

**– Vom Antikörper zum Immunoassay –
Nachweis und Quantifizierung des
nichtsteroidalen Antirheumatikums Diclofenac
in relevanten Matrices**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Sabrina Rau
aus Tübingen

Tübingen
2015

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

16.07.2015

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Günter Gauglitz

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Udo Weimar

Meiner Familie

Danksagung

Ich freue mich sehr, an dieser Stelle all denen Danke sagen zu dürfen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz, herzlichst danken, der mir kompletten Freiraum bei der Wahl meines Dissertationsthemas und der Durchführung meiner Promotion gelassen hat. Vielen Dank Herr Gauglitz, dass Sie mir so viel Vertrauen und Geduld entgegen gebracht haben, hinter mir und meiner Arbeit standen - auch als sich über eine unendlich lange Zeit kein Antikörper in den Kaninchen bilden wollte - , immer bereit für Diskussionen waren und mich immer unterstützt haben. Ich weiß und wusste das stets sehr zu schätzen.

Ein großes Dankeschön gilt all meinen Projektpartnern bzw. all denen die mich auch ohne offizielles Projekt während meiner Promotion unterstützt haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Hubert Kalbacher und seiner Arbeitsgruppe bedanken, ohne die ich die biochemischen Arbeiten nicht hätte durchführen können. Vielen herzlichen Dank Hubert, dass ich jederzeit willkommen war, dich zu allen erdenklichen Themen um Rat bitten konnte und Du mich in deine Arbeitsgruppe aufgenommen hast, als ob ich ein Doktorand von Dir wäre. Andreas Maurer danke ich für sein offenes Ohr und seine enorme Hilfsbereitschaft, für seine Expertise in allen biochemischen Fragen und für viele gute Gespräche und natürlich für den Honig. Sarina Kühnlein danke ich für ihre Hilfe bei der Peptidsynthese, bei der Durchführung der ELISAs sowie für viele lustige Momente. Bushra Amin, Jutta Gamper-Tsigaras und Thorben Selig danke ich, dass sie mich so nett aufgenommen haben. Es war mir immer ein Fest, im „Himmelreich“ zu sein.

Herzlichst bedanken möchte ich mich auch bei PD Dr. Wolf von Tümping für die konstruktive und angenehme Zusammenarbeit. Ich habe mich sehr gefreut, durch die im Helmholtz Zentrum für Umweltforschung aufgenommenen LC-MS/MS Messungen meinen Biosensor validieren zu können. Vielen Dank, dass Sie mir hierzu die Möglichkeit gegeben haben. Herzlichen Dank an Norbert Scheibe, der diese neben seiner alltäglichen Arbeit aufgenommen hat, mir das Elbe-Flusswasser besorgte und immer für ein nettes Gespräch zu haben war.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Dr. Ronald Maul für die Synthese der Phase-II Metaboliten bedanken!

Für die gute Zusammenarbeit während des Projekts „Hybride GRIN-Resonatoren und plasmonisch strukturierte GRIN-Linsen als kompakte Sensoren zur Spektro-Mikroskopie von Einzelpartikeln“ der Baden-Württemberg Stiftung möchte ich allen Beteiligten danken, insbesondere Andreas Horrer und Michael Metzger.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Udo Weimar bedanken. Der kompletten „Weimar Group“ danke ich herzlichst für die tolle Aufnahme im VG. Es war mir immer eine Freude, ins VG zu kommen, und ich danke Euch allen für die vielen

schönen Momente wie die Weihnachtsfeiern, das Maultaschenkochen oder die Grillpartys. Besonderen Dank schulde ich Prof. Dr. Udo Weimar und Dr. Nicolae Barsan für ihre aufmunternden Worte, ihre Unterstützung und die vielen lustigen Momente, die mich immer zum Lachen gebracht haben. Vielen Dank auch an Ute Harbusch und Diana Strauß für den administrativen oder organisatorischen Support und vor allem für die eine oder andere Ablenkung von der Arbeit. Alexandru Oprea danke ich für das Suchen und Ausleihen vieler Werkzeuge, ohne die ich nicht an meiner Anlage hätte basteln können. Jens Kemmler, Thomas Heine, Andre Sackmann, Alexander Haensch und Dr. Sven Rank danke ich für die vielen kurzweiligen Gespräche und Aktionen während und außerhalb der Arbeit.

Prof. Dr. Carolin Huhn danke ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft und für ihr „Vorab-Korrekturlesen“ einiger Teile dieser Arbeit.

Meinen Kollegen und Freunden Patricia Weber, Lothar Leidner, Urs Hilbig, Dominik Furin und Dr. Nina Schweizer danke ich herzlichst für ihre andauernde Unterstützung und Freundschaft, die hilfreichen Diskussionen, die vielen lustigen Aktionen auf und außerhalb der Arbeit und die unzähligen kleinen Ablenkungen, die meinen Alltag bereichern haben. Lothar Leidner schulde ich außerdem viel Dank für die Ellipsometrie-Aufnahmen. Urs Hilbig möchte ich für die große Unterstützung bei Anlagenbasteleien danken. Julia Widmaier und Nina Schweizer danke ich für die AFM-Aufnahmen und ihr Engagement in der Arbeitsgruppe. Daniel Sydes und Dr. Martin Pattky danke ich für viele lustige Unternehmungen während und außerhalb der Arbeit. Wolfgang Leis danke ich für unzählige wissenschaftliche Diskussionen und viele bereichernde Gespräche.

Ich freue mich sehr, dass viele der hier namentlich Genannten im Laufe der Zeit nicht nur gute Arbeitskollegen sondern Freunde wurden und sind.

Meinen jetzigen Arbeitskollegen, insbesondere Anna, Uwe, Katrin, Walter, Andrea, Bernd und Michael sowie meinem Team danke ich für ihr Verständnis und ihre Unterstützung während des Schreibens meiner Dissertation.

Besonderer Dank gilt Julia Sindlinger und Lorenz Dietzsch für ihren Rückhalt, ihre unendliche Unterstützung und ihre unfassbare Freundschaft über all die Jahre.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, ohne die ich nicht wäre wer ich bin und ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre!! Euch möchte ich diese Arbeit widmen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Motivation	1
1.2	Zielsetzung.....	4
2	Theorie.....	7
2.1	Biochemische Grundlagen	7
2.1.1	Nichtsteroidale Antirheumatika	7
2.1.2	Zwischenmolekulare Wechselwirkungen	8
2.1.3	Proteine.....	9
2.1.4	Antikörper	16
2.1.5	Haptene.....	18
2.1.6	Antikörperaufreinigung	18
2.1.7	Biomolekulare Erkennung.....	19
2.2	Biomolekulare Interaktionsanalyse	22
2.2.1	Detektion an Grenzschichten	22
2.2.2	Diffusionskontrollierte Affinitätsreaktion in heterogener Phase	24
2.3	Optische Grundlagen	25
2.3.1	Brechungsindex	25
2.3.2	Reflexion und Brechung von Licht	26
2.3.3	Interferenz an dünnen Schichten	29
2.3.4	Reflektometrische Interferenzspektroskopie	30
3	Material und Methoden	31
3.1	Verbrauchsmaterialien	31
3.1.1	Chemikalien und Analyte.....	31
3.1.2	Aminosäuren und Proteine	32
3.1.3	Sonstige Verbrauchsmaterialien.....	33
3.1.4	Lösungen und Gele.....	35
3.2	Geräte	38
3.3	Synthesen.....	39
3.3.1	Synthese von Diclofenac aus Diclofenac-Natriumsalz	39
3.3.2	Synthese der Hapten-Protein Konjugate	39
3.3.3	Festphasenpeptidsynthese	40
3.4	Aufreinigungsmethoden.....	44
3.4.1	Affinitätschromatographie	44

3.4.2	Melon Gel IgG Spin Aufreinigung.....	46
3.5	Immunoassayformate	47
3.5.1	Allgemeines.....	47
3.5.2	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	47
3.5.3	Direkter Assay.....	50
3.5.4	Bindungshemmtest.....	51
3.6	Oberflächenmodifikation der RfS Transducer	53
3.6.1	Glas-Transducer	53
3.6.2	Gold-Transducer.....	54
3.7	Reflektometrische Interferenzspektroskopie	55
3.7.1	Messaufbau.....	55
3.7.2	Messsignal.....	56
3.7.3	Auswertung	57
3.8	Sonstiges	60
3.8.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	60
3.8.2	Silberfärbung.....	60
3.8.3	In-Gel-Verdau	61
3.8.4	Lyophilisation.....	62
3.8.5	Pufferaustausch bei Protein-Lösungen.....	62
3.9	Entnahme der Flusswasserproben	63
4	Ergebnisse	65
4.1	Herstellung des polyklonalen anti-Diclofenac Antikörpers.....	65
4.1.1	Synthese der Immunogene	65
4.1.2	Kontrolle der Antikörperbildung.....	70
4.2	Antikörperaufreinigung.....	81
4.2.1	Klassenspezifische Aufreinigung.....	82
4.2.2	Affinitätschromatographie	83
4.3	Immunoassayentwicklung und -optimierung in Puffer	95
4.3.1	Allgemeine Assaybedingungen.....	95
4.3.2	Regeneration der Sensoroberfläche.....	97
4.3.3	Reproduzierbarkeit und Spezifität des Bindungssignals.....	98
4.3.4	Kalibrierung und Validierung des Biosensors in Puffer	99
4.4	Quantifizierung von Diclofenac in der Probenmatrix Kuhmilch	103
4.4.1	Identifizierung Matrix-spezifischer Matrixeffekte.....	105
4.4.2	Identifizierung Assay-spezifischer Matrixeffekte	108

4.4.3	Kalibrierung und Validierung des Biosensors in Kuhmilch	111
4.5	Quantifizierung von Diclofenac in der Probenmatrix Oberflächenwasser.....	115
4.5.1	Kalibrierung und Validierung in ultrafiltriertem entsalztem Wasser.....	115
4.5.2	Untersuchung von Matrixeffekten am Beispiel von Huminsäuren	118
4.5.3	Flusswasserproben	121
4.5.4	Wiederfindungsraten in filtriertem und danach gespiktem Flusswasser.....	123
4.5.5	Untersuchung der Eignung verschiedener Filtermaterialien	129
4.5.6	Wiederfindungsraten in unfiltriertem gespiktem Flusswasser	132
4.5.7	Untersuchungen des Elbe-Flusswassers	134
4.6	Metabolite des Diclofenacs.....	137
4.7	Vergleich der anti-Diclofenac Antikörper.....	144
4.8	Transfer des Biosensors auf Gold-Transducer	146
4.8.1	Kontrolle des Schichtaufbaus	146
4.8.2	Kontrolle der Funktionalität und Stabilität der sensitiven Schicht	147
5	Zusammenfassung und Ausblick	153
6	Literatur	161
7	Anhang.....	173
7.1	Abkürzungsverzeichnis	173
7.2	Akademische Lehrer	176

1 Einleitung

1.1 Motivation

Die Analyse unerwünschter Substanzen in Lebensmitteln oder in der Umwelt hat in den letzten Jahren zunehmende Bedeutung erlangt. Polychlorierte Biphenyle, Pestizide, Hormone, Endokrine Disruptoren oder Schmerzmittel sind nur einige wenige Beispiele der vielen Schadstoffe, die in Lebensmitteln und in der Umwelt zu finden sind [Turrio-Baldassarri 1993, Morozova 2005, Tschmelak 2006, La Rocca 2006, Kozłowska-Tylingo 2010, Kudlak 2011]. Während Industriechemikalien oder Pestizide schon seit längerem als problematische Substanzen gelten, treten in den letzten Jahren auch vermehrt pharmakologisch aktive Substanzen in den Fokus der Öffentlichkeit.

Lebensmittel-liefernde Nutztiere werden sowohl zur Vorbeugung als auch zur Behandlung verschiedenster Krankheiten sowie zur schnelleren Aufzucht mit zahllosen Medikamenten behandelt. Jedes Jahr werden Hunderte Tonnen Antiparasitika, Antibiotika, Schmerzmittel, Corticoide, Hormone oder andere Tierarzneimittel in der Europäischen Union verbraucht [Kools 2008]. Demzufolge ist es potentiell möglich, dass Lebensmittel tierischen Ursprungs wie beispielsweise Milch, Honig, Fett, Leber oder Niere pharmakologisch aktive Substanzen oder deren Metabolite enthalten. Diese können eine unerwünschte Wirkung auf die Qualität des Produkts, oder sogar auf die Gesundheit des Endverbrauchers, d.h. des Menschen haben.

Um dies zu verhindern, hat die Europäische Union Rückstandshöchstmengen für einige Tierarzneimittel in verschiedensten Lebensmitteln tierischen Ursprungs festgelegt [Verordnung (EU) Nr. 37/2010]. Unter diesen finden sich auch mehrere nichtsteroidale Antirheumatika (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs). In der Tiermedizin sind sie zur Behandlung von Entzündungsvorgängen und deren Begleiterscheinungen sowie zur Behandlung einiger Atemwegserkrankungen in Kombination mit Antibiotika weit verbreitet [Booth 1999, Lockwood 2003]. Zudem werden sie Rindern verabreicht, um Eigenschaften des Fleisches wie Farbe oder Fettgehalt zu beeinflussen [Gallo 2008]. Leider wurden in den letzten Jahren zunehmend Rückstandshöchstmengenüberschreitungen bekannt, die die Gesundheit der Verbraucher potentiell gefährden können [Smith 2008]. Eine dauerhafte Exposition mit NSAIDs kann beim Menschen zu Gesundheitsschäden wie Magen-Darm Geschwüren, aplastischen Anämien, Herz-Kreislauf Erkrankungen, Störungen der Nierenfunktionen oder Hemmung der Blutplättchenaggregation führen [Goodman 1990, Roberts 2001, Conaghan 2012].

Da Tierärzte und Landwirte NSAIDs vor allem für Milchvieh verwenden, ist die Überwachung von Kuhmilch von besonderer Bedeutung [Sundlof 1995]. Um eine gute Milchqualität sicherzustellen, ist es unumgänglich, geeignete analytische Methoden zum Nachweis und zur Quantifizierung dieser Schadstoffe in Milch zu entwickeln.

Einleitung

Bisher wurden nur einige wenige analytische Methoden zur Quantifizierung von NSAIDs in Milch entwickelt. Die meisten basieren auf der Flüssig- oder Gaschromatographie in Kombination mit der Massenspektrometrie [Gallo 2008, Dowling 2008, Dowling 2010, Arroyo 2011, Azzouz 2011, Peng 2013]. Des Weiteren wurde die Kapillarelektrophorese in den letzten Jahren zunehmend eingesetzt [Patel 2004, Solangi 2009]. Diese Methoden sind zwar alle zur Multianalyt-Bestimmung unter Wahrung hoher Selektivität fähig, jedoch benötigen sie zeitaufwendige Probenvorbereitungsschritte, und nur wenige der in der Literatur beschriebenen Nachweismethoden können im Bereich der Rückstandshöchstmenge von Diclofenac quantitativ detektieren [Azzouz 2011, Gentili 2012, Jedziniak 2012]. Für Diclofenac wurde im Vergleich zu den anderen NSAIDs mit Abstand die geringste Rückstandshöchstmenge in Kuhmilch festgelegt: $0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ im Vergleich zu 15, 40, 50 und $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ für Meloxicam, 5-Hydroxyflunixin, Tolfenaminsäure und Metamizol.

Auch in der Umwelt und vor allem in Oberflächengewässern wurden in den letzten Jahren zunehmend pharmakologisch aktive Substanzen nachgewiesen [Kolpin 2002, Petrovic 2004, Kümmerer 2010]. Diese können potentiell schon in geringen Konzentrationen zu nachhaltigen Veränderungen in aquatischen Ökosystemen führen. Langzeitstudien zum Einfluss dieser Schadstoffe auf die Umwelt liegen bisher nur vereinzelt vor. Ein intensives Monitoring ist somit zwingend erforderlich [Swan 2006, Teng 2013]. Zu diesem Schluss kommt ebenfalls eine Literaturstudie, die 2011 vom Umweltbundesamt in Auftrag gegeben wurde. Die Studie ist eine aktuelle Bestandsaufnahme der in Deutschland und dem europäischen Ausland vorliegenden Monitoringdaten zum Vorkommen und Verhalten von Arzneimitteln in der Umwelt. Dabei wurden nicht nur gemessene Umweltkonzentrationen, sondern auch Ergebnisse ökotoxikologischer und physiko-chemischer Untersuchungen berücksichtigt. Unter den 24 Pharmazeutika, welche in dieser Studie als hoch prioritär eingestuft wurden, befindet sich auch das nichtsteroidale Antirheumatikum Diclofenac [Bergmann 2011]. Auch die Europäische Union hat im Jahr 2013 auf die Problematik der Existenz pharmakologisch aktiver Substanzen in Oberflächengewässern mit einer Änderung der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie reagiert: 17-beta-Östradiol, 17-alpha-Ethinylöstradiol und Diclofenac wurden als erste Arzneimittelstoffe in die Beobachtungsliste aufgenommen [Richtlinie 2013/39/EU].

Diclofenac wird in großen Mengen in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt, da es analgetisch, antiphlogistisch und antipyretisch wirkt [Ku 1975] und zudem preiswert herzustellen ist. Mittlerweile ist es deshalb in Spurenkonzentrationen in vielen Oberflächengewässern bis zu einer Konzentration von $1,2 \mu\text{g L}^{-1}$ nachweisbar [Ternes 1998, Vergeynst 2014]. So gelangt Diclofenac durch menschliche oder tierische Ausscheidungen oder unsachgemäße Entsorgung indirekt oder direkt in die Oberflächengewässer, da es auch bei der Abwasserreinigung in Kläranlagen oftmals nur unvollständig entfernt wird [Wiegel 2004]. Jedoch stehen der Wirkstoff und seine Metabolite unter Verdacht, Nierenschäden in Fischen hervorzurufen [Schwaiger 2004, Corcoran 2010]. Zur Einschätzung des ökotoxikologischen und humantoxikologischen Risikopotentials sind geeignete qualitative und quantitative Nachweisverfahren erforderlich, die auch in komplexen Matrices sensitive und selektive Messungen

erlauben und im Idealfall schnell und preiswert sind. Auch in der Matrix Oberflächenwasser basiert die Mehrzahl der bisherigen Nachweisverfahren auf der Flüssig- oder Gaschromatographie in Kombination mit der Massenspektrometrie [Buchberger 2007, Fatta-Kassinos 2011, Shin 2012].

Biosensoren haben sich in den letzten Jahren zu einer ernstzunehmenden Alternative sowohl in der Umwelt- als auch in der Lebensmittelanalytik entwickelt [Rodriguez-Mozaz 2006, Sharma 2013, Vidal 2013]. Ihre Vorteile gegenüber konventionellen analytischen Methoden liegen in ihrem Miniaturisierungspotential, ihrem geringen Reagenzienverbrauch und ihrer einfachen Handhabung. Zudem ist bei geeigneter Optimierung des Biosensors keine Probenvorbereitung von Nöten und es besteht die Möglichkeit, Vor-Ort Messungen durchzuführen. Dies ermöglicht signifikante Zeit- und Kostenersparnisse.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist jedoch nur ein Biosensor zur Überwachung von NSAIDs in der Matrix Kuhmilch beschrieben [Campanella 2009]. Hierbei wird die Effekt-basierte Wirkung von NSAIDs auf Cyclooxygenase ausgenutzt und elektrochemisch detektiert.

In der Matrix Oberflächenwasser ist bisher ein optischer Biosensor zum Nachweis und zur Quantifizierung von Diclofenac in der Literatur beschrieben [Deng 2003]. Dieser beruht auf einem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Durch die Verwendung einer Markierung kann die Sensitivität eines Immunoassays erhöht und die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen gesenkt werden. Jedoch bedeutet die Verwendung eines Markers auch immer einen erhöhten Zeit- und Arbeitsaufwand und ist zudem kostenintensiv.

Einleitung

1.2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, einen markierungsfreien optischen Biosensor zum Nachweis und zur Quantifizierung von Diclofenac in Lebensmitteln tierischen Ursprungs sowie in der Umwelt zu entwickeln und zu etablieren. Als Lebensmittel tierischen Ursprungs wird exemplarisch Kuhmilch, als Umweltmatrix exemplarisch Flusswasser ausgewählt.

Um den Biosensor von bereits etablierten Standardmethoden, welcher extensiver Probenvorbereitung bedürfen, abzugrenzen, wird ein besonderes Augenmerk auf die Vermeidung von Probenvorbereitungsschritten gelegt. Dies erlaubt nicht nur eine Zeit- und Kostenreduzierung und macht die Anwendbarkeit des Biosensors flexibel, sondern ermöglicht zudem zukünftig Vor-Ort Messungen.

Des Weiteren sollen möglichst niedrige Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erreicht werden, um im Bereich der Rückstandshöchstmenge in Kuhmilch bzw. im Bereich der relevanten Konzentrationen in Oberflächengewässern quantitative Messungen zu ermöglichen.

Die Selektivität sowie die Sensitivität immunoanalytischer Nachweismethoden werden insbesondere von der verwendeten Erkennungsstruktur beeinflusst. Im ersten Teil dieser Arbeit wird ein polyklonaler anti-Diclofenac Antikörper durch Immunisierung von Kaninchen selbst hergestellt. Zwar sind polyklonale anti-Diclofenac Antikörper kommerziell erhältlich, jedoch soll durch Verwendung des selbst synthetisierten anti-Diclofenac Antikörpers die Sensitivität des Immunoassays weiter gesteigert werden. Zusätzlich könnte durch eine Einheitlichkeit der Antikörper-Charge auf eine stetige Neukalibrierung des Sensors verzichtet und Zeit und Kosten gespart werden. Zur Herstellung des polyklonalen anti-Diclofenac Antikörpers werden verschiedene Immunogene synthetisiert und charakterisiert. Die Kontrolle der Antikörperbildung im Serum der Kaninchen erfolgt mittels indirektem ELISA. Hierzu werden verschiedene Coatingmaterialien hergestellt, auf ihre Eignung untersucht und miteinander verglichen.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Aufreinigung des anti-Diclofenac Antikörpers, welcher in Serum vorliegt. Es gibt viele verschiedene Aufreinigungsmethoden, die sich in ihrer Selektivität, Schnelligkeit und Effektivität unterscheiden. Hierbei gilt: Die Verwendung des Antikörpers definiert die Reinheit und somit auch welche Aufreinigungsmethoden sinnvoll und notwendig sind.

Sowohl eine Art „Klassen“-spezifische Aufreinigung als auch eine Affinitätschromatographie werden auf ihre Eignungs- und Leistungsfähigkeit im Hinblick auf den hier zu entwickelnden Immunosensor entwickelt, untersucht und verglichen. Hierbei werden vor allem für die entscheidenden Parameter der Affinitätschromatographie wie Säulenmaterial oder Elutionsmittel verschiedene Ansätze untersucht und eingehend evaluiert.

Der Immunoassay zum Nachweis und zur Quantifizierung von Diclofenac wird in Puffer entwickelt und etabliert. Eine Optimierung erfolgt insbesondere bezüglich hoher Sensitivität,

Selektivität, Stabilität und Reproduzierbarkeit. Als Detektionsmethode wird die markierungsfreie zeitaufgelöste Reflektometrische Interferenzspektroskopie verwendet, deren Vorteile in ihrer Temperaturunabhängigkeit und ihrem kostengünstigen instrumentellen Aufbau liegen. Vor allem für solche direkt optischen Detektionsmethoden stellen Matrixeffekte eine große Herausforderung dar. Dennoch ist es wünschenswert, direkt optisch zu arbeiten, da durch die Vermeidung von Markierungsschritten schneller und kostengünstiger gearbeitet werden kann. Zudem muss keine Beeinflussung der affinen Wechselwirkung durch die Markierung befürchtet werden.

Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich daher mit der Wahl des geeignetsten Assayformats, der Oberflächenmodifikation sowie den entsprechenden Assayparametern, um die oben beschriebenen Anforderungen optimal zu erfüllen und zu gewährleisten. Eine Kalibrierung und Validierung des Biosensors in Puffer soll hierbei erste Anhaltspunkte über mögliche Kennzahlen des Biosensors liefern.

Im vierten Teil dieser Arbeit wird Kuhmilch als Probenmatrix untersucht. Kuhmilch besteht aus einer Vielzahl von Inhaltsstoffen, welche potentiell Matrixeffekte verursachen können. Matrixeffekte sind definiert als Matrix-bedingte Abweichungen theoretisch vorhergesagter Werte auf Grund der Zusammensetzung der Probenmatrix [Oubiña 1997]. Da auf eine Reduzierung von Matrixeffekten durch Probenvorbereitung verzichtet werden soll, müssen andere Wege gefunden werden, diese möglichst zu umgehen oder zu minimieren. Um Matrix-spezifische Matrixeffekte von Assay-spezifischen zu differenzieren, werden Messungen an einem Modellsystem durchgeführt. Als Modellsystem wird Testosteron / anti-Testosteron Antikörper verwendet. Durch eine geeignete Auswerte- und Messstrategie sollen die identifizierten Matrix-spezifischen Matrixeffekte verhindert oder umgangen werden, sodass sie für den in dieser Arbeit entwickelten Diclofenac-Immunoassay keine Rolle mehr spielen. Assay-spezifische Matrixeffekte, die bei der Durchführung des Diclofenac-Immunoassays identifiziert werden, sollen durch Optimierung des Immunoassays soweit reduziert werden, dass Messungen direkt in Kuhmilch möglich sind. Die erhaltenen Kenngrößen der Kalibrierung werden mit denen etablierter Standardmethoden verglichen und die Leistungsfähigkeit des Biosensors bestimmt.

