmqvist, *Identification and optimization of regeneration conditions for affinity-based biosensor assays. A multivariate cocktail approach.* Anal Chem, 1999. 71(13): p. 2475-81.
208. Henssler, E.M., O. Scholz, S. Lochner, P. Gmeiner, and W. Hillen, *Structure-based design of Tet repressor to optimize a new inducer specificity.* Biochemistry, 2004. 43(29): p. 9512-8.
209. McGrath, Terry; Fa. Xenosense, Belfast, *persönliche Mitteilung*
210. *Entscheidung 2002/657/EG von der Kommission zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen vom 12.08.2002, ABI 221, S. 8. 2002.*
211. Ciarlone, A.E., B.W. Fry, and D.M. Ziemer, *Some Observations on the Adsorption of Tetracyclines to Glass and Plastic Labware.* Microchemical Journal, 1990. 42: p. 250 - 255.
212. Lederer, T., M. Kintrup, M. Takahashi, P.E. Sum, G.A. Ellestad, and W. Hillen, *Tetracycline analogs affecting binding to Tn10-encoded Tet repressor trigger the same mechanism of induction.* Biochemistry, 1996. 35(23): p. 7439-46.
213. Liang, Y., M.B. Denton, and R.B. Bates, *Stability studies of tetracycline in methanol solution.* J Chromatogr A, 1998. 827(1): p. 45-55.
214. Yang, N., X. Su, V. Tjong, and W. Knoll, *Evaluation of two- and three-dimensional streptavidin binding platforms for surface plasmon resonance spectroscopy studies of DNA hybridization and protein-DNA binding.* Biosens Bioelectron, 2007. 22(11): p. 2700-6.
215. Berthon, G., M. Brion, and L. Lambs, *Metal ion-tetracycline interactions in biological fluids. 2. Potentiometric study of magnesium complexes with tetracycline, oxytetracycline, doxycycline, and minocycline, and discussion of their possible influence on the bioavailability of these antibiotics in blood plasma.* J Inorg Biochem, 1983. 19(1): p. 1-18.
216. Schmitt, M.O. and S. Schneider, *Spectroscopic investigation of complexation between various tetracyclines and Mg²⁺ or Ca²⁺.* PhysChemComm, 2000. 3: p. 42-55.
217. Wessels, J.M., W.E. Ford, W. Szymczak, and S. Schneider, *The Complexation of Tetracycline and Anhydrotetracycline with Mg²⁺ and Ca²⁺: A Spectroscopic Study.* J Phys Chem B, 1998. 102: p. 9323-9331.
218. Sjolander, S. and U. Csaba, *Integrated fluid handling system for biomolecular interaction analysis.* Anal Chem, 1991. 63(20): p. 2338-2345.
219. Johnsson, L.B., Andrew G; Crooks, Steven R H; Brandon, David L; Elliot, Christopher T, *Reduction of Sample Matrix Effects - The Analysis of Benzimidazole Residues in Serum by Immunobiosensor.* Food and Agricultural Immunology, 2002. 14: p. 209-216.

220. Duisberg, H., *Honig und Kunsthonig*, in *Handbuch der Lebensmittelchemie*, J. Schormüller, Editor. 1967, Springer Verlag: Berlin.
221. Ellison, D., J. Hinton, S.J. Hubbard, and R.J. Beynon, *Limited proteolysis of native proteins: the interaction between avidin and proteinase K*. *Protein Sci*, 1995. 4(7): p. 1337-45.
222. Smith, M.R., McCaughey, W. F., *Identification of some trace lipids in honey*. *Journal of Food Science*, 1966. 31: p. 902.
223. Klaus-Peter Raezke, applica GmbH, Bremen, *persönliche Mitteilung in: Münstedt, Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben "Identifizierung und Bestimmung von Tetracyclinrückständen in Honig-Methodenentwicklung und Rückstandsstudien"*
224. Cherlet, M., M. Schelkens, S. Croubels, and P. De Backer, *Quantitative multi-residue analysis of tetracyclines and their 4-epimers in pig tissues by high-performance liquid chromatography combined with positive-ion electrospray ionization mass spectrometry*. *Analytica Chimica Acta*, 2003. 492(1-2): p. 199-213.
225. Koesukwiwat, U., S. Jayanta, and N. Leepipatpiboon, *Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in Bovine's milk*. *J Chromatogr A*, 2007. 1149(1): p. 102-11.
226. Oka, H., Y. Ikai, Y. Ito, J. Hayakawa, K. Harada, M. Suzuki, H. Odani, and K. Maeda, *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*, 1997. 693(2): p. 337-344.
227. Mulders, E.J. and D. Van De Lagemaat, *Determination of residues of tetracycline antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography*. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 1989. 7(12): p. 1829 - 1835.
228. Kapoulas, V.M., S.K. Mastronicolis, and D.S. Galanos, *Identification of the lipid components of honey*. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1977. 163(2): p. 96-9.
229. Verzegnassi, L., M.C. Savoy-Perroud, and R.H. Stadler, *Application of liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry to the detection of 10 sulfonamides in honey*. *J Chromatogr A*, 2002. 977(1): p. 77-87.
230. *Establishment of Applicable Laws and Ordinances in Response to the Implementation of Paragraph 3, Article 11, Which Has Been Newly Added to the Food Sanitation Law, Based on the Law to Partially Amend the Food Sanitation Law (Director Notice Syoku-An No. 1129001, 2005)*. 2005, Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare.
231. Shi, X., A. Wu, S. Zheng, R. Li, and D. Zhang, *Molecularly imprinted polymer microspheres for solid-phase extraction of chloramphenicol residues in foods*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007. 850(1-2): p. 24-30.
232. Chico, J., S. Meca, R. Companyo, M.D. Prat, and M. Granados, *Restricted access materials for sample clean-up in the analysis of trace levels of tetracyclines by liquid chromatography. Application to food and environmental analysis*. *J Chromatogr A*, 2008. 1181(1-2): p. 1-8.