Flusswasser stellt ebenso wie Kuhmilch eine komplexe Probenmatrix dar. Um die Messroutine bezüglich physiologischer Bedingungen für den Antikörper anzupassen und um von Matrixeffekten unabhängig zu sein, wird im fünften Teil dieser Arbeit zunächst ultrafiltriertes entsalztes Wasser als Probenmatrix untersucht. Um die Güte des Immunosensors zu beurteilen, werden nicht nur Wiederfindungsraten bestimmt, sondern diese auch mit Vergleichsmessungen der etablierten LC-MS/MS, welche im Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung in Magdeburg durchgeführt wurden, validiert. Um die Toleranz des Immunosensors gegenüber Matrixeffekten aufzuzeigen werden Huminsäuren, welche normalerweise ein großes Interferenzpotential bieten, untersucht.

Einleitung

Anhand verschiedener matrixbelasteter Flusswasserproben soll zudem die Einsatzmöglichkeit des entwickelten Biosensors sowohl mit geringfügiger als auch ohne jegliche Probenvorbereitung aufgezeigt werden.

Der sechste Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Fragestellung, ob Metabolite des Diclofenacs mit dem entwickelten Biosensor nachweisbar sind. Hierfür werden sowohl Phase-I als auch Phase-II Metabolite untersucht und die erhaltenen Ergebnisse in Bezug auf die Modifizierung des Epitops des Diclofenacs und der Wechselwirkung mit dem Paratop des anti-Diclofenac Antiköpers näher beleuchtet.

Gold soll nanostrukturiert als Transducermaterial im Rahmen des Projekts „Hybride GRIN-Resonatoren und plasmonisch strukturierte GRIN-Linsen als kompakte Sensoren zur Spektro-Mikroskopie von Einzelpartikeln“ der Baden-Württemberg Stiftung sowohl in einem optischen Mikroresonator als auch in der Dunkelfeldspektroskopie, auf Grund der Sensitivitätssteigerung durch plasmonische Effekte, zum Einsatz kommen. Im siebten Teil dieser Arbeit wird der Aufbau einer sensitiven stabilen funktionalen Oberfläche auf Goldtransducer anhand des hier entwickelten Immunoassays demonstriert.

2 Theorie

2.1 Biochemische Grundlagen

2.1.1 Nichtsteroidale Antirheumatika

Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAIDs) gehören mit zu den am häufigsten eingesetzten Arzneimitteln weltweit [Laine 2001, Conaghan 2012]. Sie wirken analgetisch, antiphlogistisch und antipyretisch und werden daher für die Behandlung einer Vielzahl von Krankheiten eingesetzt. Trotz großer Strukturvariationen entfalten alle NSAIDs ihre Wirkung durch Hemmung der Prostaglandinbildung. Hierfür werden spezielle Enzyme, die Cyclooxygenasen, gehemmt und die Umsetzung von Arachidonsäure verhindert [Vane 1998].

Es existieren verschiedene Isoformen der Cyclooxygenase. Cyclooxygenase-1 (COX-1) wird konstitutiv exprimiert und kommt in allen Gewebetypen vor. Es katalysiert die Produktion von Prostaglandinen, welche an eine Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt sind wie beispielsweise der Regulation der Magensäureproduktion, der Erhaltung der Nierenfunktion oder durch die Produktion von Thromboxan A₂ für die Aggregation bei der Blutgerinnung [Simmons 2004, Blobaum 2007]. Die Cyclooxygenase-2 (COX-2) hingegen wird vor allem bei Entzündungen, Schmerzreaktionen oder Gewebeschädigungen vermehrt gebildet [Petrovic 2010]. Die schmerzlindernde, entzündungshemmende und fiebersenkende Wirkung der NSAIDs beruht im Wesentlichen auf der Hemmung der COX-2 Isoform.

NSAIDs können nach verschiedensten Kriterien wie ihrer COX-Selektivität oder ihren chemischen oder pharmakologischen Eigenschaften untergliedert werden [Conaghan 2012]. Charakteristisch für die meisten klassischen NSAIDs ist das Vorhandensein einer Säurefunktion bzw. einer sauren Gruppe sowie eines oder mehrerer heteroaromatischer Ringsysteme. Die saure Gruppe ist für die Bildung einer Ionenbindung mit einer spezifischen Stelle des COX-Enzyms verantwortlich [Dannhardt 2001].

Ein wesentlicher Nachteil der klassischen NSAIDs sind Nebenwirkungen, die vor allem das gastrointestinale sowie das kardiovaskuläre System betreffen und die bei chronischem Gebrauch auftreten.

2.1.1.1 Diclofenac

Diclofenac, ein klassisches NSAID, hemmt sowohl COX-1 als auch COX-2, hat aber auf Grund seiner chemischen Struktur (Abbildung 1) eine deutlich höhere Präferenz zu COX-2 [Dannhardt 2001]. Es ist neben Ibuprofen das am häufigsten eingesetzteste NSAID [IMS Health 2008].

Theorie

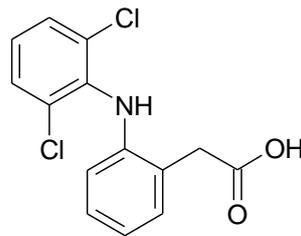


Abbildung 1: Diclofenac

Unter den gebräuchlichen NSAIDs hat Diclofenac mit eine der höchsten Wirkpotenzen: 25 Milligramm Diclofenac sind laut klinischer Studien genauso wirksam wie 400 Milligramm Ibuprofen oder 1000 Milligramm Acetylsalicylsäure [Moore 2007]. Zudem ist die Akkumulationsgefahr auf Grund der geringen Halbwertszeit von ein bis zwei Stunden gering. Typische Nebenwirkungen, vor allem bei Langzeiteinnahme, sind Magen- und Darmbeschwerden wie Geschwüre, Durchbrüche oder Blutungen, Erkrankungen der Niere sowie Störungen bei der Blutbildung oder Überempfindlichkeitsreaktionen.

2.1.2 Zwischenmolekulare Wechselwirkungen

Sowohl für die dreidimensionale Struktur eines Proteins (Abschnitt 2.1.3.3) als auch für die biomolekulare Wechselwirkung zwischen Analyt und Erkennungsstruktur (Abschnitt 2.1.7) sind eine Reihe von intra- bzw. intermolekulare Wechselwirkungskräfte verantwortlich. Diese sind in Tabelle 1 bezüglich ihrer Wechselwirkungsenergie und Abstandsabhängigkeit zusammengefasst:

Tabelle 1: physikochemische Wechselwirkungen (*D* = Donormolekül mit Wasserstoffatom; *A* = Akzeptormolekül mit freiem Elektronenpaar); typische Energie der Wechselwirkung in wässrigem Medium [Markovic 2008]

Wechselwirkung	typische Energie der Wechselwirkung [kJ/mol]	Abstandsabhängigkeit	besteht zwischen
Ionische WW	12-20	r^{-2}	Ionen
van-der-Waals WW	0,5-5	r^{-6}	Dipole; induzierte Dipole
H-Brückenbindung	10-30	r^{-6}	D-H---A
Hydrophobe WW	bis 40	keine direkte Abhängigkeit	Umgebungsmedium – hydrophobe Verbindung

2.1.3 Proteine

Proteine sind die häufigsten und vielfältigsten natürlichen Makromoleküle. Sie sind alle aus demselben ubiquitären Satz von 20 Aminosäuren aufgebaut. Alle proteinogenen Aminosäuren besitzen eine Carboxy- und eine Aminogruppe, die an dasselbe Kohlenstoffatom, welches auch α -Kohlenstoffatom genannt wird, gebunden sind (Abbildung 2).

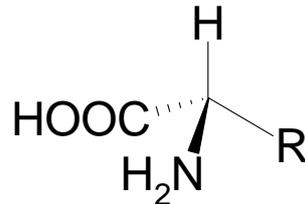


Abbildung 2: Grundstruktur einer α -Aminosäure

Sie unterscheiden sich voneinander durch ihre Seitenkette R, deren Struktur, Größe und elektrische Ladung variiert, und somit auch in ihrer Wasserlöslichkeit. Auf Grund der Eigenschaften dieser Seitenkette, insbesondere deren Polarität oder Tendenz, mit Wasser bei physiologischem pH-Wert zu reagieren, lassen sich die Aminosäuren in Klassen unterteilen (Abbildung 3).

Theorie

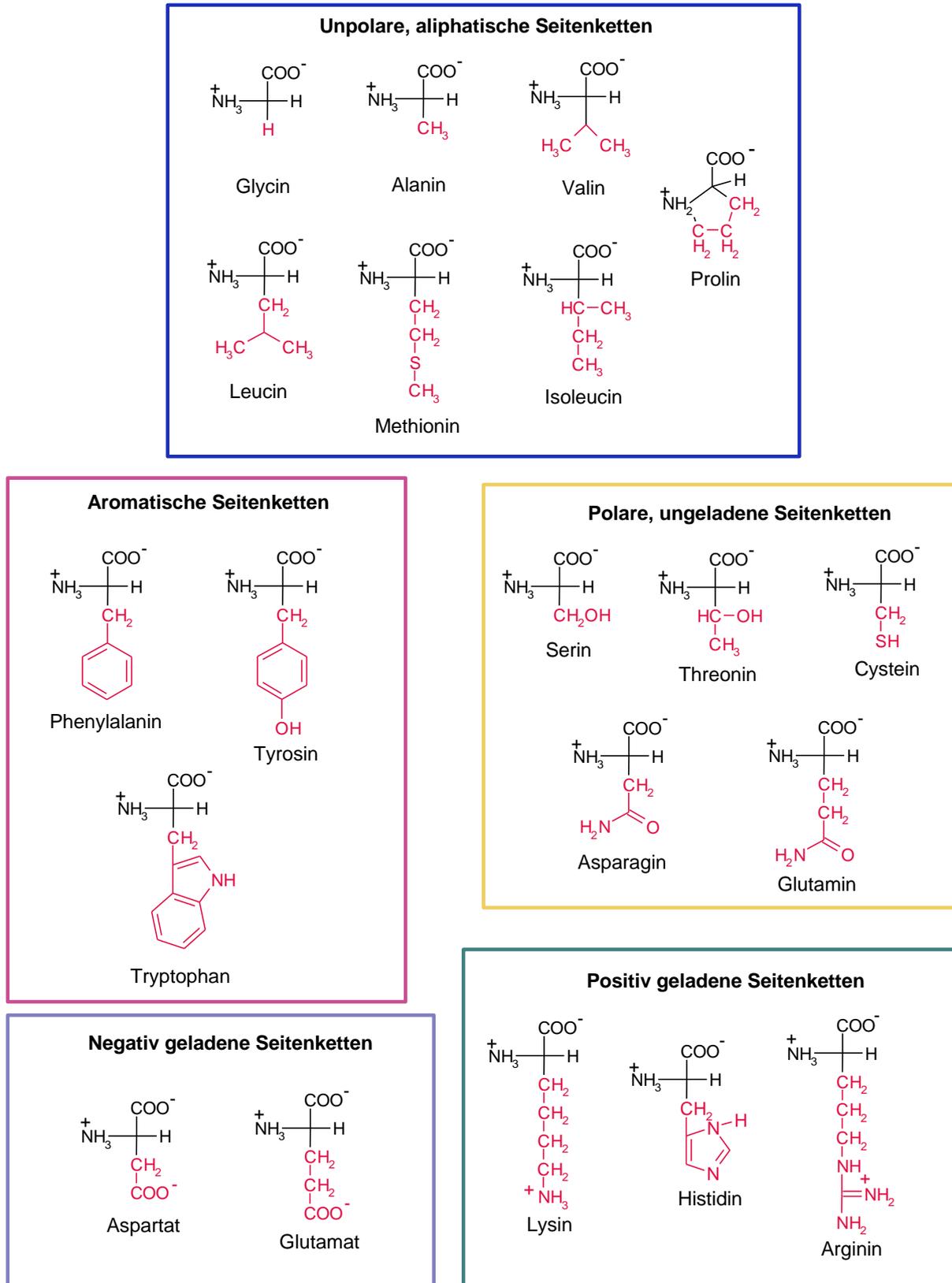


Abbildung 3: Unterteilung der 20 proteinogenen Aminosäuren in 5 Klassen. Die Strukturformel zeigt die Ionisierung, die bei einem pH von 7,0 vorherrscht.

Durch Kondensationsreaktionen können Aminosäuren zu einem Peptid verknüpft werden. Hierbei reagiert die α -Carboxygruppe der einen mit der α -Aminogruppe der jeweils anderen Aminosäure. Je nach Anzahl der verknüpften Aminosäuren werden solche Peptidketten als Oligopeptide (2-9 Aminosäuren), Polypeptide (10-100 Aminosäuren) oder Proteine (mehr wie 100 Aminosäuren) bezeichnet. Allerdings ist die Grenze zwischen Polypeptiden und Proteinen oft fließend.

2.1.3.1 Struktur eines Proteins

Die Funktionsweise eines Proteins wird durch dessen Struktur bestimmt. Diese ist in vier hierarchisch aufgebaute Ebenen gegliedert. Die unterste Strukturebene von Proteinen wird als Primärstruktur bezeichnet. Sie gibt die lineare Aminosäuresequenz eines Proteins wieder.

Die darüber gelegene Ebene, die Sekundärstruktur, beinhaltet regelmäßige Strukturen, die sich lokal in kleinen Bereichen des Proteins ausbilden. Diese werden durch die Konformation des Peptidrückgrats bestimmt und durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Die Seitenketten haben hier keinen Einfluss. Die bekanntesten Strukturelemente der Sekundärstruktur sind α -Helix und β -Faltblatt. Im Durchschnitt besteht die Struktur eines Proteins zu ca. 31 % aus α -Helices und zu ca. 28 % aus β -Faltblättern [Voet 2008].

Alle Sekundärstrukturen eines Proteins zusammen sowie die Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten der Aminosäuren beeinflussen die komplette dreidimensionale Struktur, die Tertiärstruktur. Die Stabilisierung der Tertiärstruktur wird vor allem durch nicht-kovalente Wechselwirkungen sichergestellt.

Die höchste Strukturebene bezeichnet man als Quartärstruktur. Diese kommt im Gegensatz zu den anderen Strukturebenen nicht bei allen Proteinen vor. Proteine besitzen nur dann eine Quartärstruktur, wenn sie aus mehreren Untereinheiten wie Polypeptidketten oder zusätzlichen Komponenten wie Mineralien, Lipiden oder Kohlenhydraten aufgebaut sind. Dominierende Wechselwirkungen sind hierbei vor allem Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals- sowie Coulomb-Kräfte [Branden 1999].

2.1.3.2 Globuläre Proteine

Allgemein kann zwischen globulären und fibrillären Proteinen unterschieden werden. Fibrilläre Proteine haben eine langgestreckte, faserförmige Gestalt und stellen meist Strukturproteine dar. Sie sind oft schlecht wasserlöslich. Typische Vertreter der fibrillären Proteine sind beispielsweise α - oder β -Keratin und Kollagen [Heinrich 2014]. Globuläre Proteine haben eine kugelförmige Gestalt. Sie zeigen gewöhnlich eine gute Wasserlöslichkeit und stellen Funktionsproteine dar. Typische globuläre Proteine sind Enzyme oder Immunglobuline.

Globuläre Proteine besitzen eine spezielle Charakteristik bezüglich der räumlichen Anordnung der Seitenketten ihrer Aminosäuren: diese sind nach ihrer Polarität angeordnet. Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten wie Valin, Leucin, Isoleucin, Methionin oder Phenylalanin kommen vor allem im Inneren des Proteins vor. Aminosäuren mit geladenen polaren Seitenketten wie Arginin, Histidin, Lysin, Asparaginsäure oder Glutaminsäure sind im Regelfall auf der

Theorie

Oberfläche des Proteins, welche in Kontakt mit dem wässrigen Medium steht, zu finden. Sowohl im Proteininnern als auch auf der Proteinoberfläche kommen hingegen Aminosäuren mit ungeladenen polaren Seitenketten wie Serin, Threonin, Asparagin, Glutamin oder Tyrosin vor. Befinden sich diese Aminosäuren im Inneren eines Proteins, bilden sie in den meisten Fällen Wasserstoffbrückenbindungen untereinander aus [Voet 2008, Branden 1999].

Strukturelemente wie α -Helix und β -Faltblatt kommen in globulären Proteinen häufig mehrmals hintereinander vor und bilden dabei bestimmte Struktur- und Faltungsmotive. Diese werden auch als Supersekundärstrukturen oder schlicht als Motive bezeichnet. Viele dieser Supersekundärstrukturen wie das $\beta\alpha\beta$ - oder das $\alpha\alpha$ -Motiv sind in vielen globulären Proteinen zu finden. Es gibt jedoch auch globuläre Proteine, die nur bestimmte Sekundärstrukturelemente in sich tragen. Immunglobuline beispielsweise beinhalten die Immunglobulin-Domäne. Sie werden auch β -Proteine genannt, da viele β -Faltblätter, aber keine α -Helices in ihrer Struktur vorkommen.

2.1.3.3 Wechselwirkungskräfte und Stabilität

Der native Zustand eines globulären Proteins ist oftmals energetisch nur geringfügig günstiger als der ungefaltete Zustand ($\Delta G^0 \approx -20$ kcal/mol) [Heinrich 2014, Taverna 2002, Murphy 2001, Savage 1993, Privalov 1974].

In einem ungefalteten Protein können sowohl die Polypeptidkette als auch die Seitenketten verschiedene Konformationen annehmen. Im nativen Zustand des Proteins ist die Konformation zum Großteil festgelegt. Dieser Verlust an Freiheitsgraden führt zu einer verringerten Entropie des nativen Proteins, welche durch eine Zunahme der Enthalpie ausgeglichen werden muss, um ein stabiles natives Protein zu erhalten.

In der Literatur werden vor allem hydrophobe und van-der-Waal'sche Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen als vorherrschende Kräfte beschrieben, die die Struktur eines Proteins bestimmen [Voet 2008, Nelson 2009]. Ionische Wechselwirkungen tragen hingegen kaum zur Stabilisierung des nativen Zustands des Proteins bei. Zwar bilden ca. 75 % der geladenen Aminosäureseitenketten ionische Wechselwirkungen aus, jedoch kann die dabei frei werdende Energie im Regelfall nicht den Entropieverlust durch die damit verbundene definierte Anordnung der Seitenketten sowie den Verlust der Solvatationsenergie kompensieren.

Hydrophobe Wechselwirkungen haben mit den größten Einfluss auf die Struktur von Proteinen. Wie bereits in Abschnitt 2.1.3.2 indirekt angesprochen, sind sie ursächlich für die Aggregation der unpolaren Seitengruppen der Aminosäuren im Inneren eines Proteins und werden durch die damit verbundene Entropiezunahme der Wassermoleküle begünstigt.

Im Gegensatz dazu haben Wasserstoffbrückenbindungen trotz ihres häufigen Vorkommens in Proteinstrukturen einen geringeren energetischen Einfluss auf die Proteinestabilität als sich auf den ersten Blick vermuten ließe. In Proteinen konkurrieren intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen mit Wasserstoffbrückenbindungen, die zu Wassermolekülen ausgebildet werden können. Zudem hängt die Energie der Wasserstoffbrückenbindung auch

von den beteiligten Donor- und Akzeptorgruppen, der näheren Umgebung und der relativen Konzentration der beteiligten Gruppen ab. Um den Beitrag der Wasserstoffbrückenbindungen zur Proteinstabilität zu bestimmen, muss die Differenz zwischen den Energien der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen im nativen Protein und den Energien der Wasserstoffbrückenbindungen mit dem umgebenden Wasser im ungefalteten Protein betrachtet werden [Murphy 2001]. Durch ortsspezifische Mutagenese-Untersuchungen wurden nur geringe Energieunterschiede von -2 bis 8 kJ/mol gefunden [Voet 2008]. Dennoch liefern die internen Wasserstoffbrückenbindungen eines Proteins die strukturelle Basis für sein natives Faltungsmuster, da das Protein so gefaltet wird, dass sich möglichst viele Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden.

Die Stabilität eines Proteins wird demzufolge von vielen verschiedenen zum Teil gegenläufigen zwischenmolekularen Kräften bestimmt. Wird das empfindliche Kräftegleichgewicht, welches das Protein in seinem nativen Zustand hält, zum Beispiel durch kleine Änderungen in der Umgebung gestört, kann das Protein denaturieren. Es verliert dabei in der Regel seine biologische Aktivität und somit seine spezifischen Eigenschaften, obwohl die Primärstruktur unverändert bleibt. Beruht die Denaturierung auf dem Lösen von nicht-kovalenten Wechselwirkungen, ist sie reversibel. Das Protein kann unter geeigneten Bedingungen in seine native Konformation zurückkehren. Findet jedoch eine kovalente Modifikation des Proteins statt oder bilden die denaturierten Proteine stabile, unlösliche Aggregate (ungeordnete Proteinkomplexe) oder Polymere (geordnete makromolekulare Komplexe), ist die Proteindenaturierung irreversibel.

2.1.3.4 Chemische Synthese von Peptiden und kleinen Proteinen

Viele Peptide oder kleine Proteine werden heute kommerziell in der Bioanalytik verwendet oder sind wichtige Pharmazeutika. Zudem werden spezifische Peptidbereiche zunehmend für die Erforschung von Proteinstrukturen und -funktionen interessant. Die Synthese von Peptiden ist daher von beträchtlicher Bedeutung. Um Peptide zu erhalten, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Sie können z.B. direkt aus Gewebe gewonnen werden. Dies ist aber oftmals nicht trivial, vor allem wenn das Peptid dort nur in verschwindend geringen Konzentrationen vorkommt. Alternativ können Peptide entweder gentechnisch oder mittels direkter chemischer Synthese hergestellt werden. In den letzten Jahren hat sich vor allem die Festphasenpeptidsynthese als wirkungsvolle Synthesemethode herauskristallisiert [Jakubke 1996]. Bei dieser von Merrifield 1963 eingeführten Methode wird das Peptid an einem polymeren Träger (Harz) sequentiell vom C- zum N-Terminus aufgebaut, wobei die C-terminale Aminogruppe des schlussendlichen Peptids über einen Linker mit dem Harz verbunden ist (Abbildung 4). Dies ermöglicht unter spezifischen Bedingungen die Abspaltung des Peptides vom Harz. Die Aminosäuren werden durch Kondensationsreaktionen sukzessive miteinander verknüpft. Um einen gerichteten Ablauf der Kondensationsreaktion sicherzustellen, werden reversibel spaltbare Schutzgruppen verwendet. Als temporäre α -Aminoschutzgruppen sind vor allem zwei Urethan-Schutzgruppen gebräuchlich: tert-

Theorie

Butoxycarbonyl (Boc) und Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc). Boc ist durch den Zusatz von Säuren, Fmoc durch den Zusatz von sekundären Aminen abspaltbar.

Um darüber hinaus unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden, müssen auch potentiell reaktive Seitenketten der Aminosäuren in reversibler Form geschützt werden. Hierfür werden orthogonale Schutzgruppen verwendet. Sie müssen während der Entschützung der N^α-Schutzgruppen stabil, am Ende der Synthese aber abspaltbar sein. So ist beispielsweise die Fmoc-Gruppe zum Schutz der α-Aminogruppen basenlabil, die Schutzgruppen der Seitenketten sowie der Linker zum Harz sind jedoch säurelabil. Da die Entfernung der Schutzgruppen nach verschiedenen Mechanismen abläuft, können die Abspaltungen unter milden Bedingungen durchgeführt werden.

Die Festphasenpeptidsynthese bietet im Vergleich zur Peptidsynthese in Lösung mehrere Vorteile [Jakubke 1996, Benoiton 2006]. Durch die Verwendung eines großen Überschusses der Reagenzien kann die Kopplungsausbeute deutlich gesteigert und die Reaktion nahezu quantitativ durchgeführt werden. Die überschüssigen Reagenzien sowie lösliche Nebenprodukte können durch Waschen leicht entfernt werden. Zudem werden durch die kovalente Anbindung des Peptids Produktverluste minimiert.

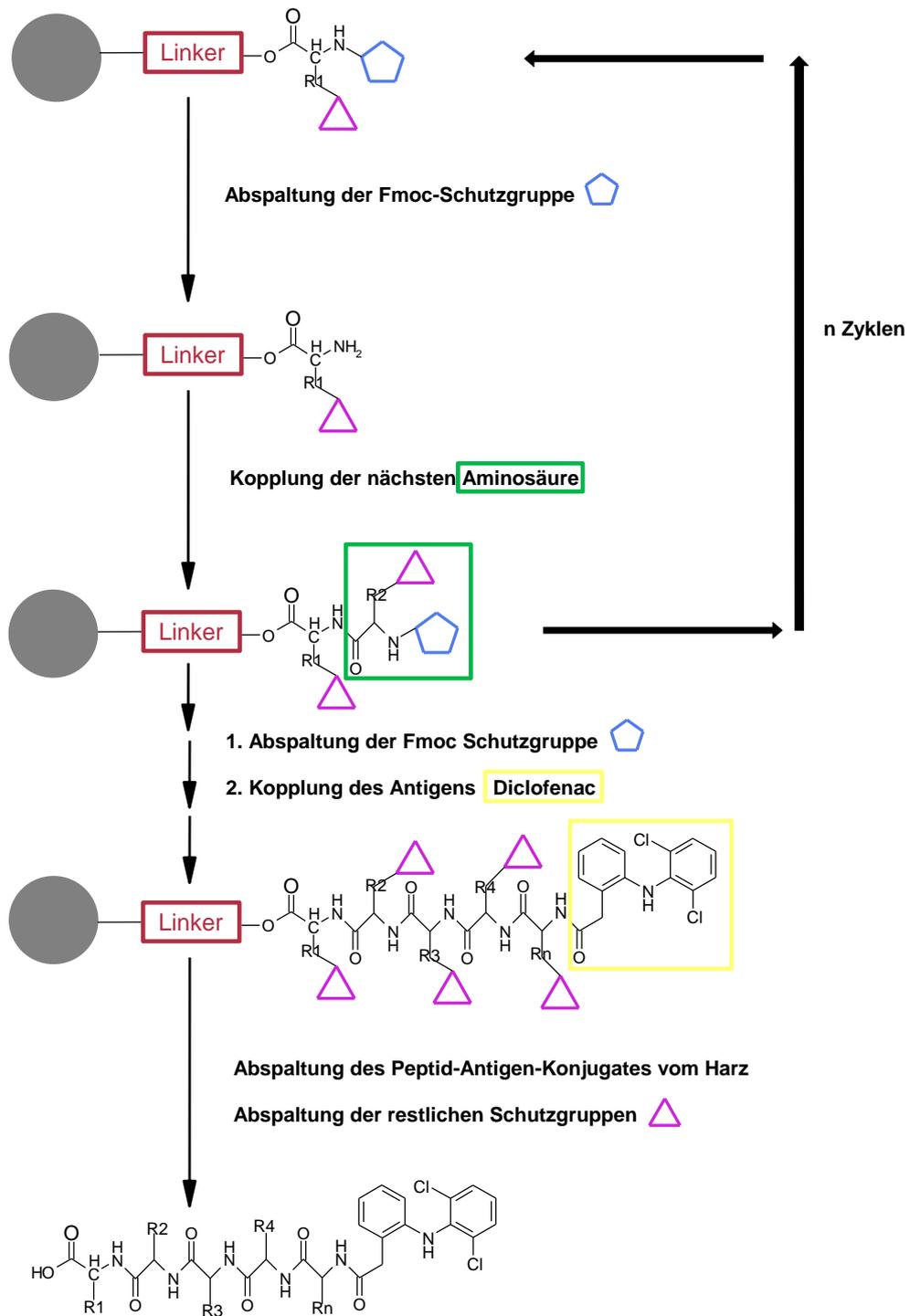


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Festphasenpeptidsynthese zur Synthese von Peptiden oder Peptid-Antigen-Konjugaten.

Theorie

2.1.4 Antikörper

Das Immunsystem ist das biologische Abwehrsystem höherer Lebewesen. Seine vorrangige Aufgabe ist es, in den Organismus eingedrungene Mikroorganismen wie Viren, Bakterien oder Parasiten, körperfremde Substanzen oder fehlerhaft gewordene körpereigene Zellen zu zerstören. Das Immunsystem besteht aus der angeborenen und der adaptiven Immunantwort. Antikörper (Immunglobuline, Ig) sind Teil der adaptiven Immunantwort und kommen im Organismus zunächst als Transmembranrezeptoren auf der Zelloberfläche von B-Lymphozyten vor. Während einer Immunantwort können sich diese B-Zellen zu Plasmazellen differenzieren, welche darauf spezialisiert sind, lösliche Immunglobuline in großen Mengen zu bilden (ca. 2000 Antikörpermoleküle pro Sekunde und Plasmazelle). Die Antikörpersynthese erfolgt dabei durch Selektion, nicht durch Instruktion [Heinrich 2014].

Ein Fremdmolekül, welches die Bildung von Antikörpern im Organismus induziert, wird Antigen bzw. Immunogen genannt. Antikörper zeigen jedoch nicht für das gesamte Antigen eine spezifische Affinität, sondern nur für eine spezielle Region, die als Epitop oder antigene Determinate bezeichnet wird. Natürliche Immunogene sind in der Regel Makromoleküle mit einem Molekulargewicht größer 5000 Da. Besonders immunogen sind solche mit Molekulargewichten größer 10000 Da, da mit der Molekülgröße die Zahl der vom Organismus als fremd erkannten Gruppen zunehmend steigt [Wollenberger 2003].

Die Antikörper des Menschen können in fünf verschiedene Klassen (Isotype; IgM, IgD, IgG, IgA, IgE) unterteilt werden. Diese unterscheiden sich unter anderem in ihrer Verteilung im Organismus, ihrer Struktur und ihren Effektorfunktionen [Johnson 2001]. IgA befindet sich vor allem auf den Schleimhautoberflächen des Verdauungstraktes und in Körperflüssigkeiten wie Speichel, Schweiß und Tränen. Es ist auch das wichtigste Immunglobulin in Milch und Colostrum. Im Blutplasma stellt es 15 % der Plasma-Immunglobuline dar. IgE und IgD kommen vor allem auf Lymphozyten- und Mastzell-Oberflächenmembranen vor. Sie sind nur in Spuren (0,5 % und 0,002 % der Plasma-Immunglobuline) im Plasma vorhanden. IgM findet sich fast ausschließlich im Blut. Es macht etwa 7 % der Plasma-Immunglobuline aus und ist das erste Immunglobulin, welches als Reaktion auf ein Antigen sezerniert wird [Stryer 1990, Engels 2012].

IgG, das häufigste Immunglobulin, ist zwischen Blut und interstitieller Flüssigkeit verteilt. Es besteht aus zwei molekular identischen leichten (ca. 24 kDa) und zwei molekular identischen schweren (ca. 55 kDa) Ketten. Dabei werden sowohl die zwei schweren als auch jeweils eine schwere mit einer leichten Kette durch Disulfidbrücken kovalent verknüpft [Pezzutto 2007]. Es bildet sich ein ypsilonförmiges, achsensymmetrisches Heterotetramer aus (Abbildung 5).

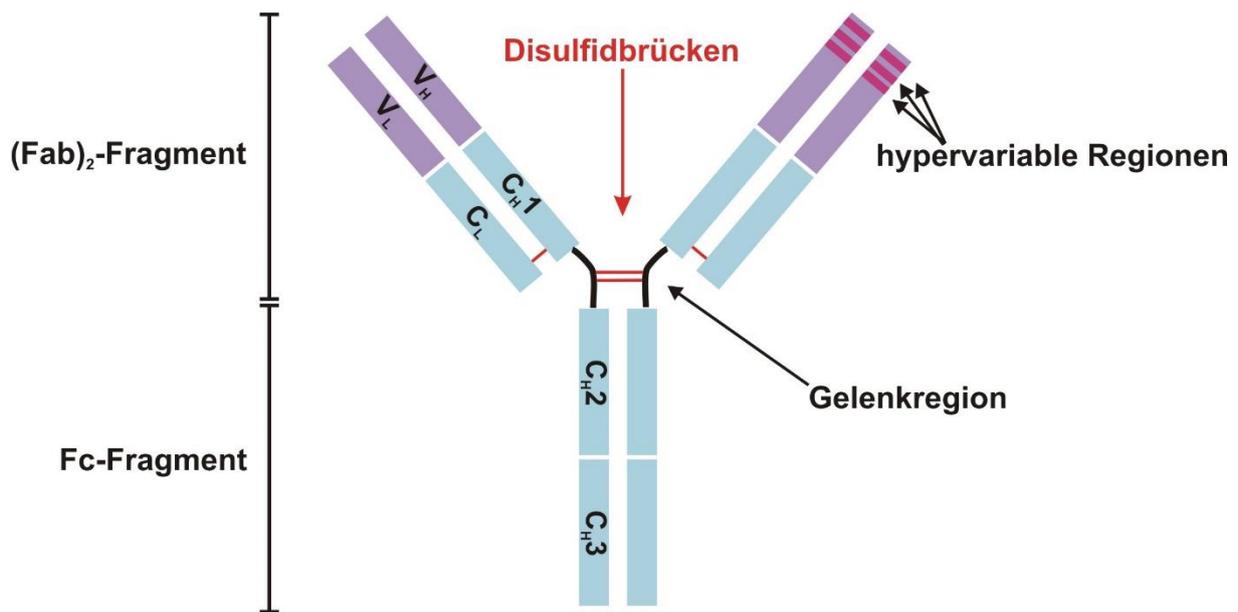


Abbildung 5: Schematische Struktur des Immunglobulins G. Die leichten (L) Ketten bestehen aus einer variablen (V) und einer konstanten (C) Domäne, die schweren (H) Ketten aus einer variablen und drei konstanten Domänen.

Während die leichten Ketten jeweils aus einer variablen und einer konstanten Domäne bestehen, setzen sich die schweren Ketten jeweils aus einer variablen und drei konstanten Domänen zusammen. Domäne sind Bereiche des Proteins, die sich unabhängig voneinander falten und die durch interne Disulfidbrücken stabilisiert werden. Zwischen der ersten und der zweiten konstanten Domäne der schweren Ketten befindet sich ein wenig strukturierter Bereich (Gelenkregion), der für eine große räumliche Flexibilität zwischen den sogenannten Fab-Fragmenten und dem Fc-Fragment des Antikörpers sorgt. Während das Fc-Fragment (constant fragment) für das Auslösen der biologischen Funktion verantwortlich ist, sind die Fab-Fragmente (fragment of antigen binding) für die spezifische und hochaffine Antigenerkennung und -bindung verantwortlich. Die Antigenbindungsstellen werden durch die variablen Domänen der leichten und der schweren Kette gebildet, wobei drei kurze Abschnitte dieser variablen Domänen als hypervalente Regionen bezeichnet werden. In diesen Abschnitten sind die Unterschiede in den Aminosäuresequenzen verschiedener Antikörper besonders ausgeprägt. Maßgeblich sind hierbei jeweils nur 6-8 Aminosäuren in der Nähe der Positionen 30, 50 und 93 der L-Ketten sowie 32, 55 und 98 der H-Ketten [Heinrich 2014]. Das Immunglobulin G besitzt zwei identische Antigenbindungsstellen und ist somit bivalent.

2.1.4.1 Polyklonale und monoklonale Antikörper

Die Bildung polyklonaler Antikörper kann durch das Injizieren eines Immunogens in einen Organismus erreicht werden. Hierfür werden vor allem Ratten, Kaninchen, Ziegen, Schafe und Pferde verwendet [Engels 2012]. Der Organismus reagiert auf eine körperfremde Substanz zuerst mit der Bildung der Immunglobuline M im Serum. Ihre Bildung beginnt zwei bis drei Tage nach dem ersten Antigenkontakt. Nach 10 Tagen treten vermehrt Antikörper vom Typ

Theorie

IgG auf, deren Konzentration nach ca. drei Wochen ein Plateau erreicht. Hier ist nun eine erneute Injektion des Immunogens (Boost) erforderlich, um einen weiteren Anstieg der IgG-Konzentration zu bewirken [Wollenberger et al. 2003]. Da die gebildeten Antikörper vielen verschiedenen Plasmazellen entstammen, unterscheiden sie sich in ihrer exakten Spezifität und Bindungsaffinität bezüglich des Antigens. Sie sind heterogen.

Im Gegensatz dazu besitzen monoklonale Antikörper alle das gleiche Paratop und sind eine in sich homogene Population einer Spezifität und Bindungsaffinität. Monoklonale Antikörper werden mittels Hybridomtechnologie hergestellt. Hierbei werden Myelomzellen mit Lymphozyten fusioniert. Der dabei entstandene Klon eines Hybridoms (Hybrid-Myelom) produziert das Immunglobulin des Lymphozyten und besitzt zudem die Fähigkeit zu fast unbegrenztem Wachstum und kann somit kultiviert werden [Köhler 1975].

2.1.5 Haptene

Die meisten Arzneimittel (Molare Masse < 2000 Dalton) sind Haptene, d.h. sie können erst dann eine Immunantwort auslösen, wenn sie an ein Trägerprotein kovalent gekoppelt werden. Das Trägerprotein sollte eine hohe Molare Masse (> 20000 Da) besitzen und im Idealfall dem Tier, welches immunisiert werden soll, körperfremd sein. Demzufolge wird eine große Vielzahl an verschiedenen Proteinen verwendet. Besonders häufig kommen jedoch Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA), Ovalbumin (OVA) oder Schlitzschnecken-Hämocyanin (keyhole limpet hemocyanin, KLH) als Trägerproteine zum Einsatz. Da das immunisierte Tier sowohl potentiell Antikörper gegen das Hapten als auch gegen das Trägerprotein oder die Verknüpfung zwischen Trägerprotein und Hapten bildet, kann eine Aufreinigung des Antiserums je nach Verwendungszweck von Nöten sein.

2.1.6 Antikörperaufreinigung

Antiserum kann für bestimmte Anwendungen in der Bioanalytik direkt verwendet werden. In der Regel ist jedoch eine Aufreinigung des Antiserums erforderlich, da verschiedenste Matrixbestandteile potentiell den gerichteten Einsatz der Antikörper stören können.

Es gibt viele verschiedene Aufreinigungsmethoden, die unterschiedlich schnell, effektiv und selektiv sind. Prinzipiell lassen sich alle Aufreinigungsmethoden in drei Gruppen unterteilen:

Die erste Gruppe beinhaltet alle Aufreinigungsmethoden, die sich die physiko-chemischen Eigenschaften der Antikörper wie ihre Größe oder Ladung zunutze machen. Hier sind vor allem die Größenausschlusschromatographie, die Ionenaustauschchromatographie, die thiophilische Adsorptionschromatographie oder die Ammoniumsulfatfällung zu nennen.

Aufreinigungsmethoden, die auf einer „Klassen“-spezifischen Affinität der Antikörper beruhen, bilden die zweite Gruppe. Zu dieser gehören beispielsweise Protein A- oder Protein G-Säulen. Hierbei wird die spezifische Affinität bestimmter Antikörper-Klassen an einen an

einer Festphase immobilisierten Liganden genutzt, um Antikörper dieser Klasse von den anderen Matrixbestandteilen abzutrennen und somit aufzureinigen.

Die dritte Gruppe nutzt die Antigen-spezifische Affinität eines Antikörpers zur Aufreinigung und Isolierung eben dieses Antikörpers. Alle anderen Matrixbestandteile, auch andere im Antiserum vorkommende Antikörper derselben Klasse, werden abgetrennt. Dieses Prinzip wird beispielsweise bei der Affinitätschromatographie verwendet (Abbildung 6).

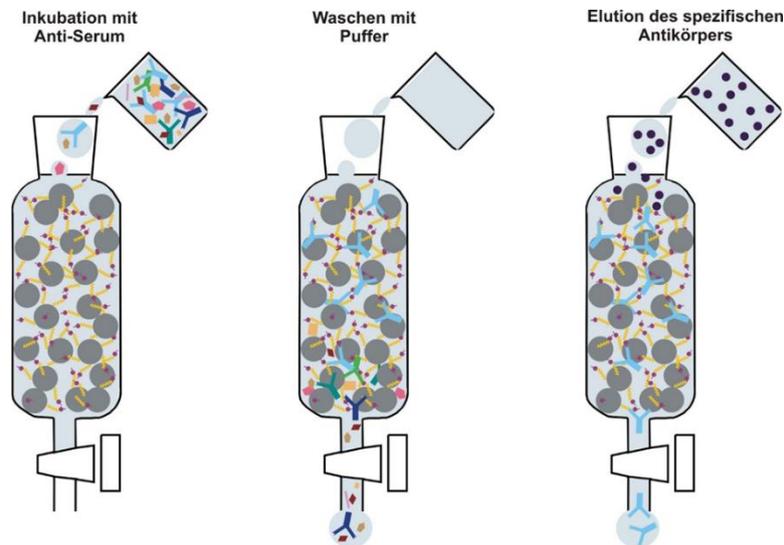


Abbildung 6: Allgemeines Prinzip der Affinitätschromatographie: Das Antiserum wird in der Säule mit dem immobilisiertem Liganden, der spezifisch einen Antikörper binden kann, inkubiert. Die ungebundenen Matrixbestandteile werden in einem Waschschritt entfernt und anschließend der spezifische Antikörper mit einem Elutionsmittel eluiert.

2.1.7 Biomolekulare Erkennung

Die affine und selektive Wechselwirkung zwischen Analyt und Erkennungsstruktur ist die Voraussetzung jedes Biosensors. Als Erkennungsstrukturen können beispielsweise Antikörper, Aptamere, Rezeptoren oder Enzyme verwendet werden [Taylor 1991, Amine 2006, Milkani 2011, Zhou 2014]. Im Folgenden soll von Immunglobulin G als Erkennungsstruktur ausgegangen werden.

Die Antigenbindungsstellen des IgGs werden durch die hypervariablen Regionen der leichten und schweren Ketten gebildet (Abschnitt 2.1.4). Aus diesem Grund werden diese auch als „complementary determining regions“ (CDRs) bezeichnet. Die CDRs werden durch die Faltung des Immunglobulins in enger räumliche Nähe an die Moleküloberfläche gebracht und bilden die Kontaktzone für das Epitop des Antigens (Abbildung 7) [Schütt 2009].

Theorie

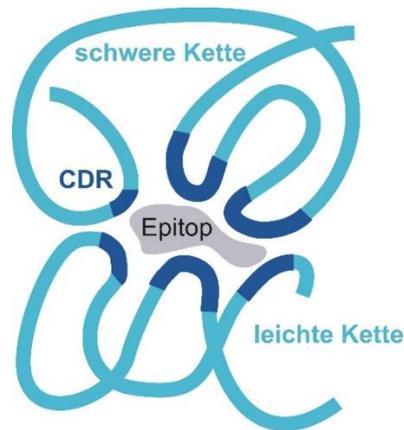


Abbildung 7: Schematische Darstellung der variablen Regionen der leichten und der schweren Kette eines Antikörpers. Die jeweiligen drei hypervariablen Regionen (CDRs) sind farblich markiert (modifiziert nach [Copley 1996]).

Die Komplementarität der wechselwirkenden Bereiche des Antikörpers und des Antigens bezüglich Form und Größe wird auf molekularer Ebene durch die Komplementarität der polaren, geladenen und hydrophoben Gruppen auf deren Oberflächen wiedergespiegelt (Abbildung 8) [Nelson 2009].

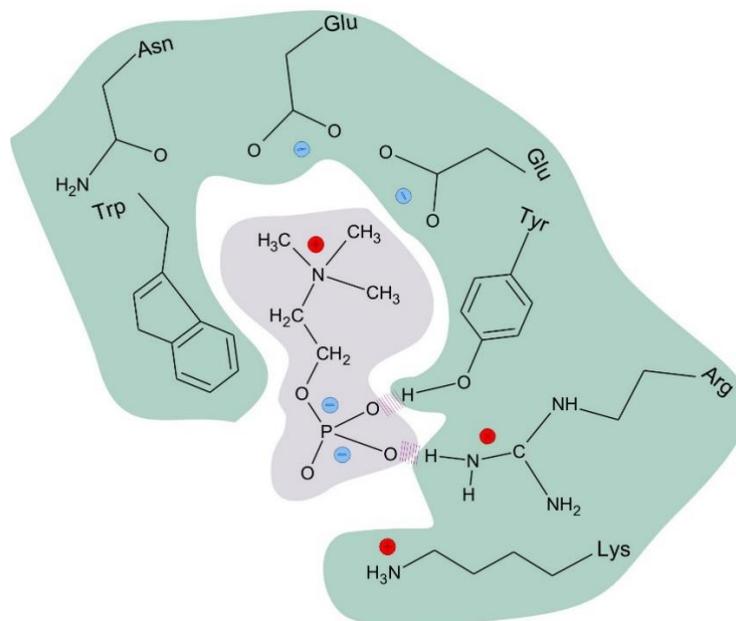


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Komplementarität der wechselwirkenden Bereiche eines Antigens und seines Antikörpers am Beispiel Phosphocholin (modifiziert nach [Branden 1999]).

Die Bindung selbst erfolgt über verschiedene physikochemische Wechselwirkungen wie ionische, van-der-Waal'sche oder hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen. Diese sind in Tabelle 1 bezüglich ihrer Wechselwirkungsenergie und Abstandsabhängigkeit zusammengefasst. Da die effektive Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper nur über eine Distanz von 100-300 pm stattfindet [Piehler 1997], ist der Betrag der

höheren Multipole für die Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper vernachlässigbar. Demzufolge werden nur Mono- und Dipol-, aber keine Quadrupol- oder höheren Multipol-Wechselwirkungen berücksichtigt.

Im Regelfall ist die hydrophobe Wechselwirkung eine der dominierenden Kräfte bei Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen. Dies ist auf den Entropiegewinn durch Verlust der Ordnung der Wassermoleküle, die durch das Antigen verdrängt werden, zurückzuführen. Es ist jedoch oftmals schwer vorherzusagen, welche weiteren der oben erwähnten Kräfte bei einer bestimmten Antigen-Antikörper Wechselwirkung dominierend sind. Dies gilt vor allem dann, wenn das Antigen ein großes komplexes Molekül wie beispielsweise ein Protein darstellt.

Die Kenntnis der dominierenden Kräfte bei einer bestimmten Antigen-Antikörper-Wechselwirkung wäre aber insbesondere für die schnellstmögliche Auswahl der optimalen Assaybedingungen eines Immunoassays sehr wünschenswert. So reagieren ionische Wechselwirkungen beispielsweise sehr empfindlich auf leichte pH- oder Ionenstärkeänderungen des Immunoassays [Branden 1999].

2.2 Biomolekulare Interaktionsanalyse

2.2.1 Detektion an Grenzschichten

Die reversible Bindung eines Antigens (Ag) an einen Antikörper (Ak) unter Ausbildung eines Immunkomplexes (AgAk), kann durch folgende Gleichgewichtsreaktion beschrieben werden:



Die Geschwindigkeit der Bildung des Immunkomplexes erfolgt mit der Assoziationsratenkonstante k_a , die Geschwindigkeit der Dissoziation lässt sich mit der Dissoziationsratenkonstante k_d beschreiben. Die thermodynamische Stabilität des Komplexes wird durch die Affinitätskonstante K_a widerspiegelt, die sich aus dem Verhältnis der Ratenkonstanten berechnen lässt:

$$K_a = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[AgAk]}{[Ag] \cdot [Ak]} \quad \text{Gleichung 2}$$

Deren Kehrwert ergibt die Dissoziationskonstante K_d . Diese wird oftmals anstelle der Affinitätskonstanten zur Beschreibung der Affinität verwendet [Nelson 2009]. In Abbildung 9 sind Spannbreiten typischer Dissoziationskonstanten, die für verschiedene Klassen von Wechselwirkungen in biologischen Systemen üblich sind, dargestellt:

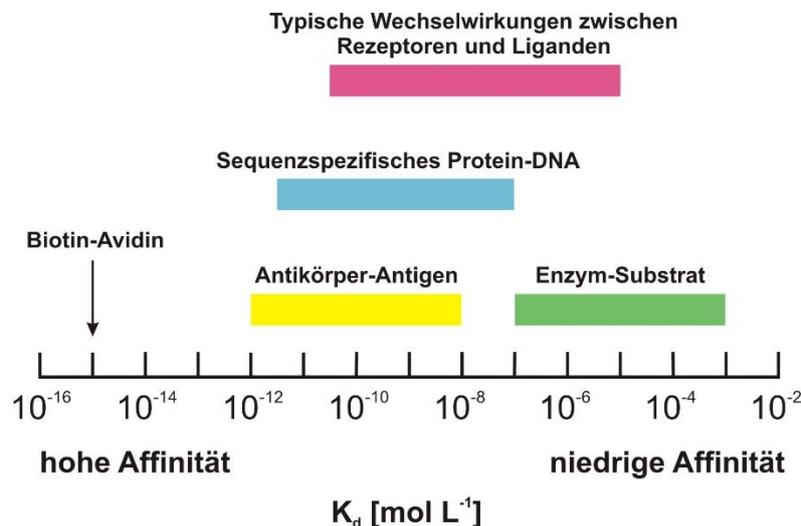


Abbildung 9: Spannbreiten der Dissoziationskonstanten, die für verschiedene Klassen von Wechselwirkungen in biologischen Systemen üblich sind. Die Biotin-Avidin-Bindung ist so fest, dass sie als irreversibel betrachtet werden kann (modifiziert nach [Nelson 2009]).

Ist einer der beiden Reaktionspartner an einer Oberfläche immobilisiert, findet eine heterogene Affinitätsreaktion statt. Bei dieser spielt nicht nur die Wechselwirkungskinetik, sondern auch die Diffusion des mobilen Reaktionspartners an die Oberfläche eine Rolle.

Für die Beschreibung der Diffusion in flüssigen Systemen muss zwischen konstant fließenden und ruhenden Systemen unterschieden werden. Zwar bildet sich in beiden Fällen eine Nernst'sche Diffusionsschicht aus, aber diese ändert sich im Falle eines konstant fließenden Systems zeitlich nicht. Durch die Bindung des mobilen Reaktionspartners (z.B. Antikörpers) an den immobilisierten Reaktionspartner (z.B. Antigen) auf der Oberfläche entsteht in der Nernst'schen Diffusionsschicht ein linearer Konzentrationsgradient (dc/dx) entgegen der Flussrichtung (Abbildung 10). Die Diffusion folgt dem 1. Fickschen Gesetz:

$$J_D = -D \frac{dc}{dx} = -D \cdot \frac{([Ak_{\text{Oberfläche}}] - [Ak_{\text{Volumen}}])}{\delta} \quad \text{Gleichung 3}$$

Hierbei beschreibt D den Diffusionskoeffizienten und δ die Dicke der Diffusionsschicht [Atkins 1996].