233. Ettner, N., G. Müller, C. Berens, H. Backes, D. Schnappinger, T. Schreppel, K. Pfeleiderer, and W. Hillen, *Fast large-scale purification of tetracycline repressor variants from overproducing Escherichia coli strains*. J Chromatogr A, 1996. 742(1-2): p. 95-105.
234. Amann, E., J. Brosius, and M. Ptashne, *Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for regulated expression of cloned genes in Escherichia coli*. Gene, 1983. 25(2-3): p. 167-78.
235. Wetlaufer, D., *Ultraviolet spectra of proteins and amino acids*. Adv Protein Chem, 1962. 17: p. 303-390.
236. Johnsson, B., S. Lofas, and G. Lindquist, *Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors*. Anal Biochem, 1991. 198(2): p. 268-77.
237. Andersson, K., D. Areskoug, and E. Hardenborg, *Exploring buffer space for molecular interactions*. J Mol Recognit, 1999. 12(5): p. 310-5.

Internetadressen zuletzt geprüft am 22.12.2008

12 ANHANG

Tabelle 12-1: Übersicht der Honige zur Ermittlung der Entscheidungsgrenze 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, 6=freundlichst zur Verfügung gestellt von Dr. Eva Rademacher, freie Universität Berlin

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	1
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
10a	Waldhonig aus Süd/Mittelamerika und Mittelmeerraum, 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 Bargtheide	1

Num- mer	Honig, laut Deklaration	Her- kunft
13a	Sommerblüten mit Akazienhonig; Langnese Honig KG 22933 Bargteheide	1
14	Gebirgsblütenhonig, Imker–Auslese, Flotte Biene, Fa. Langnese Honig KG, 22933 Bargteheide	1
14a	Gebirgsblütenhonig, kalt geschleudert; Langnese Honig KG 22933 Bargteheide	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
17a	Sonnenblumen Honig (Extra feine Auslese), Immenhof Naturprodukte 81735 München	3
18	Bio Akazienhonig aus biologisch-ökologischer Imkerei, Honig-Wernet GmbH, 79183 Waldkirch, Schwarzwald	3
19a	Sommerblütenhonig	5
19	Orangenhonig aus Brasilien, Landhaus Jungbon, 28832 Achim	3
20a	Frühlingsblütenhonig	5
20	Waldhonig, Honig-Wernet GmbH, Schwarzwälder Abfüllbetrieb, Forstweg 1-3, 79183 Waldkirch	3
21	Zitronenhonig, Imkerei: Uwe Paletta, Auf den Pöthen 43, 42553 Velbert-Nevigés	3
22	Lindenhonig, Caaschwitz, Sachsen	6
23	Goldrutenhonig, Zossen, Brandenburg	6
24	Kornblumenhonig, Ruhland, Brandenburg	6
25	Buchweizenhonig, Sedlitz, Brandenburg	6
26	Balsaminenhonig, Löbnitz, Sachsen	6

Num- mer	Honig, laut Deklaration	Her- kunft
27	Rapshonig, Eisenberg, Thüringen	6
28	Robinienhonig, Vogeldorf, Brandenburg	6
29	Phaeceliahonig, Thüringen	6
30	Heidehonig, Lindow, Brandenburg	6
31	RotkleeHonig, Zwickau, Sachsen	6
32	Blütenhonig, Berlin	6
33	Weidenhonig, Altenberg, Sachsen	6
34	Lindenhonig, Berlin	6
35	Frühjahrsblüte, Hönow, Brandenburg	6
36	Sommerblüte, Hermsdorf, Thüringen	6
37	Rapshonig, Rägelin, Brandenburg	6
38	Wickenhonig, Landsberg, Sachsen-Anhalt	6
39	Sonnenblumenhonig, Thüringen	6
40	Götterbaumhonig, Leipzig, Sachsen	6
41	Sommertracht, Stendal, Sachsen-Anhalt	6