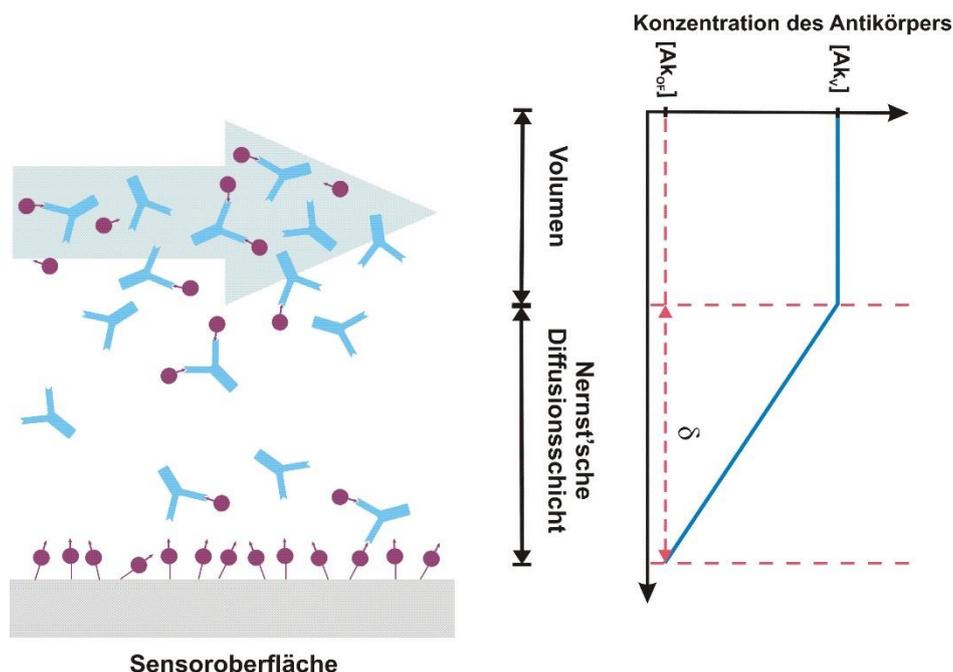


Abbildung 10: Ausbildung einer Nernst'schen Diffusionsschicht mit linearem Konzentrationsgradienten des mobilen Reaktionspartners (Antikörpers). Die Konzentration des Antikörpers im Volumen (V) ist konstant.

Da es sich bei der heterogenen Affinitätsreaktion formal um eine Folgereaktion handelt, wird nur der langsamere und somit geschwindigkeitsbestimmende Schritt mit einem Biosensor detektiert. Durch Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen kann gesteuert werden, ob die Reaktion diffusions- oder kinetisch-kontrolliert verläuft.

Theorie

2.2.2 Diffusionskontrollierte Affinitätsreaktion in heterogener Phase

Eine heterogene Affinitätsreaktion verläuft dann diffusions-kontrolliert, wenn die Konzentration des mobilen Reaktionspartners in der Lösung gering und die Konzentration des immobilisierten Reaktionspartners an der Oberfläche hoch ist. Jeder zur Oberfläche diffundierte Reaktionspartner findet sofort einen Bindungspartner. Die Konzentration des mobilen Reaktionspartners (z.B. Antikörpers) kann an der Oberfläche gleich Null gesetzt werden. Für die Diffusion gilt:

$$J_D = +D \cdot \frac{[Ak_{\text{Volumen}}]}{\delta} \Rightarrow J_D \propto [Ak_{\text{Volumen}}] \quad \text{Gleichung 4}$$

Der Diffusionsfluss ist demzufolge proportional zur Konzentration des Antikörpers im Volumen über der Diffusionsschicht. Je mehr Antikörper im Volumen vorhanden sind, desto stärker ist der Fluss und desto mehr Antikörpermoleküle diffundieren in einer bestimmten Zeit an die Oberfläche und binden an den dort immobilisierten Reaktionspartner. Die Oberflächenbeladung steigt mit zunehmender Konzentration des mobilen Reaktionspartners im Volumen.

Eine langsame Diffusion kann zudem durch eine große Dicke der Diffusionsschicht erreicht werden. Diese ist von der Fließgeschwindigkeit im Volumen (F) und von der Höhe (h), Länge (l) und Breite (b) des Flusskanals abhängig [Christensen 1997]:

$$\delta = \sqrt[3]{\frac{D \cdot h^2 \cdot b \cdot l}{F}} \quad \text{Gleichung 5}$$

Niedrige Fließgeschwindigkeit und große Flusskanalparameter erhöhen die Dicke der Diffusionsschicht.

Eine langsame Diffusion und demzufolge eine diffusions-kontrollierte Affinitätsreaktion wird des Weiteren durch einen kleinen Diffusionskoeffizienten des mobilen Reaktionspartners begünstigt. Der Diffusionskoeffizient ist dabei umgekehrt proportional zum hydrodynamischen Radius (R_0) der diffundierenden Teilchen [Murphy 1991]:

$$D \propto \frac{1}{R_0} \quad \text{Gleichung 6}$$

Immunglobuline G, deren mittlere Molare Masse ca. 150.000 Da entspricht und die mit Wasser als Lösungsmittel viele nicht-kovalente Wechselwirkungen eingehen können, besitzen einen mittleren Diffusionskoeffizienten von $D_{IgG} = 4,1 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [Juroš 1993]. Die Diffusionskoeffizienten niedermolekularer Verbindungen liegen in der Regel 1-2 Größenordnungen über diesem [Cussler 1997].

2.3 Optische Grundlagen

2.3.1 Brechungsindex

Der Brechungsindex n eines Mediums wird durch das Verhältnis der Phasengeschwindigkeit des Lichts im Vakuum (c_0) zur Phasengeschwindigkeit des Lichts in diesem Medium (c) definiert.

$$n = \frac{c_0}{c} \quad \text{Gleichung 7}$$

Die Phasengeschwindigkeit und somit auch der Brechungsindex hängen von der Wellenlänge des Lichts ab. So unterscheidet sich der Brechungsindex für blaues (Wellenlänge $\approx 440 - 480$ nm) und rotes (Wellenlänge $\approx 605 - 750$ nm) Licht beispielsweise im Regelfall um ca. 0,03 [Gerthsen 1971].

Steigt der Brechungsindex eines Mediums stetig mit abnehmender Wellenlänge, spricht man von normaler Dispersion. Ist der Brechungsindex eines Mediums hingegen für kurzwelliges Licht kleiner als für langwelliges, liegt eine anomale Dispersion vor. Sie liegt in der Regel in Spektralbereichen starker Absorption eines Mediums vor [Demtröder 1995].

Für Medien, die weder ferri- noch ferromagnetisch sind, entspricht der Brechungsindex der Wurzel der Dielektrizitätskonstanten ϵ_r [Jones 1992].

$$n = \sqrt{\frac{\mu \cdot \epsilon}{\mu_0 \cdot \epsilon_0}} = \sqrt{\frac{\epsilon}{\epsilon_0}} = \sqrt{\epsilon_r} \quad \text{Gleichung 8}$$

Das Dispersionsverhalten eines Mediums kann demzufolge auch durch die Frequenzabhängigkeit der Dielektrizitätskonstanten ausgedrückt werden.

Die Geschwindigkeit, mit der sich eine elektromagnetische Welle in einem Medium fortpflanzt, und somit der Brechungsindex dieses Mediums, ergibt sich aus der Wechselwirkung des elektrischen Feldes der Welle mit den Atomen bzw. Molekülen des Mediums. Durch die Induzierung bzw. Ausrichtung von Dipolen wird eine zeitlich veränderliche dielektrische Polarisation P erzeugt. Diese beruht auf der Verschiebung der Ladungsschwerpunkte im Atom (Verschiebungspolarisation P_V) und der Ausrichtung eventuell vorhandener permanenter Dipole im Feld (Orientierungspolarisation P_O) [Göpel 1994]. Die Verschiebungspolarisation kann des Weiteren in die Elektronenpolarisation, die Atompolarisation und bei Ionenkristallen in die Ionenpolarisation untergliedert werden.

$$P_{ges} = P_V + P_O \quad \text{Gleichung 9}$$

Die erzwungenen Polarisationen können mit steigender Frequenz des elektrischen Feldes diesem immer weniger und bei hoher Frequenz überhaupt nicht mehr folgen. Die

Theorie

Dielektrizitätskonstante und somit der Brechungsindex des Mediums entsprechen denen des Vakuums.

Licht verschiedener Wellenlängen bzw. Frequenzen wechselwirkt somit unterschiedlich mit den Atomen/Molekülen des Mediums, induziert mehr oder weniger Polarisationsarten, kann bei bestimmten Resonanzfrequenzen absorbiert werden und besitzt demzufolge unterschiedliche Phasengeschwindigkeiten.

2.3.2 Reflexion und Brechung von Licht

Trifft ein Lichtstrahl auf eine Grenzfläche zwischen zwei homogenen, isotropen und nichtabsorbierenden Medien, so kann es zu Reflexion (R) und Transmission (T) kommen. Aufgrund des Energieerhaltungssatzes muss gelten:

$$R+T=1 \qquad \text{Gleichung 10}$$

Welchen Anteil die einzelnen Prozesse haben, hängt sowohl von stoffspezifischen Konstanten wie den Brechungsindices der beiden Medien als auch vom Einfallswinkel, mit dem der Lichtstrahl auf die Grenzfläche trifft, ab.

Fällt ein Lichtstrahl von einem Medium mit dem Brechungsindex n_1 unter einem Winkel α auf die Phasengrenze zu einem Medium mit dem Brechungsindex n_2 , so wird der Lichtstrahl zum Teil reflektiert (Winkel $\bar{\alpha}$) und zum Teil transmittiert (Winkel β). Mittels des Reflexionsgesetzes lässt sich eine quantitative Aussage bezüglich der Richtung des reflektierten Strahls treffen. Dieses besagt, dass der Ausfallswinkel dem Einfallswinkel entspricht.

$$\alpha = \bar{\alpha} \qquad \text{Gleichung 11}$$

Der transmittierte Anteil des Lichts wird beim Durchgang durch die Phasengrenze gebrochen. Er hat eine andere Phasengeschwindigkeit und Wellenlänge, aber die gleiche Frequenz und somit die gleiche Energie wie das einfallende und reflektierte Licht. Das Brechungsgesetz nach Snellius gibt die Richtung des transmittierten Lichtes wieder [Demtröder 1995]:

$$n_1 \cdot \sin \alpha = n_2 \cdot \sin \beta \qquad \text{Gleichung 12}$$

Demzufolge wird ein Lichtstrahl beim Übergang von einem optisch dünneren in ein optisch dichteres Medium ($n_1 < n_2$) zum Lot hin, beim Übergang von einem optisch dichteren in ein optisch dünneres Medium ($n_1 > n_2$) vom Lot weg gebrochen (Abbildung 11).

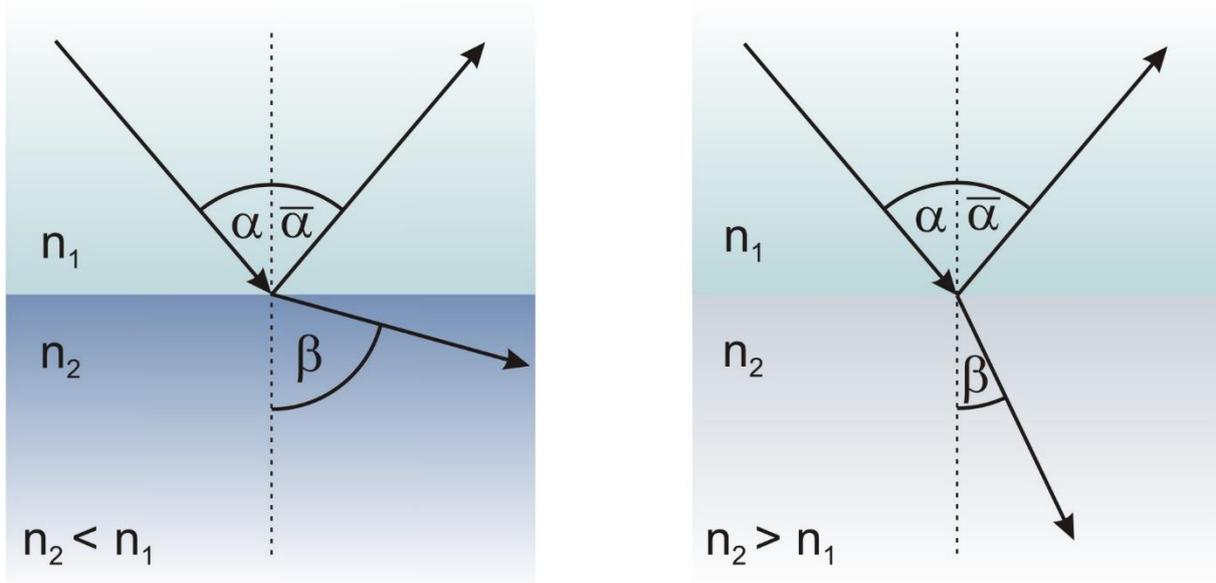


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Reflexion und Transmission eines Lichtstrahls an der Phasengrenze zweier homogener Medien mit Brechungsindizes n_1 und n_2 (links: $n_2 < n_1$; rechts: $n_2 > n_1$).

Die einfallende, reflektierte und transmittierte Strahlung liegt dabei immer in derselben Ebene. Die Intensitäten der reflektierten und der transmittierten Strahlung lassen sich mit Hilfe des Reflexionskoeffizienten r und des Transmissionskoeffizienten t nach Fresnel beschreiben. Diese geben das Verhältnis der Amplitude des elektrischen Feldes des reflektierten bzw. transmittierten Lichts ($A_{0,r}$; $A_{0,t}$) zur Amplitude des elektrischen Feldes des einfallenden Lichts ($A_{0,e}$) an. Da das Verhalten elektromagnetischer Wellen an Grenzflächen polarisationsabhängig ist, wird senkrecht (s) und parallel (p) zur Einfallsebene polarisiertes Licht betrachtet, da sich alle anderen Polarisationen aufgrund der ungestörten Superposition aus diesen errechnen lassen [Demtröder 1995].

$$r_s = \left(\frac{A_{0,r,s}}{A_{0,e,s}} \right) = \frac{n_1 \cdot \cos \alpha - n_2 \cdot \cos \beta}{n_1 \cdot \cos \alpha + n_2 \cdot \cos \beta} \quad \text{Gleichung 13}$$

$$t_s = \left(\frac{A_{0,t,s}}{A_{0,e,s}} \right) = \frac{2n_1 \cdot \cos \alpha}{n_1 \cdot \cos \alpha + n_2 \cdot \cos \beta} \quad \text{Gleichung 14}$$

$$r_p = \left(\frac{A_{0,r,p}}{A_{0,e,p}} \right) = \frac{n_2 \cdot \cos \alpha - n_1 \cdot \cos \beta}{n_2 \cdot \cos \alpha + n_1 \cdot \cos \beta} \quad \text{Gleichung 15}$$

$$t_p = \left(\frac{A_{0,t,p}}{A_{0,e,p}} \right) = \frac{2n_1 \cdot \cos \alpha}{n_2 \cdot \cos \alpha + n_1 \cdot \cos \beta} \quad \text{Gleichung 16}$$

Die Reflexions- und Transmissionskoeffizienten bzw. die Reflexion und Transmission sind somit sowohl vom Einfallswinkel als auch von den Brechungsindizes der Medien abhängig. So

Theorie

steigt beispielsweise die Reflexion unter Verringerung der Transmission mit zunehmender Differenz der Brechungsindices [Jonas 1992]. Die Abhängigkeit der Amplitudenkoeffizienten vom Einfallswinkel ist in Abbildung 12 für den Fall $n_1 < n_2$ veranschaulicht.

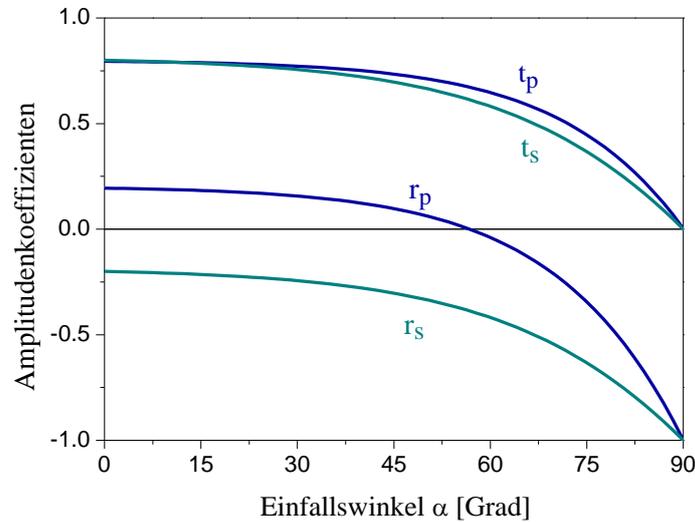


Abbildung 12: Einfluss des Einfallswinkels auf die Amplitudenkoeffizienten für den Fall $n_1 < n_2$ (Luft-Glas Grenzfläche: $n_1 = 1$; $n_2 = 1,5$) [Rau 2011].

Aus den Amplitudenkoeffizienten ergeben sich die Reflexion und die Transmission für senkrecht bzw. parallel polarisiertes Licht wie folgt:

$$R_x = |r_x|^2 \quad \text{Gleichung 17}$$

$$T_x = \frac{n_2 \cdot \cos \beta}{n_1 \cdot \cos \alpha} \cdot |t_x|^2 \quad \text{Gleichung 18}$$

Für den Spezialfall des senkrechten Lichteinstrahls ($\alpha = 0$) gilt für das Reflexionsvermögen der Grenzfläche entsprechend:

$$R = \left(\frac{A_{0,r}}{A_{0,e}} \right)^2 = \frac{I_r}{I_e} = \left(\frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2} \right)^2 \quad \text{Gleichung 19}$$

An einer Luft-Glas Grenzfläche werden somit bei senkrechten Lichteinstrahl 4 % der einfallenden Intensität reflektiert.

2.3.3 Interferenz an dünnen Schichten

Eine Interferenz an dünnen Schichten kann an alltäglichen Beispielen wie den schillernden Farben einer Seifenblase oder der schillernden Farben von Ölschichten auf einer nassen Straße beobachtet werden. All diese Farben entstehen durch Interferenz der Lichtwellen, die an der Vorder- und Rückseite der jeweiligen dünnen Schicht reflektiert werden.

Damit Interferenzeffekte reflektierter Teilstrahlen beobachtet werden können, müssen die Lichtstrahlen kohärent sein und auf planparallele Schichten mit einer Dicke im Bereich der Kohärenzlänge treffen. Folglich dürfen im Falle von Weißlicht die Schichtdicken einige μm nicht überschreiten (dünne Schichten) [Gauglitz 1996].

Im Folgenden soll exemplarisch die Reflexion an einer dünnen Schicht mit dem Brechungsindex n_2 und der Dicke d_2 , die sich zwischen zwei Medien mit Brechungsindices n_1 und n_3 von unendlicher Dicke befindet, untersucht werden. Hierbei soll von senkrechtem Lichteinfall ausgegangen werden. Eine Skizze des Strahlengangs durch die Schichten ist in Abbildung 13 dargestellt:

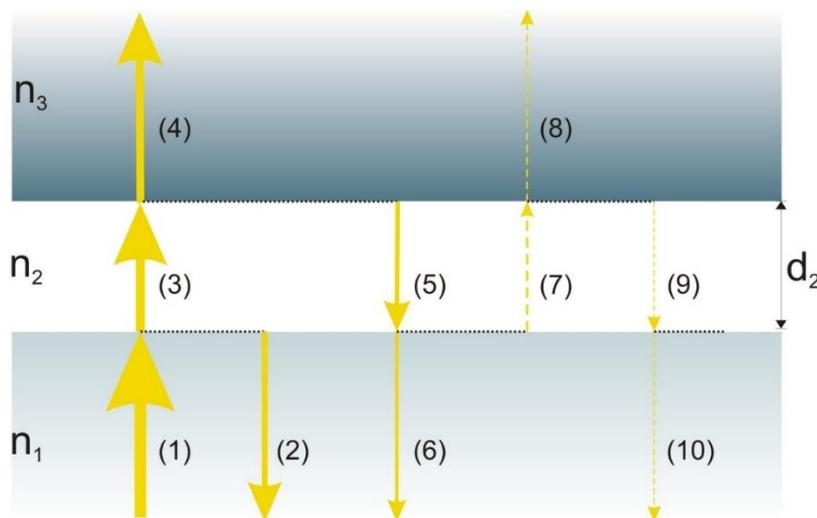


Abbildung 13: Mehrfachreflexion eines Lichtstrahls (senkrechtem Einfall) an einer dünnen Schicht. Die reflektierten Teilstrahlen sind aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit horizontal verschoben. Die Lichtstrahlen 7 -10 werden im Folgenden vernachlässigt und sind deshalb gestrichelt dargestellt [Rau 2011].

Der einfallende Lichtstrahl (1) wird an der ersten Grenzfläche zum Teil reflektiert (2) und zum Teil transmittiert (3). Es gelten die in Abschnitt 2.3.2 hergeleiteten Gesetzmäßigkeiten. Der Reflexionsgrad der Grenzfläche ergibt sich aus Gleichung 19. Aufgrund des Energieerhaltungssatzes (Gl. 10) ergibt sich für die Amplitude des transmittierten Lichtes (3):

$$A_{t,3} = \sqrt{T_3} \cdot A_{e,1} = \sqrt{(1-R_2)} \cdot A_{e,1} = \sqrt{(1-r_2^2)} \cdot A_{e,1} \quad \text{Gleichung 20}$$

Das transmittierte Licht wird an der zweiten Grenzfläche wieder zum Teil transmittiert (4) und zum Teil reflektiert (5). Der reflektierte Teilstrahl (5) läuft im Medium (n_2) zurück und trifft

Theorie

erneut auf die erste Grenzfläche, an der wiederum Transmission (6) und Reflexion (7) stattfinden. Bei geringer Reflektivität (7) kann diese jedoch vernachlässigt werden.

Die reflektierten Teilstrahlen interferieren. Die Intensität des reflektierten Lichtstrahls nach Interferenz lässt sich berechnen nach:

$$I_r = I_2 + I_6 + 2 \cdot \sqrt{I_2 \cdot I_6} \cdot \cos\left(\frac{4\pi \cdot n_2 \cdot d_2}{\lambda}\right) \quad \text{Gleichung 21}$$

wobei I_2 und I_6 die Intensitäten der reflektierten Teilstrahlen beschreiben [Brecht 1993]. In Mehrschichtsystemen erhöht sich die Anzahl der reflektierten Strahlen bedingt durch die höhere Zahl an Phasengrenzen.

2.3.4 Reflektometrische Interferenzspektroskopie

Bei der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIFS) wird das Prinzip der Interferenz von Weißlicht an dünnen Mehrschichtsystemen genutzt, um Wechselwirkungen an der Transduceroberfläche zeitaufgelöst und markierungsfrei zu detektieren [Hecht 1989, Gauglitz 1993]. Das senkrecht einfallende Licht wird an den Grenzflächen des optisch transparenten Transducers zum Teil reflektiert und zum Teil transmittiert (siehe Abschnitt 2.3.3). Die Intensität des reflektierten Lichts nach Interferenz ist von der Wellenlänge des Lichts abhängig und bildet ein charakteristisches Interferenzspektrum.

Auf der Transduceroberfläche befindet sich eine sensitive Schicht. Vergrößert sich die optische Schichtdicke, das Produkt aus Brechungsindex und physikalischer Schichtdicke, dieser sensitiven Schicht z.B. durch Anlagerung oder Bindung von Molekülen, resultiert eine Verschiebung des Interferenzspektrums zu höheren Wellenlängen. Aus der Verschiebung eines Extrempunktes des Spektrums während des Bindungsvorganges können Informationen über das Bindungsereignis gewonnen werden (Abbildung 14).

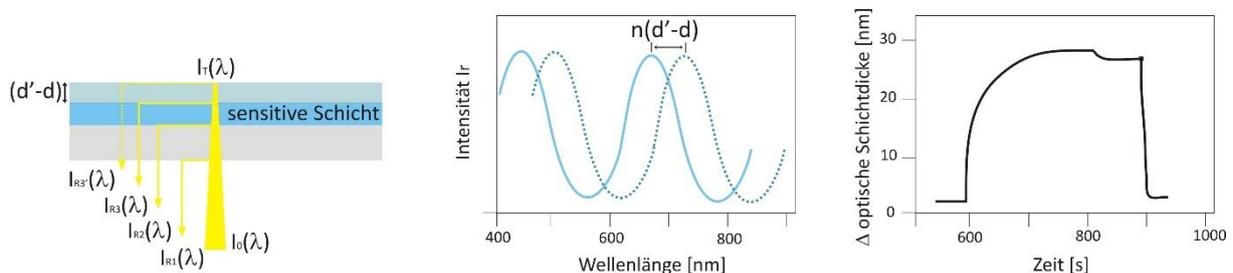


Abbildung 14: Bei Zunahme der optischen Schichtdicke der sensitiven Schicht (links), wird das Interferenzspektrum zu höheren Wellenlängen verschoben (Mitte). Ein zeitabhängiges Bindungssignal kann detektiert werden (rechts).

Der Messaufbau setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen und ist im Detail in Abschnitt 3.2 beschrieben.

3 Material und Methoden

3.1 Verbrauchsmaterialien

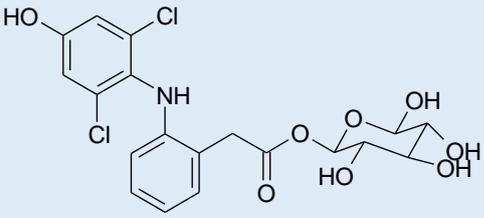
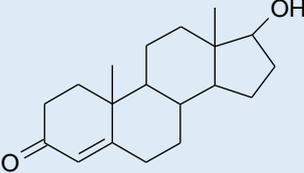
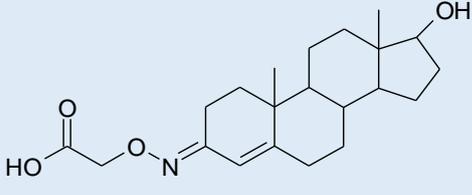
3.1.1 Chemikalien und Analyte

Die in dieser Arbeit verwendeten Standardchemikalien und Lösemittel wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Sigma Aldrich (Steinheim), Fluka (Buchs) oder Merck Millipore (Darmstadt) bezogen und sind im Folgenden nicht explizit aufgeführt. In Tabelle 2 sind die verwendeten Analyte und ihre Metabolite aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Analyte und ihre Metabolite

Analyt	Strukturformel	Lieferant
Diclofenac-Natriumsalz		Sigma Aldrich, Steinheim
Aceclofenac		LKT Laboratories, St. Paul
4'-Hydroxy-Diclofenac		Sigma Aldrich, Steinheim
Diclofenac Acyl Glucuronid		Synthetisiert von Ronald Maul

Material und Methoden

4'-Hydroxy-Diclofenac Acyl Glucuronid		Synthetisiert von Ronald Maul
Testosteron		Sigma Aldrich, Steinheim
Testosteron-3-(O-carboxymethyl)oxim		Sigma Aldrich, Steinheim

3.1.2 Aminosäuren und Proteine

Verwendete Aminosäuren und Proteine sind in Tabelle 3 zu finden. Die Aminosäuren sind an ihrem N-terminalen Ende mit Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) geschützt. Funktionelle Gruppen ihrer Seitenkette tragen tert-Butyl- (tBu) oder O-tert-Butyl- (OtBu) Schutzgruppen. Bei den Proteinen handelt es sich ausnahmslos um globuläre Proteine.

Tabelle 3: Verwendete Aminosäuren und Proteine. Die Aminosäuren sind geschützt und enthalten Fluorenylmethoxycarbonyl- (Fmoc), tert-Butyl- (tBu) oder O-tert-Butyl- (OtBu) Schutzgruppen.

Aminosäuren/Proteine	Eigenschaften	Lieferant
Fmoc-β-Ala-OH	M = 311,1 g mol ⁻¹	Merck Millipore, Darmstadt
Fmoc-Ser(tBu)-OH	M = 383,4 g mol ⁻¹	Multisyntech, Witten
Fmoc-Gly-OH	M = 297,31 g mol ⁻¹	Multisyntech, Witten
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	M = 425,5 + 18 g mol ⁻¹	Multisyntech, Witten
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	M = 411,45 g mol ⁻¹	Multisyntech, Witten
Fmoc-Leu-OH	M = 353,42 g mol ⁻¹	Multisyntech, Witten
Rinderserumalbumin (BSA)	M ≈ 66 kDa	Sigma Aldrich, Steinheim
BSA-Diclofenac-Konjugat	Keine Herstellerangabe	Gemacbio, Cenon

Anti-Diclofenac Antikörper	Polyklonaler Antikörper gegen Diclofenac; Immunogen: BSA-Diclofenac; Kaninchenserum	Antikörper-Online, Aachen
Anti-Diclofenac Antikörper	Polyklonaler Antikörper gegen Diclofenac; Immunogen: BSA-Diclofenac; Kaninchenserum	Eigene Herstellung
Zweitantikörper	Ziegen Anti-Kaninchen Serum konjugiert an Meerrettich-Peroxidase, c = 0,8 mg mL ⁻¹	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove

3.1.3 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Für die Oberflächenmodifizierung der RfS-Transducer, für die Herstellung der Affinitätssäule und für die Peptid- bzw. Peptid-Antigen-Synthese wurden verschiedene Harze bzw. Polymere verwendet, die in Tabelle 4 aufgeführt sind.

Tabelle 4: Verwendete Harze und Polymere. Als Schutzgruppen dienen Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) und tert-Butyloxycarbonyl (Boc).

Harze/Polymere	Eigenschaften	Lieferant
TCP-Harz-L-Lys(Boc)-Fmoc	Beladung 0,53 mmol g ⁻¹ , 200-400 mesh, 1 % DVB	PepChem, Tübingen
Fmoc-NH-PEG-COOH (9 Atome)	C ₂₁ H ₂₃ NO ₆ , M = 385,4 g mol ⁻¹	Merck Millipore, Darmstadt
CNBr aktivierte Sepharose	4 % Agarose, Korngrößen: 45-165 µm	Sigma Aldrich, Steinheim
DA-PEG	Diamino-Polyethylenglykol M = 2000 g mol ⁻¹	Rapp Polymere, Tübingen
Thiol-PEG	HS-PEG-NH ₂ M = 5000 g mol ⁻¹	Rapp Polymere, Tübingen

Verbrauchsmaterialien, die nicht in Tabelle 5 zu finden sind, wurden von Sigma Aldrich (Steinheim), Merck Millipore (Darmstadt), Thermo Fisher Scientific (Rockfold) und Fluka (Buchs) bezogen.

Material und Methoden

Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Eigenschaften	Lieferant
ELISA-Platte	Nunc-Immuno™ Module, Oberfläche: Maxisorp™	VWR, Darmstadt
Polypropylen (PP) -Reaktor mit Polyethylen (PE) -Fritte	2 mL Kunststoffspritze mit Polyethylen-Fritte	Multisyntech, Witten
RP-HPLC-Säule	Reprosil 100 C8, 5µm, 150 x 10 mm	Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen
Melon™ Gel IgG Spin Aufreinigungs-Kit	Melon Gel IgG Purification Support and Buffer	Thermo Fisher Scientific, Rockford
Aquanal Ökotest	Aquanal™-Oekotest Water Laboratory (Ammonium, Nitrat, Nitrit, Phosphat, pH-Wert, Gesamthärte)	Sigma Aldrich, Steinheim
Protein LoBind Tube	Material: Polypropylen; 1,5 mL	Eppendorf, Hamburg
Dialyseschlauch	Material: Cellulosehydrat; MWCO: 10000 Da	Carl Roth, Karlsruhe
Flaschenaufsatzfilter	Porengröße 0,22 µm, Membran: Millipore Express (PES), sterilisiert	Thermo Fisher Scientific, Rockford
Spinfilter	Amicon Ultra-15 Spinfilter; MWCO: 100.000; Membran: regenerated cellulose	Merck Millipore, Darmstadt
Spitzenvorsatzfilter	Cellulosemischester; 0,22 µm; Rotilabo Spitzenfilter	Carl Roth, Karlsruhe
Spitzenvorsatzfilter	Polytetrafluorethylen; 0,22 µm	Carl Roth, Karlsruhe
RfS-Transducer (Glas)	1mm D263 Glas, 10 nm Ta ₂ O ₅ , 330 nm SiO ₂	Schott AG, Mainz
RfS-Transducer (Gold)	RfS-Transducer (Glas), 2 nm Cr, 15 nm Au	Arbeitsgruppe Kern, Universität Tübingen

3.1.4 Lösungen und Gele

Die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Gele sind in Tabelle 6 aufgelistet. Die Vielfalt der verwendeten Puffer ergibt sich aus den unterschiedlichen Anforderungen, die während der Durchführung eines ELISAs, einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, eines In-Gel Verdau oder der Herstellung einer Affinitätssäule erfüllt werden müssen.

Tabelle 6: Verwendete Lösungen und Gele

Verwendung	Bezeichnung	Zusammensetzung
Reinigung	Piranha	3:2 (v/v) konz. H ₂ SO ₄ und 30%ige H ₂ O ₂
	KOH	6 M in destilliertem entsalztem Wasser
pH-Wert Einstellung	NaOH	1 M bzw. 6 M in destilliertem entsalztem Wasser
	HCl	1 M bzw. 6 M in destilliertem entsalztem Wasser
Puffer	10-fach PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 87,6 g NaCl + 13,6 g KH ₂ PO ₄ auf 1 L destilliertes entsalztes Wasser, pH 6,8
	PBS	1:9 (v/v) 10-fach PBS in destilliertem entsalztem Wasser, pH 7,4
	D-PBS	Dulbecco's PBS (1x), ohne Ca und Mg, sterile; PAA Laboratories GmbH
	ELISA-Waschpuffer	200 mL 20x PBS + 4 mL Tween 20 auf 4 L destilliertes entsalztes Wasser
	Blockierungspuffer	2 g Milchpulver pro 100 mL D- PBS
	Blockierungspuffer 2	100 mM Tris (pH 8,0) auf 1 L destilliertes entsalztes Wasser
	Verdünnungspuffer	1:4 (v/v) Blockierungspuffer und Waschpuffer
	Substratpuffer	0,1 M Citronensäure-Monohydrat in destilliertem entsalztem Wasser, pH 4,5
	Kopplungspuffer	100 mM NaHCO ₃ + 100 mM NaCl auf 1 L destilliertes entsalztes Wasser
	Aufreinigungspuffer	Melon Gel Purification Buffer; Thermo Fisher Scientific
	Laemmli-Puffer	23 mM Tris + 190 mM Glycin + 0,1 % SDS
	In-Gel-Verdau Puffer 1	70 % 50 mM Ammoniumbicarbonat in destilliertem entsalztem Wasser, 30 % ACN
In-Gel-Verdau Puffer 2	50 mM Ammoniumbicarbonat in destilliertem entsalztem Wasser	

Material und Methoden

	Melon Gel Suspension	Melon Gel IgG Purification Support; Thermo Fisher Scientific
Elution bzw. Regeneration	0,5 % SDS	0,5%ige Natriumdodecylsulfat-Lösung in destilliertem entsalztem Wasser, pH 1,6 bzw. pH 2,2
	Citronensäure	0,1 M Citronensäure in destilliertem entsalztem Wasser, pH 1,5 bzw. pH 2,5
	GdmHCl	6 M Guanidinhydrochlorid in destilliertem entsalztem Wasser, pH 2
	GdmHCl/Urea	6 M Guanidinhydrochlorid + 8 M Harnstoff in destilliertem entsalztem Wasser, pH 2 bzw. pH 2,5 oder pH 3 oder 6 M Guanidinhydrochlorid + 6 M Harnstoff in destilliertem entsalztem Wasser, pH 2,7
	Urea	8 M Harnstoff in destilliertem entsalztem Wasser, pH 1,5
	Ethanol	10 % (v/v) Ethanol in destilliertem entsalztem Wasser
	Ethanol/DMSO/Butanol	10 % (v/v) Ethanol, 3 % (v/v) DMSO und 2 % (v/v) Butanol in destilliertem entsalztem Wasser
	Triethylamin	100 mM Triethylamin in destilliertem entsalztem Wasser, pH 11,5
	Ammoniumthiocyanat	0,5 M Ammoniumthiocyanat in destilliertem entsalztem Wasser
	Magnesiumchlorid	1,6 M Magnesiumchlorid in destilliertem entsalztem Wasser
	ACN	Acetonitril in destilliertem entsalztem Wasser; verschiedene Volumenverhältnisse z.B.: 5 % (v/v) ACN, 12 % (v/v) ACN, 20 % (v/v) ACN
	Propionsäure	Propionsäure in destilliertem entsalztem Wasser; verschiedene Volumenverhältnisse z.B.: 0,2 % (v/v) Propionsäure, 0,5 % (v/v) Propionsäure

	ACN/Propionsäure	Acetonitril/Propionsäure-Mischungen in destilliertem entsalztem Wasser; verschiedene Volumenverhältnisse z.B.: 2,5 % (v/v) ACN, 0,2 % (v/v) Propionsäure 5 % (v/v) ACN, 0,2 % (v/v) Propionsäure 5 % (v/v) ACN, 0,5 % (v/v) Propionsäure 20 % (v/v) ACN, 1 % (v/v) Propionsäure
Proteinlösungen	OVA	10 g Ovalbumin in 1 L destilliertem entsalztem Wasser
Sonstige Lösungen	ABTS-Substratlösung	1 mg ABTS + 0,1 mL destilliertes entsalztes Wasser + 0,9 mL Substratpuffer + 1 µL H ₂ O ₂
	System A	2,5 L destilliertes entsalztes Wasser + 1,37 mL Trifluoressigsäure
	System B	0,5 L destilliertes entsalztes Wasser + 1,175 mL Trifluoressigsäure + 2,0 L Acetonitril
	Fixierlösung	40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure, destilliertes Wasser 50 % (v/v)
	Sensibilisierlösung	30 % (v/v) Ethanol, 8 mM Thiosulfat, 500 mM Natriumacetat, destilliertes Wasser
	Silberlösung	30 mM Silbernitrat in destilliertem Wasser
	Entwicklungslösung	235 mM Natriumcarbonat, 0,0185 % Formaldehyd, 0,0025 % Thiosulfat, destilliertes Wasser
	Entfärbelösung	1:1 Mischung aus 30 mM K ₃ [Fe(CN) ₆] und 100 mM Na ₂ S ₂ O ₃ * 5H ₂ O
	Reduktionslösung	10 mM Dithiothreitol + 50 mM NH ₄ HCO ₃
	Alkylierungslösung	55 mM Iodacetamid + 50 mM Ammoniumbicarbonat in Wasser
Gele	Rotiphorese Gel 30	Wässrige 30%ige Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis 37,5:1
	Trenngel	12%ig: 3,4 mL destilliertes entsalztes Wasser + 2,5 mL Tris Puffer A + 10 µL Rotiphorese 30 + 10 µL TEMED + 100 µL 10 % (w/v) APS
	Sammelgel	1,3 mL destilliertes entsalztes Wasser + 750 µL Tris Puffer B + 520 µL Rotiphorese 30 + 5 µL TEMED + 25 µL 10 % (w/v) APS

3.2 Geräte

Als Messmethoden wurden in dieser Arbeit die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS), die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS), die Umkehrphasenchromatographie (RP-HPLC), die Ellipsometrie, die UV-VIS Spektroskopie, die Kontaktwinkelbestimmung sowie die Rasterkraftmikroskopie (AFM) verwendet. Die hierfür verwendeten Geräte sind in Tabelle 7 aufgeführt:

Tabelle 7: Verwendete Messmethoden und die dazugehörigen Geräte

Messmethode	Messgerät
RIfS	Küvettenpektrometer SPEKOL 1100, Analytik Jena, Jena; modifiziert nach [Kraus 1993] mit Polymerlichtleiter (PMMA), 1 mm Durchmesser mit 1 auf 2 Faserkoppler von Laser Components, Olching und 12 V (20 W) Halostar Starlite 64425 S Halogenlampe von Osram, Augsburg. Linsen und Positioneroptik von Spindler & Hoyer, Göttingen Fluidik: Hamilton Microlab 540B Zweispritzen-Dispensor, 100 µL Spritzen und Microlab MVP mit 4-Wege-Ventil Aufsatz von Hamilton, Bonaduz
MALDI-TOF MS	Bruker Daltonics Reflex IV, Bruker, Karlsruhe
RP-HPLC	L-6200 Intelligent Pump, L-4000A UV Detector, D-7500 Integrator Schreiber, Merck Hitachi
Ellipsometrie	Spektralellipsometer ES4G, Sopra, Paris
Kontaktwinkelbestimmung	CAM 200, KSV NIMA, Espoo
UV-VIS Spektroskopie	UV-VIS Spektrometer lambda 2, Perkin Elmer, München
Rasterkraftmikroskopie (AFM)	Multimode TM SPM-Gerät, Digital Instruments, Santa Barbara

3.3 Synthesen

3.3.1 Synthese von Diclofenac aus Diclofenac-Natriumsalz

0,5 mg Diclofenac-Natriumsalz werden in 40 mL Ethylacetat gelöst und ca. 7 mL 0,1 M HCl zugegeben. Im Schütteltrichter wird anschließend die wässrige von der organischen Phase getrennt und die organische Phase solange gewaschen, bis der pH der wässrigen Phase neutral ist. Um noch vorhandenes Wasser in der organischen Phase zu binden, wird Natriumsulfat zugegeben. Nach Filtration wird das Ethylacetat abrotiert. Das entstandene Diclofenac wird trocken und kühl gelagert.

3.3.2 Synthese der Hapten-Protein Konjugate

Sowohl Diclofenac als auch Aceclofenac wurden mittels der Methode der gemischten Anhydride an BSA als Trägerprotein gekoppelt (Abbildung 15). Im Folgenden soll dies am Beispiel von Diclofenac beschrieben werden:

Diclofenac (0,1 mmol, 166x Überschuss) wird in 3 mL trockenem 1,4-Dioxan unter Rühren gelöst. Nach Zugabe äquimolarer Mengen Tributylamin und Chlorameisensäurebutylester wird die Lösung 30 min bei RT und 30 min bei 4°C gerührt.

40 mg BSA (66463 g mol^{-1} ; $6,016 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$) werden in 4 mL destilliertem Wasser gelöst und die Diclofenac-Lösung unter Rühren zugetropft. Bei zu langsamem Zutropfen fällt ein unerwünschter weißer Niederschlag aus. Aus diesem Grund sollte das Zutropfen zügig geschehen. Mit 0,1 M NaOH wird der pH auf 8,5 eingestellt und zweimal während der nächsten Stunde kontrolliert. Die Lösung wird über Nacht im Dunkeln gerührt. Nach Dialyse (destilliertes Wasser, über Nacht) wird die Lösung lyophilisiert und bei -8°C im Dunkeln aufbewahrt.

Zur Reaktionskontrolle und um das Protein/Hapten-Verhältnis abzuschätzen, wurden MALDI-TOF MS Messungen durchgeführt.

Material und Methoden

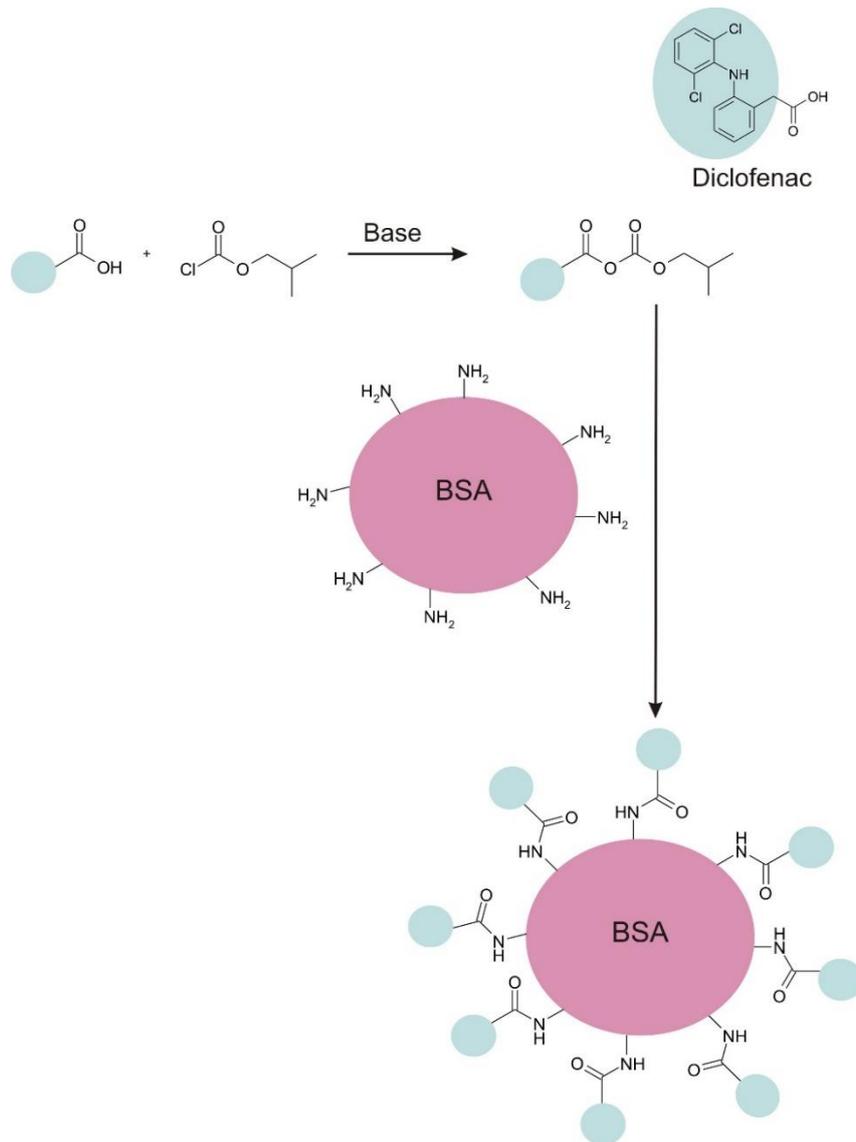


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Kopplung von Diclofenac an BSA mittels der Methode der gemischten Anhydride.

3.3.3 Festphasenpeptidsynthese

3.3.3.1 Allgemeines

Die in dieser Arbeit synthetisierten Peptide bzw. Peptid-Antigen-Konjugate wurden alle nach dem Prinzip der Festphasenpeptidsynthese hergestellt (Abbildung 4). Eine Auflistung der Drei- sowie Einbuchstabencodes der verwendeten Aminosäuren findet sich in Tabelle 8:

Tabelle 8: Drei- und Einbuchstabencode der verwendeten Aminosäuren.

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
β-Alanin	β-Ala	---
Glycin	Gly	G
L-Leucin	Leu	L
L-Lysin	Lys	K
L-Serin	Ser	S
L-Arginin	Arg	R
L-Asparaginsäure	Asp	D
L-Glutaminsäure	Glu	E

Als Harz (polymerer Träger + Linker) wurde Tritylchlorid-Polystyrol (TCP) verwendet (Abbildung 16).

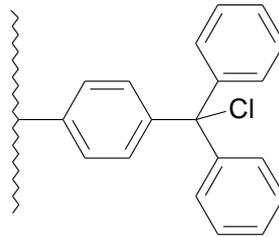


Abbildung 16: Tritylchlorid-Polystyrol Harz

Dieses ist mit 0,53 mmol L-Lysin(Boc)-Fmoc pro Gramm beladen und zu 1 % vernetzt. Als N^α-Schutzgruppe diente Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc), welches basenlabil ist. Die Schutzgruppen der Seitenketten sowie der Linker zum Harz sind säurelabil. Die verwendeten geschützten Aminosäuren sowie das geschützte Poly(ethylenglycol) sind in Tabelle 9 dargestellt:

Material und Methoden

Tabelle 9: Verwendete geschützte Aminosäuren und verwendetes geschütztes Poly(ethylenglycol). Als Schutzgruppen dienten Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc), tert-Butyl (tBu) und O-tert-Butyl (OtBu).

Verbindung	Strukturformel
Fmoc-β-Ala-OH	
Fmoc-Ser(tBu)-OH	
Fmoc-Gly-OH	
Fmoc-Lys(Boc)-OH	
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	
Fmoc-NH-PEG-COOH (9 atoms)	

3.3.3.2 Durchführung

Quellung des TCP-Harzes

50 mg TCP-Harz (26,5 μmol L-Lysin(Boc)-Fmoc) werden in einen Polypropylen (PP) -Reaktor mit Polyethylen-Fritte gegeben und ca. 1 mL DMF aufgezogen. Nach Schütteln des Reaktors für 10 min, wird das DMF wieder ausgedrückt.

Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Um die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe abzuspalten, werden 2x ca. 1 mL 40%ige Piperidin-Lösung aufgezogen und der Reaktor jeweils 5 min lang geschüttelt. Anschließend wird das Harz mit DMF 6x gewaschen.

Kopplung der Aminosäure

Die jeweilige geschützte Aminosäure (4 molarer Überschuss) wird zusammen mit TBTU (4 molarer Überschuss; 106 µmol; 34,04 mg) und HOBt (1 kleine Spatelspitze) in 1 mL DMF gelöst und 22 µL NMM (8 molarer Überschuss) zugegeben. Die Lösung wird nach Aufziehen in den Reaktor mindestens 1h lang geschüttelt. Anschließend wird 6x mit DMF gewaschen.

Dieser Reaktionszyklus wird ab der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe für alle weiteren Aminosäuren des Peptids sowie gegebenenfalls für Poly(ethylenglycol) oder Diclofenac bzw. Aceclofenac wiederholt.

Zusätzlicher Waschschrift nach der letzten Kopplungsreaktion

Im Anschluss an die letzte Kopplungsreaktion wird das Harz-Peptid-Antigen-Konjugat zusätzlich noch 3x mit Isopropanol und 3x mit Diethylether gewaschen und über einer Wasserstrahlpumpe getrocknet.

Abspaltung vom Harz und Abspaltung der restlichen Schutzgruppen

Eine kleine Spatelspitze Phenol wird in einer Lösung aus 25 µL Wasser (2,5 Vol%), 25 µL Thioanisol (2,5 Vol%) und 950 µL Trifluoressigsäure (95 Vol%) gelöst. Nach Aufziehen der Lösung in den Reaktor, wird diese 2,5 h geschüttelt.

Abtrennung des Harzes und erste Reinigungsschritte

Die Lösung wird in ca. 30 mL eisgekühlten Diethylether gegeben und 5 min auf Eis gestellt. Im Regelfall fällt bei diesem Schritt ein weißer Feststoff aus. Die Suspension wird 5 min bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wird das Pellet 2x in ca. 30 mL eisgekühltem Diethylether resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen. Das Pellet wird an RT über einer Wasserstrahlpumpe getrocknet und in einer Lösung aus System A (66,7 Vol%) und System B (33,3 Vol%) gelöst und lyophilisiert.

Fällt kein weißer Feststoff bei Zugabe zu eisgekühltem Diethylether aus (z.B. bei K-PEG-Diclofenac oder K-PEG-Aceclofenac), muss der Diethylether im Rotationsverdampfer abrotiert werden. Im Anschluss daran wird der Feststoff in Trifluorethanol, sowie System A und B gelöst und lyophilisiert.

Nach Lyophilisierung wurden die Peptid-Antigen-Konjugate mittels RP-HPLC aufgereinigt. Eine Reaktionskontrolle erfolgte unter Zuhilfenahme der MALDI-TOF MS.

Leichte Abwandlung

Wird sowohl für das Diclofenac- als auch das Aceclofenac-Peptid-Konjugat das gleiche Peptidgerüst verwendet, werden 100 mg Harz verwendet und das Peptid-Harz vor der Kopplung mit den Antigenen gewaschen, getrocknet und aufgespalten. Nach erneuter Quellung der Peptid-Harze kann die gewohnte Schrittabfolge befolgt werden.

3.4 Aufreinigungsmethoden

3.4.1 Affinitätschromatographie

3.4.1.1 Allgemeines

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Affinitätschromatographien zur hochspezifischen Aufreinigung des polyklonalen anti-Diclofenac Antikörpers aus Kaninchen Antiserum wurde sowohl Diclofenac- β Ala-SEDK als auch Diclofenac-PEG(9)-K als Erkennungsstruktur an CNBr-aktivierte Sepharose kovalent immobilisiert. CNBr-aktivierte Sepharose bietet den Vorteil, dass ihre funktionellen Gruppen ohne weitere Zusätze mit primären Aminen reagieren (Abbildung 17). Das Peptid-Antigen- bzw. das Aminosäure-Poly(ethylenglycol)-Antigen-Konjugat kann so unter milden Bedingungen an die Matrix gekoppelt werden.

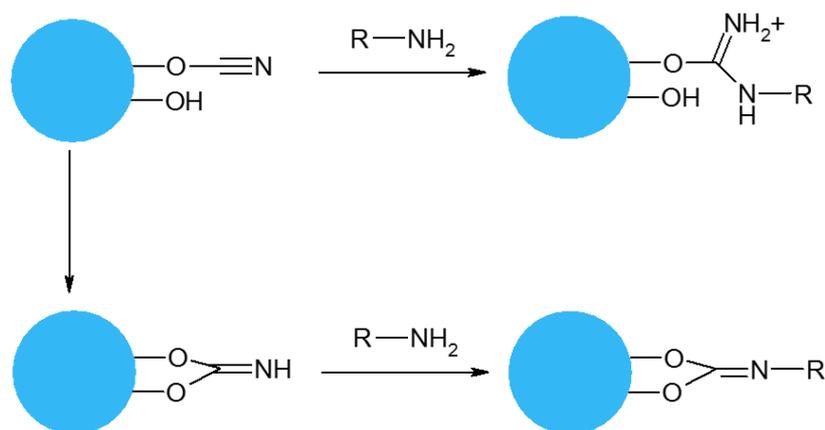


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Umsetzung von CNBr-aktiverter Sepharose mit einem primären Amin.

3.4.1.2 Herstellung der Säule

Quellen der CNBr-aktivierten Sepharose

200 mg CNBr-aktivierte Sepharose werden in einen 10 mL PP-Säule mit Fritte gegeben und 5 mL 1 mM HCl zupipettiert. Nach Schütteln für 15 min wird die Sepharose 2x mit destilliertem entsalztem Wasser und 1x mit Kopplungspuffer gewaschen.

Kopplung des Antigen-Konjugats

2 mg des Peptid-Antigen- bzw. Aminosäure-Poly(ethylenglycol)-Antigen-Konjugats werden in 1 mL Kopplungspuffer gelöst und in den Reaktor gegeben. Nach 2-stündigem Schütteln an RT wird die Säule 3x mit PBS gewaschen.

Blockierungsschritt

Ca. 7 mL Blockierungspuffer 2 werden in den Reaktor gegeben und dieser 60 min bei RT geschüttelt. Danach wird die Säule 10x mit PBS gewaschen.

Die Säule kann entweder direkt verwendet oder in PBS gelöst (+ Spatelspitze Azid) im Kühlschrank gelagert werden.

3.4.1.3 Durchführung der Affinitätschromatographie

Inkubation mit Serum

500 µL bis 5 mL Serum (je nach Aufreinigung) werden 1:1 mit PBS verdünnt, auf die Säule gegeben und über Nacht bei 4°C cyclisiert. Anschließend wird der Überstand abpipettiert (Aufbewahrung bei 4°C, Kontrolle auf anti-Diclofenac Antikörper mit indirektem ELISA). Die Säule wird mindestens 10x mit PBS gewaschen.

Elution des Antikörpers

Jeweils 1 mL Elutionsmittel wird 10x auf die Säule gegeben und das Eluat getrennt voneinander in Eppendorf Cups aufgefangen. Idealerweise liegt in den Eppendorf Cups eine „Neutralisierungslösung“ vor, um den Antikörper so schnell wie möglich in eine Umgebung zu überführen, die physiologischen Bedingungen entspricht. Die Cups werden so schnell wie möglich auf Eis gestellt.

Die Säule wird im Anschluss mehrfach mit PBS gespült und kann unter PBS (+ Spatelspitze Azid) im Kühlschrank gelagert und nochmals verwendet werden.

Abtrennung des Elutionsmittels

Sowohl ein Blindwert (Elutionsmittel + Neutralisierungslösung), als auch die Fraktionen werden im Photometer bei 280 nm vermessen. Die Fraktionen mit den höchsten Extinktionen werden zusammengeführt, gegen PBS diafiltriert und aufkonzentriert.

Nach der Aufreinigung wurden Proteingehalt (UV-VIS Spektroskopie), Reinheit (SDS-PAGE, In-Gel-Verdau, MALDI-TOF MS) und Funktionalität (indirekter ELISA, indirekter ELISA in Kombination mit Bindungshemmtest) des aufgereinigten Antikörpers bestimmt.

Material und Methoden

3.4.2 Melon Gel IgG Spin Aufreinigung

3.4.2.1 Allgemeines

Die Melon Gel IgG Spin Aufreinigung ist eine Art Klassen-spezifische Aufreinigung, bei der IgGs von anderen Proteinen des Serums wie beispielsweise Albumin oder Transferrin abgetrennt werden können. Da bei dieser Aufreinigung die Störproteine unspezifisch mit dem Melon Gel wechselwirken und gebunden werden, ist keine Elution der IgG-Antikörper von Nöten. Dies ist ein großer Vorteil gegenüber Protein A- oder Protein G-Säulen und ermöglicht die Aufreinigung der IgG-Antikörper unter physiologischen Bedingungen.

3.4.2.2 Durchführung

500 µL der Melon Gel Suspension werden in eine Spinsäule pipettiert, diese in einem Mikrozentrifugier-Cup platziert und 1 min bei 5500 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen.

Um das Gel zu waschen, werden 2x 300 µL Aufreinigungspuffer in die Spinsäule pipettiert, diese wiederum in dem Mikrozentrifugier-Cup platziert und für 10 Sekunden bei 10-15000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird wiederum jeweils verworfen.

Die Spinsäule wird unten verschlossen. 500 µL verdünntes Antiserum (Verdünnung 1:10 mit Aufreinigungspuffer) werden auf die Spinsäule gegeben und diese anschließend auch oben verschlossen. Das Antiserum wird nun 5 min mit dem Melon Gel an RT und unter end-over-end Mischen inkubiert.

Anschließend wird die Spinsäule unten und oben geöffnet, in einem Mikrozentrifugier-Cup platziert und 1 min bei 5500 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird in low-binding Eppendorf Cups überführt und Ovalbumin zur Stabilisierung zugegeben.

3.5 Immunoassayformate

3.5.1 Allgemeines

Als Immunoassay werden im Allgemeinen Methoden bezeichnet, die auf der spezifischen Wechselwirkung zwischen einem Antigen und einer biologischen Erkennungsstruktur beruhen. Je nach Konfiguration des Assays können sowohl das Antigen als auch die Erkennungsstruktur nachgewiesen werden. Immunoassayformate können nach unterschiedlichen Kriterien klassifiziert werden. So finden sie beispielsweise in homogener oder in heterogener Phase statt. Des Weiteren wird oftmals zwischen markierungsfreien und nicht-markierungsfreien Immunoassays unterschieden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Immunoassays wurden alle an einer festen Oberfläche und somit in heterogener Phase durchgeführt. Es wurden sowohl markierungsfreie Immunoassayformate (direkter Assay, Bindungshemmtest) als auch auf einer Markierung beruhende Immunoassayformate (indirekter Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), indirekter ELISA in Kombination mit einem Bindungshemmtest) verwendet.

3.5.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3.5.2.1 Allgemeines

Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISAs) werden vielfach als Werkzeug für die Diagnostik in der Human- und Veterinärmedizin, für die Lebensmittel- und Umweltanalytik oder für die Forschung verwendet.

In dieser Arbeit wurde der ELISA zum Nachweis von anti-Diclofenac Antikörper in Kaninchen Antiserum eingesetzt. Des Weiteren wurde mittels des ELISAs die Funktionalität des anti-Diclofenac Antikörpers nach verschiedenen Affinitätschromatographien untersucht. Als Assayformat wurde ein indirekter ELISA (Abbildung 18) sowie ein indirekter ELISA in Kombination mit einem Bindungshemmtest (Abbildung 19) durchgeführt. Hierfür wurden sowohl freies Diclofenac bzw. Aceclofenac, als auch die in Abschnitt 4.1.2.1 beschriebenen Peptid-Antigen-Konjugate zum Coaten der Oberfläche verwendet.

Von diesen Antigenen bzw. Peptid-Antigen-Konjugaten wurden jeweils Stammlösungen in D-PBS hergestellt ($c = 1 \text{ g L}^{-1}$), die für alle ELISAs verwendet wurden. Die Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert.

Material und Methoden

3.5.2.2 Durchführung

Beschichten der Wells (Coaten)

In jedes Well werden 100 μL der jeweiligen Antigen- bzw. Peptid-Antigen-Konjugat-Lösung ($c = 0,1 \text{ g L}^{-1}$) pipettiert. Nach Inkubation, wahlweise 1 h lang bei 37°C im ELISA-Schüttler oder über Nacht bei 4°C , werden die Wells 3x mit ELISA-Waschpuffer gewaschen.

Blockierungsschritt

Um unspezifische Wechselwirkungen mit der Oberfläche zu verhindern, werden die Wells mit 200 μL Blockierungspuffer 30 min im ELISA-Schüttler bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Wells 3x mit ELISA-Waschpuffer gewaschen.

Inkubation mit spezifischem Antikörper (Primärantikörper)

Die auf diese Weise vorbereiteten Mikrotiterplattenwells werden entsprechend der durchzuführenden Versuchsanordnung mit unterschiedlichen Verdünnungen der Antiseren bzw. mit unterschiedlichen Verdünnungen der aufgereinigten Antikörper-Lösungen inkubiert (100 μL pro Well). Zur Verdünnung wird ein Verdünnungspuffer verwendet. Nach 90-minütiger Inkubation im ELISA-Schüttler bei 37°C werden die Wells 5x mit ELISA-Waschpuffer gewaschen.

Inkubation mit anti-Kaninchen Antikörper (Sekundärantikörper)

Zum Nachweis der gebundenen spezifischen Antikörper werden die Wells mit einem anti-Kaninchen-Antikörper inkubiert (Enzym-markiert, 100 μL pro Well). Dieser liegt im Verdünnungspuffer in einer Verdünnung von 1:5000 vor. Nach einer Inkubationsdauer von 1 h im ELISA-Schüttler bei 37°C , werden die Wells 5x mit ELISA-Waschpuffer gewaschen.

Farbreaktion

In jedes Well werden 100 μL ABTS-Substratlösung pipettiert. Die ELISA-Platte wird anschließend im ELISA-Reader bei 405 nm vermessen.

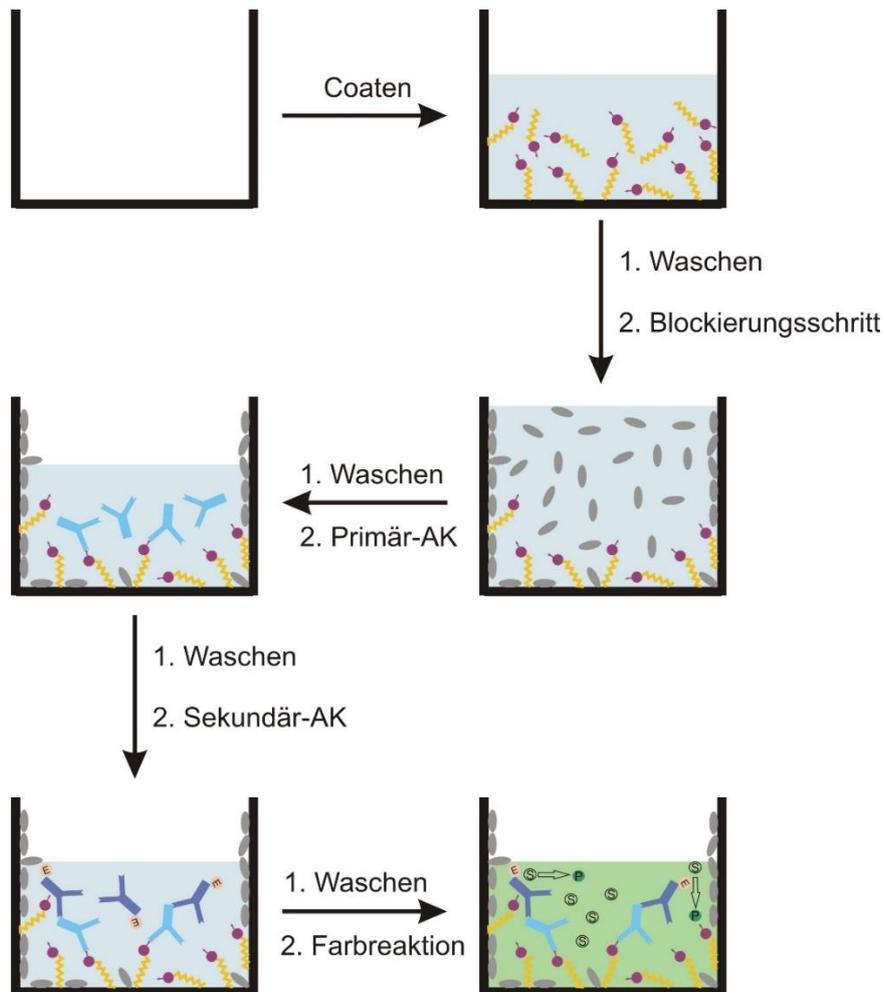


Abbildung 18: Schematische Darstellung des indirekten ELISAs

3.5.2.3 Indirekter ELISA in Kombination mit einem Bindungsinhibitionstest

Wird der indirekte ELISA mit einem Bindungshemmttest kombiniert, wird vor dem Schritt der Inkubation des ELISA-Wells mit dem spezifischen Antikörper, eben dieser Antikörper mit einer definierten Menge des Diclofenacs 30 min bei RT vorinkubiert (Abbildung 19). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsinhibitionstests wurde Diclofenac in sehr hohem Überschuss zugegeben. Demzufolge sind alle Paratope der spezifischen Antikörper abgesättigt, und es dürfte bei der Inkubation in den ELISA-Wells kein Antikörper mehr spezifisch an die Oberfläche binden. Es sollte im letzten Schritt keine Farbreaktion zu beobachten sein.

Material und Methoden

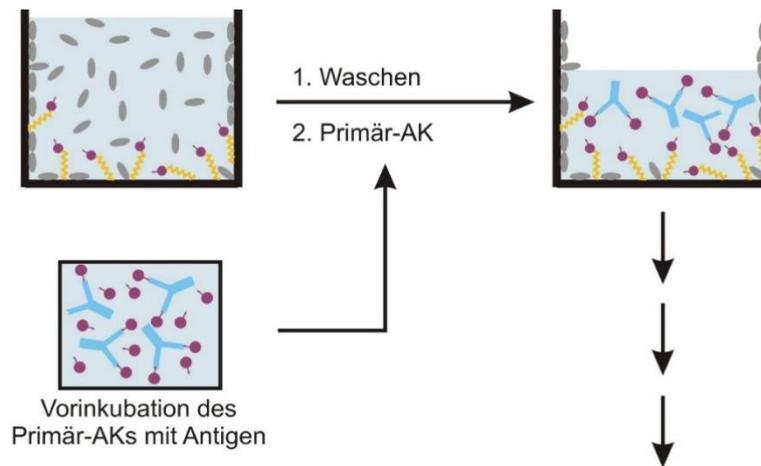


Abbildung 19: Schematische Darstellung des indirekten ELISAs in Kombination mit einem Bindungshemmtest. Die Primärantikörper werden mit einer definierten Menge des Antigens vorinkubiert.

3.5.3 Direkter Assay

Bei dem hier verwendeten direkten Immunoassay wird das Antigen-Derivat (Aceclofenac) wie in Abschnitt 3.6 beschrieben offline auf der Sensoroberfläche immobilisiert. Anschließend wird eine Lösung des spezifischen Antikörpers über die Oberfläche geleitet. Der Antikörper kann mit dem gebundenen Antigen-Derivat wechselwirken. Nicht gebundene Antikörper werden durch Spülen mit Puffer entfernt (Abbildung 20).

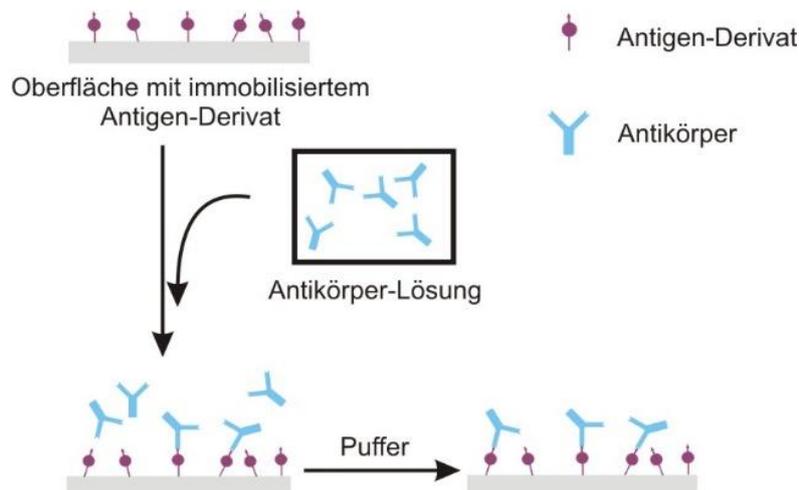


Abbildung 20: Schematische Darstellung des verwendeten direkten Assays.

Das erhaltene Bindungssignal ist proportional zur Antikörper-Konzentration, welche über die Oberfläche geleitet wird. Für eine hohe Antikörper-Konzentration wird ein hohes, für eine niedrige Antikörper-Konzentration ein niedriges Bindungssignal erhalten.

3.5.4 Bindungshemmtest

In Abbildung 21 ist der schematische Verlauf des verwendeten Bindungshemmtests dargestellt. Analog zum direkten Assay wird das Antigen-Derivat (Aceclofenac) wie in Abschnitt 3.6 beschrieben offline auf der Sensoroberfläche immobilisiert. Die Probe, welche den nachzuweisenden Analyten enthält, wird mit einer definierten Menge des Antikörpers 30 min inkubiert und anschließend über die Oberfläche geleitet. Nur Antikörper mit noch freien Bindungsstellen, können an das immobilisierte Antigen-Derivat binden.

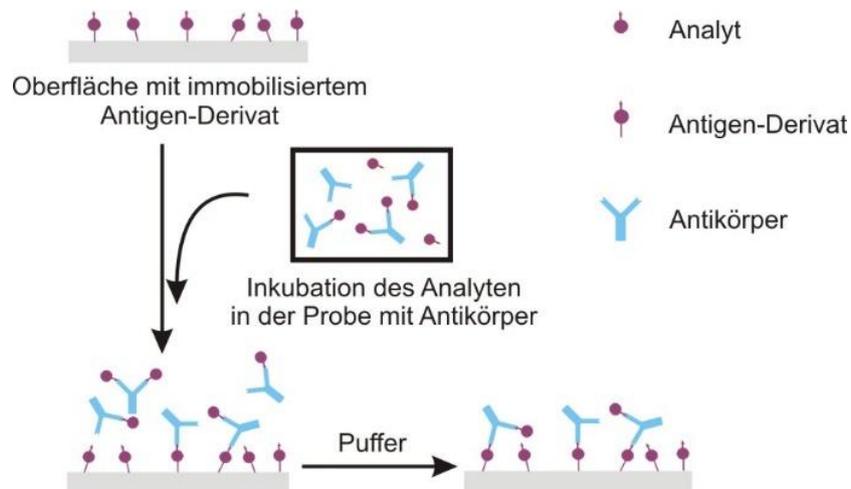


Abbildung 21: Schematische Darstellung des verwendeten Bindungshemmtests.

Das erhaltene Bindungssignal ist umgekehrt proportional zur Analyt-Konzentration in der Probe. Für eine niedrige Analyt-Konzentration in der Probe wird ein hohes, für eine hohe Analyt-Konzentration ein niedriges Bindungssignal erhalten (Abbildung 22).

Material und Methoden

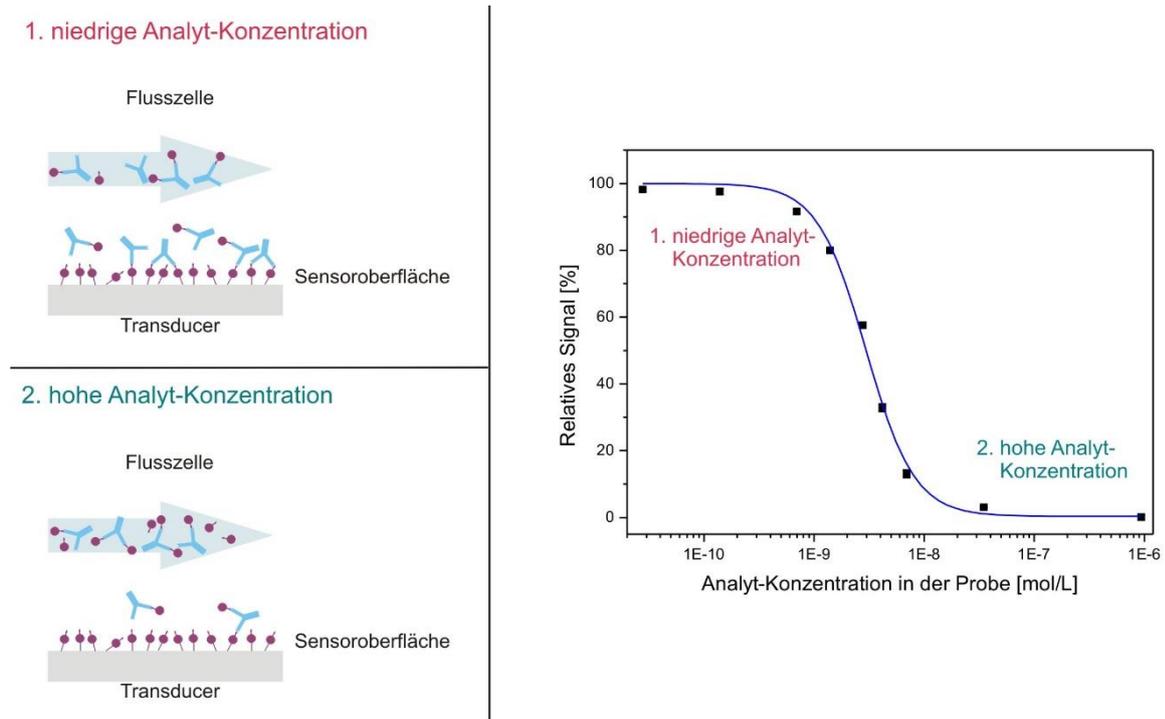


Abbildung 22: Schematische Darstellung einer Messung mit niedriger Analyt-Konzentration (1) und hoher Analyt-Konzentration (2). Die erhaltenen Bindungssignale sind umgekehrt proportional zur vermessenen Analyt-Konzentration in der Probe (rechts).

3.6 Oberflächenmodifikation der RfS Transducer

Zur Modifikation der Sensoroberflächen werden diese zuerst gereinigt und gegebenenfalls, je nach Oberflächenmaterial des Transducers, aktiviert. Bevor zur Reduzierung unspezifischer Wechselwirkungen der Matrix- bzw. Immunoassaybestandteile mit der Sensoroberfläche eine Polymerschicht aufgebracht wird, erfolgt bei den Glastransducern eine Silanisierung. Dieser Silanisierungsschritt entfällt bei den Goldtransducern. Die Modifikation der Gold-Transduceroberfläche mit dem Polymer muss jedoch im Gegensatz zu den Glas-Transducern unter Schutzgas-Bedingungen durchgeführt werden. Im Anschluss daran werden sowohl bei den Glas- als auch bei den Gold-Transducern Antigenderivate kovalent immobilisiert.

3.6.1 Glas-Transducer

Reinigung und Aktivierung

Die Glastransducer werden ca. 1 min in 6 M KOH eingelegt und anschließend mit destilliertem entsalztem Wasser abgespült. Danach werden sie ca. 15 min lang mit frisch hergestellter Piranha-Lösung im Ultraschallbad aktiviert, mit destilliertem entsalztem Wasser abgespült und im N₂-Strom getrocknet.

Silanisierung

Die Silanisierung mit 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan (GOPTS) wird im Sandwich-Verfahren durchgeführt. Hierzu werden 12 µL GOPTS auf die zu silanisierende Seite eines Transducers pipettiert. Ein zweiter Transducer wird mit der zu silanisierenden Seite auf diesen Transducer gelegt und das „Sandwich“ in einer trockenen geschlossenen Glaskammer bei RT inkubiert. Nach einer Stunde werden die Glas-Transducer mit wasserfreiem Aceton abgespült, im N₂-Strom trocken geblasen und direkt weiter modifiziert.

Immobilisierung von DA-PEG

Zur Immobilisierung von DA-PEG werden jeweils 30 µL einer DA-PEG-Lösung (4 mg DA-PEG in 1 mL Dichlormethan) auf die Glas-Transducer gegeben. Direkt im Anschluss werden die benetzten Transducer bei 70°C im Ofen mindestens 24 h inkubiert. Zum Abspülen des nicht kovalent angebindenen PEGs werden die Transducer in 70°C warmen destillierten entsalzten Wasser geschwenkt und mehrfach mit RT-warmem destillierten entsalzten Wasser abgespült. Die Trocknung der Transducer erfolgt im N₂-Strom.

Immobilisierung von Aceclofenac

Die kovalente Immobilisierung von Aceclofenac erfolgt über dessen freie Carboxyfunktion. Auch hier wird das Sandwich-Verfahren angewandt. Hierzu wird eine Lösung aus 1 mg Aceclofenac in 10 µL DMF mit 1,5 µL DIC versetzt. 12 µL dieser Lösung werden anschließend auf einen Glas-Transducer pipettiert. Ein zweiter Transducer wird mit der zu

Material und Methoden

funktionalisierenden Seite auf diesen Transducer gelegt und das „Sandwich“ mindestens 2 h in einer mit DMF gesättigten Glaskammer inkubiert. Danach werden die Transducer mit DMF und entsalztem destilliertem Wasser gespült und im N₂-Strom trocken geblasen.

Die modifizierten Glas-Transducer können über mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden.

Immobilisierung von Testosteron-3-(O-carboxymethyl)oxim

Die kovalente Immobilisierung von Testosteron-3-(O-carboxymethyl)oxim, einem Derivat des Testosterons, erfolgt analog zu der des Aceclofenacs. Auch hier wird die freie Carboxyfunktion zur Immobilisierung an die mit DA-PEG modifizierte Sensoroberfläche verwendet.

3.6.2 Gold-Transducer

Reinigung

Zur Reinigung der Gold-Transducer werden diese wahlweise mit Ethanol (0,01 % Wasser) abgespült und im N₂-Strom getrocknet oder in den Plasmaverascher gelegt.

Immobilisierung von Thiol-PEG

Zur Immobilisierung von Thiol-PEG werden die einzelnen Gold-Transducer in eine Thiol-PEG Lösung (4,2 mg DA-PEG + ca. 100 µL Triethylamin in 1,5 mL Ethanol (0,01 % Wasser)) gegeben und über Nacht inkubiert. Um ungebundenes Thiol-PEG zu entfernen, werden die Transducer mit Ethanol (0,01 % Wasser, mit Triethylamin versetzt) abgespült und in einer Ethanol (0,01 % Wasser)-Triethylamin Lösung 1 min ins Ultraschallbad gestellt. Im Folgenden werden sie mit nochmals mit Ethanol (0,01 % Wasser) abgespült und mit N₂ trockengeblasen.

Immobilisierung von Aceclofenac

Die kovalente Immobilisierung von Aceclofenac auf die Gold-Transducer erfolgt analog zu der auf die Glas-Transducer. Nach der Immobilisierung werden die Transducer jedoch statt mit DMF und Wasser, mit DMF und Ethanol abgespült.

Die Gold-Transducer können in Ethanol bei 4°C gelagert werden.

Immobilisierung von Testosteron-3-(O-carboxymethyl)oxim

Die kovalente Immobilisierung von Testosteron-3-(O-carboxymethyl)oxim, einem Derivat des Testosterons, erfolgt analog zu der des Aceclofenacs.

3.7 Reflektometrische Interferenzspektroskopie

Das Grundprinzip der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie beruht auf der Mehrfachreflexion von Licht an dünnen Schichten (Abschnitt 2.3.3 und 2.3.4). Die Intensität der reflektierten Strahlung nach Interferenz und somit das Interferenzspektrum hängt vom Aufbau (physikalische Schichtdicken, Brechungsindices) des Mehrschichtsystems ab.

In der Regel werden Transducer aus Glas verwendet. Da der Reflexionsgrad von Glas bei senkrechtem Lichteinfall (Abschnitt 2.3.2) gering ist, aber die Intensität der reflektierten Strahlung mit zunehmender Differenz der Brechungsindices angrenzender Schichten steigt, ist der Transducer aus einer Tantalpentoxidschicht zwischen zwei Siliziumdioxidschichten aufgebaut. Die oberste Siliziumdioxidschicht erleichtert hierbei die chemische Modifizierbarkeit der Transduceroberfläche. Prinzipiell können aber auch andere Transducermaterialien wie beispielsweise Gold- oder Kunststoffmaterialien für RfS-Messungen verwendet werden. In dieser Arbeit wurden sowohl RfS-Messungen auf Glas- als auch auf Gold-Transducern (Abbildung 23) durchgeführt.

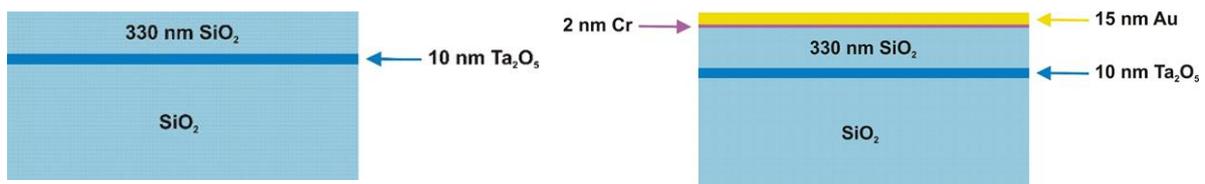


Abbildung 23: Aufbau eines Glas- (links) und eines Gold-Transducers (rechts).

3.7.1 Messaufbau

Der verwendete RfS-Messaufbau ist in Abbildung 24 schematisch dargestellt. Als Weißlichtquelle wird eine 12 V Halogenlampe verwendet. Die Lichtleitung zum und vom Transducer erfolgt dabei über einen optischen Y-Wellenleiter. Die Intensität des reflektierten Lichts wird mit einem Diodenzeilenspektrometer gemessen [Brecht 1992, Piehler (2) 1997, Moehrle 2005]. Der Transducer befindet sich in einer Flusszelle, welche an eine Hamilton Fluidik angeschlossen ist. Eine genauere Beschreibung der einzelnen Gerätekomponenten ist in Abschnitt 3.2 zu finden.

Material und Methoden

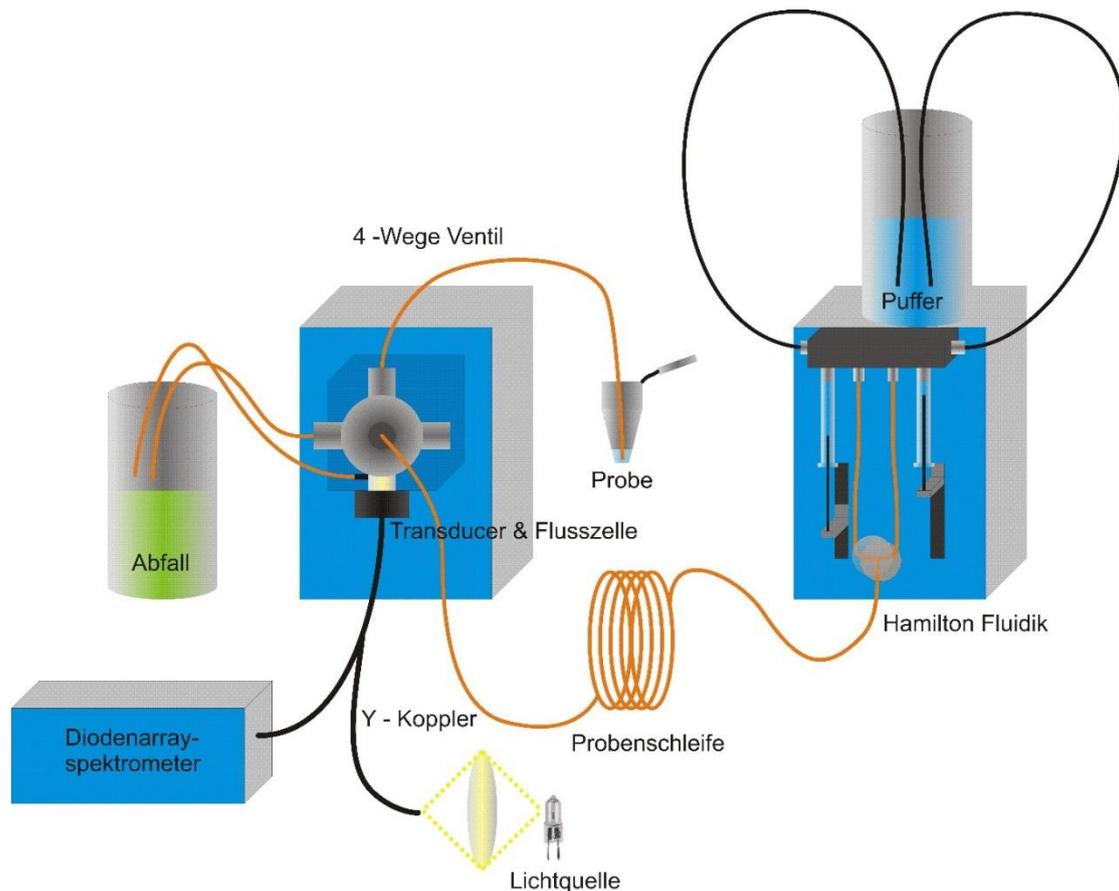


Abbildung 24: Schematische Darstellung des RfS-Messaufbaus (modifiziert nach [Hilbig 2011]).

3.7.2 Messsignal

Die in dieser Arbeit durchgeführten RfS-Messungen können in unterschiedliche Phasen untergliedert werden. Diese sind in Abbildung 25 dargestellt. Zu Beginn einer RfS-Messung wird Puffer über die Oberfläche geführt (1). Es wird eine sogenannte Baseline aufgenommen. Anschließend erfolgt die Probeninjektion, während dieser die Probe über die Sensoroberfläche geleitet wird (2). In der darauffolgenden sogenannten Dissoziation wird die Sensoroberfläche mit Puffer gespült (3). Diese Phase dient sowohl dazu, mögliche Dissoziationsprozesse an der Oberfläche zu verfolgen, als auch dazu, Bestandteile der Probenmatrix aus der Flusszelle und von der Oberfläche zu spülen. Im Anschluss daran wird die Oberfläche mit einer Regenerationslösung regeneriert (4) und abermals Puffer über die Oberfläche geleitet (5). Das hierbei erhaltene Baseline-Signal sollte im Idealfall dem zu Beginn der Messung aufgenommenen entsprechen.

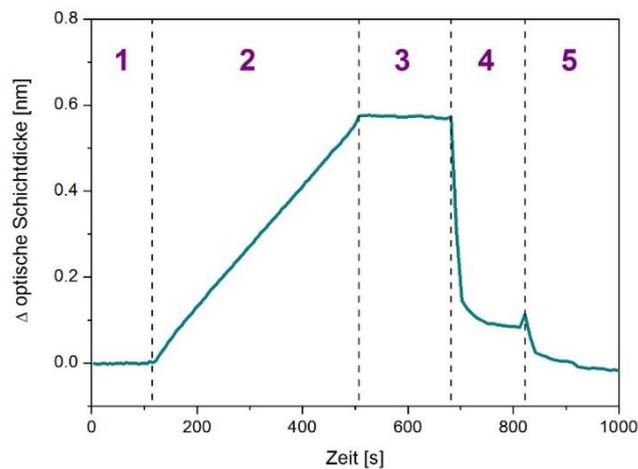


Abbildung 25: Phasen einer RfS-Messung: (1) Baseline, (2) Assoziation, (3) Dissoziation, (4) Re-generation, (5) Baseline.

3.7.3 Auswertung

Im Regelfall wird bei einer diffusions-kontrollierten RfS-Messung die Steigung während eines definierten Bereiches der Probeninjektion zur Auswertung herangezogen [Rau 2012]. Die in dieser Arbeit erhaltenen Bindungssignale in den Probenmatrices Puffer, destilliertem entsalztem Wasser und Flusswasser werden entsprechend ausgewertet.

Bindungssignale, die in der Probenmatrix Milch erhalten werden, können auf Grund der Matrix-bedingten Tyndall-Streuung nicht im Signalbereich der Probeninjektion ausgewertet werden. Die Auswertung dieser Signale erfolgt über die mittlere Höhe eines Bereichs des Bindungssignals am Ende der Dissoziationsphase (Abbildung 26, rot markiert).

Material und Methoden

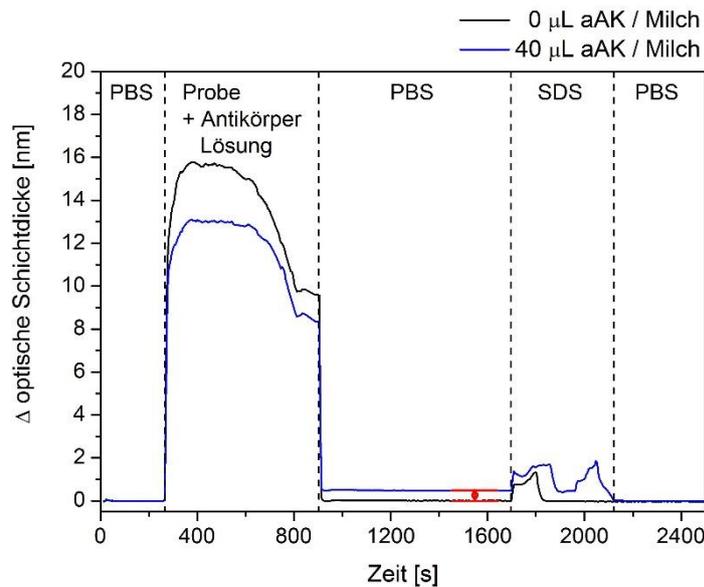


Abbildung 26: Typischer Verlauf einer Bindungskurve in der Probenmatrix Kuhmilch mit (blau) und ohne (schwarz) Zugabe von anti-Diclofenac Antikörper. Zur Auswertung wurde entweder die absolute oder die relative Signalhöhe am Ende der Dissoziationsphase verwendet.

Um von den unspezifischen Bindungen der Matrixbestandteile an der Oberfläche unabhängig zu sein und um Messungen verschiedener Milchproben, die sich in ihrer Zusammensetzung unterscheiden, zu vergleichen, ist es sinnvoll, die relative Signalhöhe und nicht die absolute Signalhöhe während eines bestimmten Zeitraums der Dissoziationsphase auszuwerten. Ist die unspezifische Bindung an die Oberfläche jedoch vernachlässigbar, wie im Falle des Diclofenac/anti-Diclofenac Systems, kann auch direkt das absolute Signal ausgewertet werden. Es werden jeweils Dreifachmessungen durchgeführt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung bestimmt.

3.7.3.1 Kalibrierung

Um eine unbekannte Analyt-Konzentration in einer Probe bestimmen zu können, muss zuvor eine Kalibrierkurve des Analyten aufgenommen werden. Diese gibt den Zusammenhang zwischen dem Signal (Signalsteigung oder -höhe) und der Analyt-Konzentration wieder. Hierzu werden verschiedene Analyt-Konzentrationen vermessen. Bei einer indirekten Analyt-Bestimmung, wie es bei einem Bindungshemmtest der Fall ist, ist das Bindungssignal umgekehrt proportional zur Analyt-Konzentration (Abschnitt 3.5.4). Die erhaltenen Bindungssignale werden auf eine Nullmessung (Dreifachmessung) referenziert. Bei dieser Messung liegt kein Analyt in der Probe vor. Das erhaltene Signal wird gleich 100 % gesetzt und alle anderen Messungen darauf bezogen.

Bei den hier vorliegenden Kalibrierkurven wird eine nichtlineare Regression mit einer vier-parametrischen Logistikkurve (Gleichung 22) [Dudley 1985] durchgeführt:

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 - \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} \quad \text{Gleichung 22}$$

Der Signalbereich zwischen der oberen (A_1) und unteren Asymptote (A_2) wird als dynamischer Signalbereich bezeichnet. Der Arbeitsbereich einer Kalibrierfunktion ist definiert als der Konzentrationsbereich, der 10 - 90 % des dynamischen Signalbereichs einschließt. X_0 gibt die Analyt-Konzentration wieder, bei der das Signal nur noch der Hälfte des Maximalsignals entspricht (IC_{50}). Hier liegt der Wendepunkt der Anpassungs-Funktion vor. Die Steigung der Tangente in diesem Punkt wird durch den Parameter p beschrieben.

Zur Berechnung der Nachweisgrenze (limit of detection, LOD) wird die Standardabweichung der Nullmessung dreimal von der oberen Asymptote abgezogen. Die Bestimmungsgrenze (limit of quantification, LOQ) wird durch die Subtraktion der zehnfachen Standardabweichung der Nullmessung von der oberen Asymptote berechnet [Incedy 1998]. Anhand der verwendeten Anpassungs-Funktion werden die so erhaltenen Signale auf die entsprechenden Analyt-Konzentrationen bezogen.

Um die so bestimmte Kalibrierkurve zu validieren, werden Wiederfindungsraten aufgenommen. Hierzu werden Proben mit bekannten Analyt-Konzentrationen versetzt und vermessen. Anhand der erhaltenen Bindungssignale und unter Zuhilfenahme der Kalibrierkurve bzw. der Logistikkfunktion werden die entsprechenden Analyt-Konzentrationen bestimmt und diese mit den tatsächlichen Konzentrationen verglichen.

Zur Aufnahme einer Kalibrierkurve oder zur Bestimmung von Wiederfindungsraten werden Diclofenac Stammlösungen in der jeweiligen Matrix hergestellt. Diese werden entsprechend der einzelnen benötigten Konzentrationen verdünnt. Zur Durchführung der Messungen in Puffer, destilliertem entsalztem Wasser oder Flusswasser werden 980 μL der Diclofenac-Standardlösungen mit 20 μL aufgereinigtem Antikörper (Melon Gel IgG Aufreinigung), zur Durchführung der Messungen in Milch 960 μL der Diclofenac-Standardlösungen mit 40 μL aufgereinigtem Antikörper versetzt.

3.8 Sonstiges

3.8.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

In dieser Arbeit wurde die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt. Dabei besteht das verwendete Gel aus einem Sammel- sowie einem Trenngel. Diese unterscheiden sich im Hinblick auf den pH-Wert, die Ionenstärke sowie die Porengröße [Laemmli 1970]. Die Trenngel-Mischung wird zügig zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen, die durch einen Abstandhalter voneinander getrennt sind (Abstand ca. 1 mm). Um sowohl eine Glättung der Gelgrenze zu erreichen als auch den Kontakt zu Sauerstoff auszuschließen, wird das Trenngel anschließend mit etwas Ethanol überschichtet.

Nach Auspolymerisation des Trenngels wird das Ethanol abpipettiert und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Um Probenaschen im Sammelgel zu erzeugen, wird ein spezieller Kamm in das Sammelgel eingesteckt. Nach ca. 20 min ist auch das Sammelgel auspolymerisiert und der Kamm kann vorsichtig entfernt werden. Als Laufpuffer wird Laemmli-Puffer verwendet.

In die Probenaschen werden jeweils 20 µL der Proben (enthalten verschiedene Antikörper-Eluate, Konzentration ca. 0,25 g L⁻¹), sowie in eine Tasche ein Größenmarker pipettiert und die Elektrophorese bei 40 mA durchgeführt. Die Proben werden zuvor mit einer Mischung aus SDS, Bromphenolblau, Glycerol und DTT im Heizblock bei 95°C behandelt. Das Gel wird mit destilliertem Wasser gewaschen und das Sammelgel entfernt. Anschließend wird eine Silberfärbung durchgeführt.

3.8.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung wird zum Anfärben von Proteinen nach der Gelelektrophorese verwendet. Sie basiert auf mehreren Schritten, die im Folgenden aufgeführt sind:

Fixierung

Das Gel wird 30 min in eine Fixierlösung eingelegt und geschwenkt. Die Fixierlösung wird anschließend wieder entfernt.

Sensibilisierung

Das Gel wird 30 min in einer Sensibilisierlösung geschwenkt. Nach Entfernen der Lösung, wird das Gel 3x 5 min lang mit destilliertem Wasser gewaschen.

Anfärben

Zum Anfärben wird das Gel 30 min in einer Silberlösung geschwenkt und anschließend 1x für 5 min mit destilliertem Wasser gewaschen.

Entwicklung

Um das Gel bis zur gewünschten Bandenintensität zu entwickeln, wird es in einer Entwicklungslösung geschwenkt. Nach dem Entfernen dieser Lösung wird Stopperlösung (5%ige Essigsäure) zugegeben und das Gel 10 min lang in dieser geschwenkt. Anschließend wird auch diese Lösung wieder entfernt.

Das entwickelte Gel kann in destilliertem Wasser kurzzeitig gelagert werden.

3.8.3 In-Gel-Verdau

Die Proteine werden in dieser Arbeit im Vorfeld mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anhand einer Silberfärbung im Gel visualisiert. Anschließend werden die zu untersuchenden Proteinbanden möglichst exakt aus- und in kleine Stückchen geschnitten und in Eppendorf-Cups überführt. Bei allen Arbeitsschritten muss darauf geachtet werden, Kreatinverunreinigungen zu vermeiden. Die Durchführung des In-Gel-Verdau ist im Folgenden beschrieben:

Entfärbung

Die Entfärbung der Gelstückchen erfolgt durch Oxidation des an die Proteine angelagerten Silbers mit Hilfe von Kaliumhexacyanoferrat. Die freiwerdenden Silbermetallionen werden mit Natriumthiosulfat komplexiert. Dies geschieht mit einer Entfärbelösung (20 µL je Eppendorf-Cup). Nach 15 min bei RT wird die Lösung entfernt, und die Gelstückchen werden 5 min lang mit In-Gel-Verdau Puffer 1 gewaschen. Nach Entfernen der Waschlösung werden 100 µL ACN zugegeben, um die Gelstückchen vollständig zu dehydrieren (10 min).

Reduktion und Alkylierung

Zur Reduktion und Alkylierung der potentiell enthaltenen Cystine bzw. Cysteine werden zuallererst die Disulfidbrücken des Proteins getrennt. Hierzu werden 100 µL einer Reduktionslösung zu den Gelstückchen zugegeben und das Ganze für 45 min bei 56°C inkubiert. Nach Entfernen der Reduktionslösung werden die Gelstückchen 30 min bei RT im Dunkeln in einer Alkylierungslösung inkubiert. Anschließend werden die Gelstückchen 15 min lang mit In-Gel-Verdau Puffer 2 und 10 min lang mit In-Gel-Verdau Puffer 1 gewaschen. Zur Dehydratisierung der Gelstückchen werden 100 µL ACN zugegeben.

Trypsin Verdau

Zum Trypsin-Verdau werden 20 µL Trypsin 3-5 min lang zugegeben.

Extraktion

Die Lösung wird in ein neues Eppendorf Cup überführt und der Verdau durch Zugabe von 10 µL 0,1%ige Trifluoressigsäure gestoppt.

Die Lösungen mit den verdauten Proteinen werden nun mittels MALDI-TOF MS untersucht.

Material und Methoden

3.8.4 Lyophilisation

Bei der Lyophilisation (Gefriertrocknung) wird das Lösemittel durch Sublimierung aus der gefrorenen Probe entfernt.

Die Protein-Hapten-Konjugate sowie die Peptide bzw. Peptid-Antigen-Konjugate werden entweder mit flüssigem Stickstoff oder bei -80°C eingefroren und anschließend bei RT lyophilisiert. Da bei der Lyophilisierung alle nichtflüchtigen Bestandteile der Lösung in der Probe verbleiben und somit keine Aufreinigung erfolgt, werden alle Proben entweder vorher mittels Dialyse weitgehend entsalzt (Protein-Hapten-Konjugate) oder mittels RP-HPLC aufgereinigt (Peptide, Peptid-Antigen-Konjugate).

3.8.5 Pufferaustausch bei Protein-Lösungen

3.8.5.1 Dialyse

Die Dialyse dient zum Entfernen von Salzen aus Proteinlösungen oder zum Lösemittel-austausch. Die synthetisierten Protein-Hapten-Konjugate werden hierfür jeweils in einen Dialyseschlauch transferiert und gegen destilliertes entsalztes Wasser (5 L) bei 4°C ca. 48 h dialysiert. Dabei wird das Wasser langsam gerührt und jeweils nach einigen Stunden ausgetauscht.

3.8.5.2 Spinsäule

Die verwendeten, kommerziell erhältlichen Spinsäulen beruhen auf dem Prinzip der Ultrafiltration. In dieser Arbeit werden sie vor allem zum Lösemittel- bzw. Pufferaustausch und zur Aufkonzentration der Eluate der Affinitätschromatographie verwendet.

3.9 Entnahme der Flusswasserproben

Es wurden von verschiedenen Flüssen Wasserproben entnommen: aus der Nagold, der Großen Enz, der Enz und der Elbe. Die Probenentnahmeorte der Nagold, der Großen Enz und der Enz sind in Abbildung 66 schematisch dargestellt.

Die Nagold ist ein 90,7 Kilometer langer Fluss in Baden-Württemberg. Ihre Quelle liegt bei Urnagold in der Gemeinde Seewald. Sie fließt vor allem durch den Schwarzwald, kurzzeitig jedoch auch durch das Heckengäu und das Pforzheimer Enztal. Abgesehen von der Großstadt Pforzheim werden nur mittelgroße Städte und Kleinstädte wie Calw, Nagold, Altensteig, Wildberg oder Bad Liebenzell sowie landwirtschaftlich betriebene Gelände oder Wälder durchflossen. Im Pforzheimer Stadtzentrum tritt die Nagold in die Enz ein.

Die Enz ist der längste linke Nebenfluss des Neckars. Sie führt ihren Namen erst ab Calmbach, wo Große Enz und Kleine Enz zusammenfließen. Die Große Enz hat zwei etwa 5 km lange Quellflüsse, den Poppelbach und den Kaltenbach, die sich in Gompelscheuer vereinigen.

Sowohl in Gompelscheuer (Große Enz) als auch in Erzgrube (Nagold) wurden Quell-nah Flusswasserproben entnommen, zudem in Pforzheim im Stadtzentrum kurz nach Zusammenfluss der Enz und der Nagold.

Die Proben wurden ca. 50 cm unter der Wasseroberfläche entnommen und sofort unter Lichtausschluss gekühlt gelagert. Zur Charakterisierung der Flusswasserproben wurden verschiedene Parameter wie Phosphat-, Nitrat-, Nitrit- oder Ammonium-Gehalt sowie pH-Wert, Wasserhärte oder gelöster organischer Kohlenstoff bestimmt.

Zudem wurde Elbewasser untersucht, welches im Stadtzentrum von Magdeburg entnommen wurde.

Sowohl das Elbewasser als auch ein Teil des Nagold-, Große Enz- und Enz-Flusswassers wurden steril filtriert und ebenso wie das unfiltrierte Flusswasser unter Lichtausschluss bei 4°C gelagert.

Material und Methoden

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung des polyklonalen anti-Diclofenac Antikörpers

Die Erkennungsstruktur ist die Schlüsselkomponente jedes Immunoassays, da durch sie die Selektivität und die Sensitivität des Assays zum Großteil bestimmt werden. Andere Parameter des heterogenen Immunoassays, wie eine geeignete Oberflächenmodifikation, sind zwar auch von immenser Bedeutung – vor allem bei Arbeiten in komplexen Probenmatrices –, aber ohne eine geeignete Erkennungsstruktur, die im idealen Fall hochaffin und selektiv den Analyt erkennt, kann kein Immunoassay entwickelt werden.

In dieser Arbeit sollen Antikörper als Erkennungsstruktur zum Nachweis von Diclofenac in verschiedenen relevanten Matrices dienen. Zwar gibt es einige wenige kommerziell erhältliche anti-Diclofenac Antikörper, jedoch sind diese relativ kostenintensiv und liegen in so geringen Volumina vor, dass eine hochspezifische Aufreinigung z.B. durch Affinitätschromatographie erschwert wird. Aus diesen Gründen wurde ein eigener polyklonaler anti-Diclofenac Antikörper hergestellt.

Da polyklonale Antikörper heterogen sind, können sich selbst unterschiedliche Chargen ein und desselben immunisierten Tieres sehr stark unterscheiden. Mittels eines eigenen Antikörpers kann somit zudem gewährleistet und sichergestellt werden, dass die für den Immunoassay verwendete Antikörper-Lösung immer der gleichen Charge entstammt. Zeit- und kostenintensive Kalibrierungen, wie sie bei jeder neuen Charge eines käuflichen polyklonalen Antikörpers durchgeführt werden müssten, entfallen.

4.1.1 Synthese der Immunogene

Diclofenac ist ein Hapten und somit zu klein, um selbst eine Immunantwort auszulösen. Es muss an ein geeignetes Trägerprotein gekoppelt werden. Das Trägerprotein sollte eine hohe Molare Masse besitzen (normalerweise größer als 20000 Da) und im Idealfall dem Tier, welches immunisiert werden soll, körperfremd sein. In dieser Arbeit wurde Rinderserumalbumin (BSA) als Trägerprotein verwendet. BSA bietet sich nicht nur durch seine wirtschaftlichen Vorteile, wie seine Kostengünstigkeit und seine gute Verfügbarkeit, sondern auch durch seine chemischen Eigenschaften an. So ist BSA im Vergleich zu anderen üblichen Trägerproteinen nicht so denaturierungsanfällig. Dies ist insbesondere dann wichtig, wenn Konjugationsverfahren eingesetzt werden, die organische Lösemittel benötigen. Des Weiteren sind BSA-Konjugate im Regelfall gut wasserlöslich und können gut isoliert und aufgereinigt werden [Law 1995, Thermo 2010].

Bei der Kopplung des Haptens an das Trägerprotein sollte vor allem das Landsteiner Prinzip beachtet werden. Demzufolge werden vor allem Antikörper gegen den Bereich des Haptens gebildet, der am weitesten von der funktionellen Gruppe des Haptens, welche zur kovalenten

Ergebnisse

Bindung an das Trägerprotein verwendet wird, entfernt ist. Die Bereiche des Haptens, die sich in der Nähe dieser Bindungsstelle befinden, werden potentiell durch das Trägerprotein sterisch abgeschirmt, wohingegen der Bereich, der am weitesten entfernt ist, am einfachsten für die zirkulierenden Lymphozyten während der Immunantwort zugänglich ist.

Die Konjugation erfolgte mit Hilfe der Methode der gemischten Anhydride [Deng 2003], bei der eine Amid-Bindung gebildet wird. Dabei wurde die Carboxyl-Gruppe des Diclofenacs genutzt. BSA auf der anderen Seite besitzt eine Vielzahl an freien Aminogruppen, somit können gute Ankopplungsraten erzielt werden.

In einem weiteren Reaktionsansatz wurde zusätzlich Aceclofenac mit BSA umgesetzt. Aceclofenac ist der Essigsäureester des Diclofenacs und weist somit einen kleinen „Spacer“ auf (Abbildung 27), der sterische Hinderungen des Trägerproteins während der Immunantwort verhindern und somit das Hapten besser zugänglich machen soll [Robinson 1975].

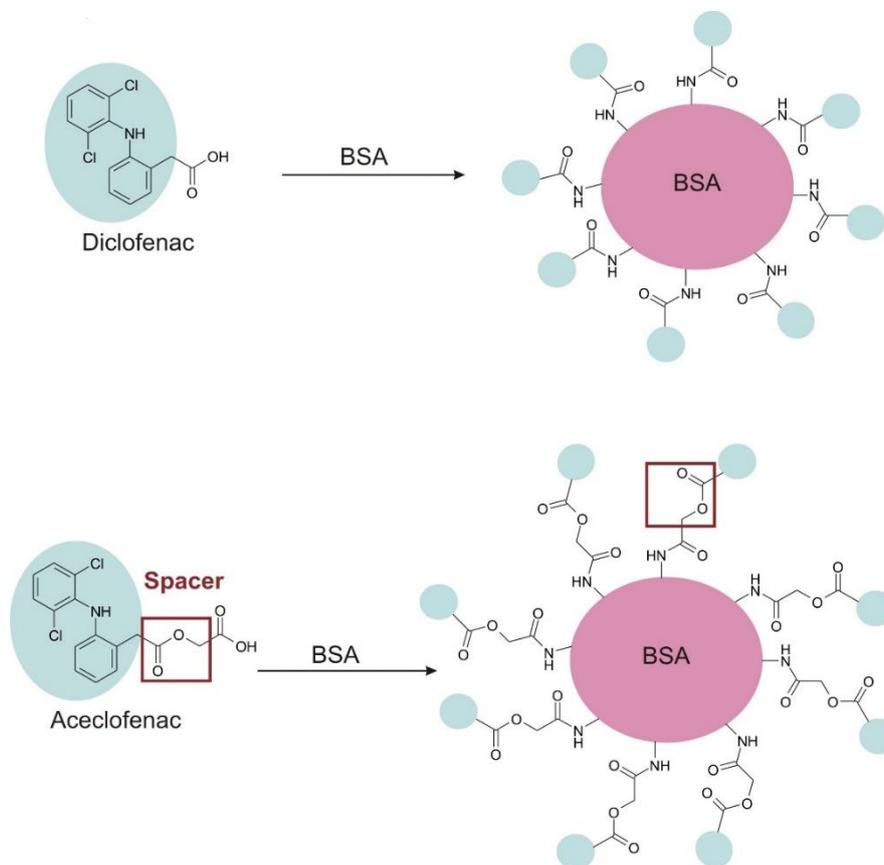


Abbildung 27: Schematische Darstellung des Diclofenac- bzw. Aceclofenac-BSA Konjugats.

Bezüglich des optimalen Hapten/Trägerprotein-Verhältnisses gibt es keine allgemein gültige Regel, da die Antikörperbildung stark vom Hapten, aber auch von den immunisierten Tieren abhängig ist [Law 1995, Niswender 1975, Thermo 2010].

In dieser Arbeit wurde versucht, ein großes Hapten/Trägerprotein-Verhältnis zu erreichen, d.h. möglichst viele Hapten Moleküle an das BSA zu koppeln. Hierzu wurde ein massiver Überschuss des Haptens (166x) in der Konjugationsreaktion verwendet (siehe Abschnitt 3.3.2).

Das Aceclofenac/BSA- bzw. Diclofenac/BSA-Verhältnis wurde mit einer MALDI-TOF MS Analyse abgeschätzt (Abbildung 28, Abbildung 29).

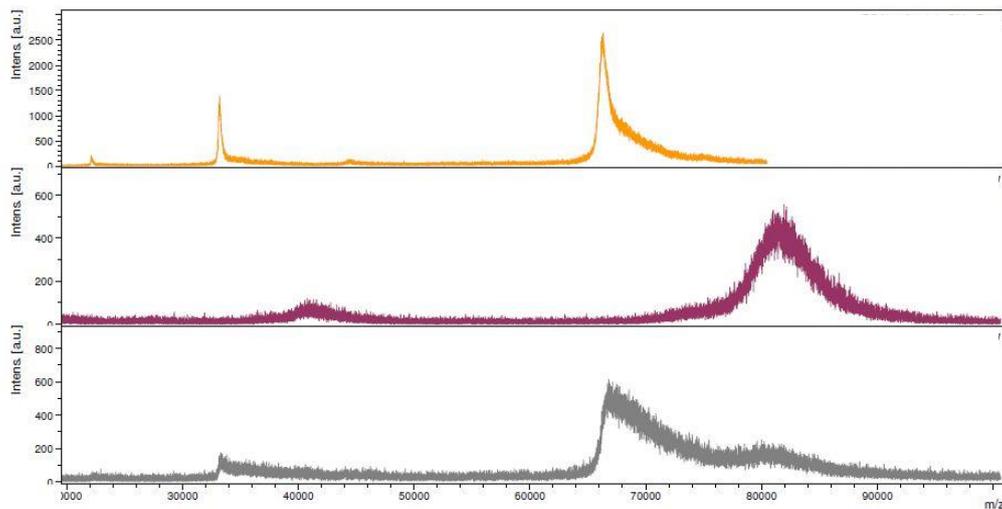


Abbildung 28: MALDI-TOF MS Analyse von BSA (gelb), Aceclofenac-BSA (lila) und einem Gemisch aus BSA und Aceclofenac-BSA (grau).

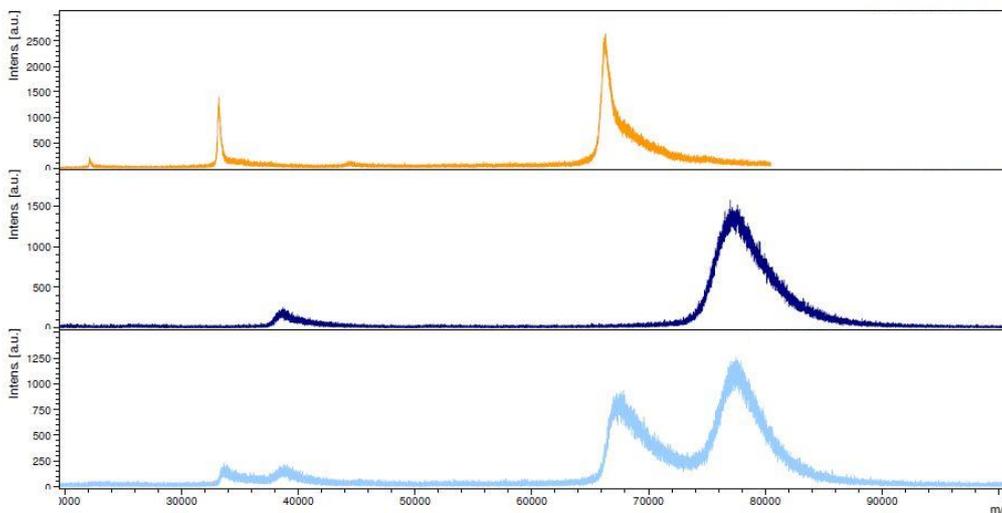


Abbildung 29: MALDI-TOF MS Analyse von BSA (gelb), Diclofenac-BSA (dunkelblau) und einem Gemisch aus BSA und Diclofenac-BSA (hellblau).

Zusätzlich wurde ein kommerziell erhältliches Diclofenac-BSA Konjugat mittels MALDI-TOF MS untersucht (Abbildung 30):

Ergebnisse

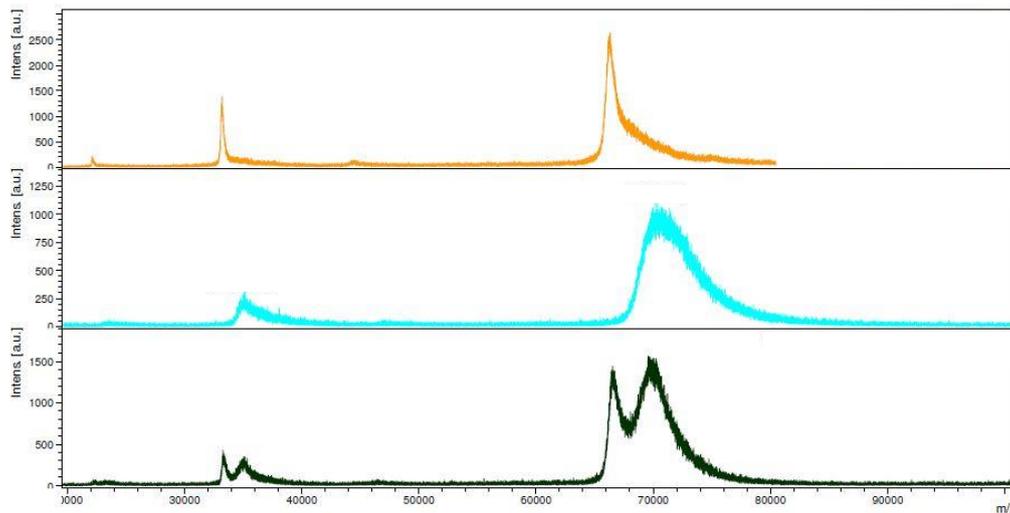


Abbildung 30: MALDI-TOF MS Analyse von BSA (gelb), kommerziellem Diclofenac-BSA (türkis) und einem Gemisch aus BSA und kommerziellem Diclofenac-BSA (dunkelgrün).

Als Referenz- und Bezugssubstanz wurde reines BSA vermessen. Es kann sowohl ein $[\text{BSA}+\text{H}]^+$, als auch ein $[\text{BSA}+2\text{H}]^{2+}$ Peak detektiert werden. Dabei ist das einfach geladene Molekül-Ion, wie zu erwarten, die dominierende Spezies [Trauger 2002]. Die gemessenen Werte der BSA-Peaks (Tabelle 10) liegen im Bereich der Literaturwerte [Sigma 2013, Sciex 2012].

Tabelle 10: Vergleich der mittels MALDI-TOF MS gemessenen BSA-Peakwerte mit Literaturwerten.

Ladungszahl (n)	$(\text{BSA}+n\text{H})^{n+}$	
	gemessen	Literaturwert
+1	66281	66098-66762 [Sigma 2013]
+2	33213	33216 [Sciex 2012]

Die gemessenen Peaks der synthetisierten Konjugate sind zu höheren m/z Werten verschoben (Tabelle 11). Dies weist nicht nur auf eine erfolgreiche Kopplungsreaktion hin, sondern ermöglicht gleichzeitig auch eine grobe Abschätzung des Hapten/BSA-Verhältnisses:

Tabelle 11: Abschätzung des Hapten/BSA-Verhältnisses unter Verwendung der Durchschnittsmassen.

Substanz (M)	m/z (M+H) ⁺	m/z (M+2H) ²⁺	Differenz zu BSA Peak (n =1)	Anzahl der Hapten Moleküle pro BSA
BSA- Aceclofenac	81006	40786	14725	43
BSA- Diclofenac	76867	38675	10586	38
BSA- Diclofenac (kommerziell)	70208	35108	3927	14

Rinderserumalbumin beinhaltet 59 Lysin-Reste und somit 59 freie Aminogruppen, davon stehen 30-35 auf der Oberfläche des Proteins zur Kopplung zur Verfügung [Harlow 1988]. Zusätzlich besitzt BSA an seinem N-Terminus eine freie Aminogruppe. Demzufolge können maximal 36 Diclofenac- bzw. Aceclofenac-Moleküle kovalent gebunden werden. Die gemessenen MALDI-TOF MS Spektren der synthetisierten Konjugate weisen auf eine vollständige Reaktion aller frei zugänglichen Aminogruppen hin. Die durch Rechnung erhaltenen leicht höheren Werte lassen sich vor allem durch die relativ breiten Peaks und die damit verbundene Messungenauigkeit bezüglich des ausgelesenen Peakmaximums erklären. Falsch wäre die Schlussfolgerung, die erhöhten Werte uneingeschränkt auf adsorbierte Hapten-Moleküle zurückzuführen. Diese werden oftmals mittels MALDI-TOF MS Analyse nicht detektiert [Wengatz 1992]. Nicht vernachlässigbar sind jedoch die Natrium- und Kalium-Addukte.

Zur möglichen Adsorption von Hapten-Molekülen an die Konjugate kann keine Aussage getroffen werden. Zwar wurde die übliche Methode der Dialyse und Lyophilisierung, aber keine anschließende Gelfiltrationschromatographie zur Aufreinigung der Immunogene durchgeführt. Durch Dialyse werden adsorbierte Moleküle in der Regel zum Teil entfernt, aber je lipophiler das Hapten ist, desto unvollständiger [Law 1995].

Das gekaufte BSA-Diclofenac beinhaltete weit weniger gekoppelte Haptene und wurde im Folgenden nicht weiter verwendet.

Mittels Rasterkraftmikroskopie-Messungen konnte zusätzlich bestätigt werden, dass an den synthetisierten Konjugaten keine freien Aminogruppen mehr vorlagen (Daten nicht gezeigt).

Die synthetisierten, lyophilisierten Konjugate wurden im Massenverhältnis 1:1 gemischt und zur Immunisierung zweier erwachsener Kaninchen verwendet. Die Immunisierung wurde extern von der Firma Pineda - Antikörperservice (Berlin) durchgeführt.

Ergebnisse

4.1.2 Kontrolle der Antikörperbildung

Um zu überprüfen, ob die immunisierten Kaninchen Antikörper gegen Diclofenac gebildet hatten, wurde ihnen in regelmäßigen Zeitabständen Blut entnommen. Das entnommene Blut wurde geronnen, und die zellulären Bestandteile abgetrennt. Die so erhaltenen Blutseren wurden mittels indirektem ELISA untersucht.

Die ELISAs wurden entsprechend der unter Abschnitt 3.5.2 beschriebenen Routine durchgeführt. Da das Coating der ELISA-Wells durch Adsorption erfolgt, spielen deren Oberflächeneigenschaften eine große Rolle. Inzwischen werden von verschiedenen Herstellern unterschiedlich modifizierte Polystyrol-Oberflächen angeboten. In dieser Arbeit wurden MaxiSorp™-Oberflächen verwendet. Diese besitzen eine hohe Affinität zu Molekülen mit gemischten hydrophilen und hydrophoben Bereichen [Esser 2007].

Prinzipiell gäbe es mehrere Möglichkeiten, die Wells der ELISA-Platte zu coaten (Abbildung 31). Mögliche Coatingsubstanzen wären:

- das Antigen oder ein Antigen-Derivat,
- ein Antigen-Protein-Konjugat (Protein z.B. Ovalbumin, Schlitzschnecken-Hämocyanin; nicht: BSA) oder
- ein Peptid-Antigen-Konjugat.

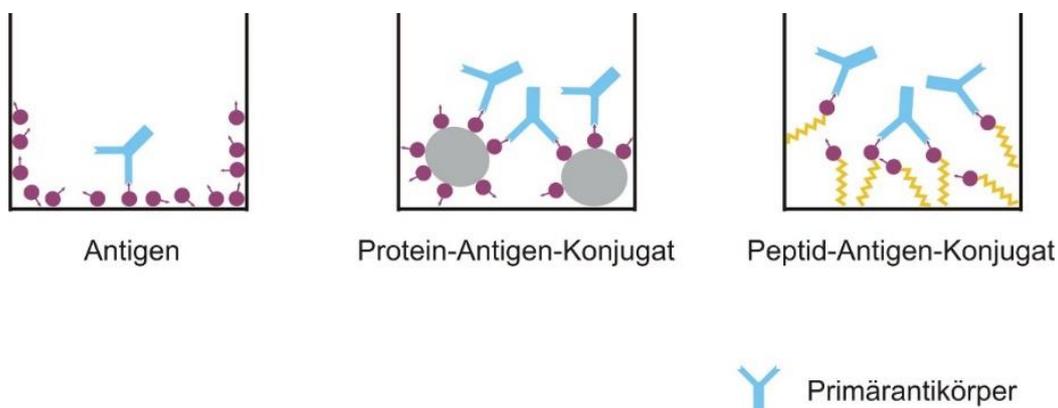


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Adsorption des Antigens (links), eines Antigen-Protein-Konjugats (Mitte) oder eines Peptid-Antigen-Konjugats (rechts) an die Oberfläche eines ELISA-Wells und die anschließende Bindung des Primärantikörpers an das Epitop des Antigens.

Das Coaten der ELISA-Wells mit Antigen (Diclofenac) bzw. Antigen-Derivat (Aceclofenac) wurde mehrmals durchgeführt, führte aber nicht zum gewünschten Erfolg (Abbildung 37, Abbildung 38). Es konnte keine Anbindung von anti-Diclofenac Antikörper nachgewiesen werden. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist das Epitop des Antigens bzw. des Antigen-Derivats für den Antikörper nicht mehr frei zugänglich. Ursächlich hierfür sind die ungerichtete Physisorption und die geringe Größe des Antigens bzw. des Antigen-Derivats. Zusätzlich ist anzunehmen, dass selbst bei frei zugänglichem Epitop der Abstand des Antigens zur Oberfläche zu gering wäre, um eine Antigen-Antikörper-Wechselwirkung zu ermöglichen. Um

vollständige Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen in der Nähe von Oberflächen erhalten zu können, sind in der Regel Spacer mit einer Länge von 4-6 Kohlenstoffbindungen unerlässlich [Bermudez 1975].

Sowohl Protein- als auch Peptid-Antigen-Konjugate sind größer und somit besser für das Coating geeignet. Protein-Antigen-Konjugate haben den Vorteil einer schnellen Synthese und Aufreinigung, sie sind aber gleichzeitig inhomogener und nicht so gut zu charakterisieren. Diese Nachteile haben Peptid-Antigen-Konjugate nicht. Zudem sind sowohl die Größe als auch die Eigenschaften der Peptid-Antigen-Konjugate durch geeignete Wahl der Aminosäuresequenz steuerbar.

In dieser Arbeit wurden dementsprechend Peptid-Antigen-Konjugate zum Coaten der ELISA-Wells verwendet.

4.1.2.1 Synthese, Aufreinigung und Charakterisierung der Peptid-Antigen-Konjugate

Verschiedene Peptid-Antigen-Konjugate wurden mittels Festphasenpeptidsynthese synthetisiert (Tabelle 12) und aufgereinigt. Als Negativkontrolle wurde ein Peptid ohne Antigen hergestellt.

Tabelle 12: Mittels Festphasenpeptidsynthese synthetisierte Peptid-Antigen-Konjugate bzw. Peptide.

Diclofenac-βAla-Ser-Gly-Ser-Lys	(Diclofenac-βAla-SGSK)
Aceclofenac-βAla-Ser-Gly-Ser-Lys	(Aceclofenac-βAla-SGSK)
Diclofenac-βAla-Glu-Asp-Lys	(Diclofenac-βAla-EDK)
Aceclofenac-βAla-Glu-Asp-Lys	(Aceclofenac-βAla-EDK)
Diclofenac-βAla-Glu-Arg-Lys	(Diclofenac-βAla-ERK)
Aceclofenac-βAla-Glu-Arg-Lys	(Aceclofenac-βAla-ERK)
Diclofenac-βAla-Ser-Glu-Asp-Lys	(Diclofenac-βAla-SEDK)
Diclofenac-PEG(9)-Lys	(Diclofenac-PEG(9)-K)
Aceclofenac-PEG(9)-Lys	(Aceclofenac-PEG(9)-K)
βAla-Ser-Gly-Ser-Lys	(βAla-SGSK)

Einige der synthetisierten Peptid-Antigen-Konjugate wurden nicht nur zur Kontrolle der polyklonalen Antikörperbildung sondern auch zur Affinitätsaufreinigung des gebildeten Antikörpers verwendet.

Die Aufreinigung der Konjugate erfolgte mit RP-HPLC, die Charakterisierung mittels MALDI-TOF MS. Dies soll im Folgenden exemplarisch anhand der Konjugate Diclofenac-βAla-SGSK und Diclofenac-PEG(9)-K beschrieben werden.

Ergebnisse

Diclofenac-βAla-SGSK

In Abbildung 32 ist das erhaltene RP-HPLC-Chromatogramm abgebildet. Mittels MALDI-TOF MS konnte das Hauptsignal des RP-HPLC-Chromatogramms Diclofenac-βAla-SGSK zugeordnet werden.

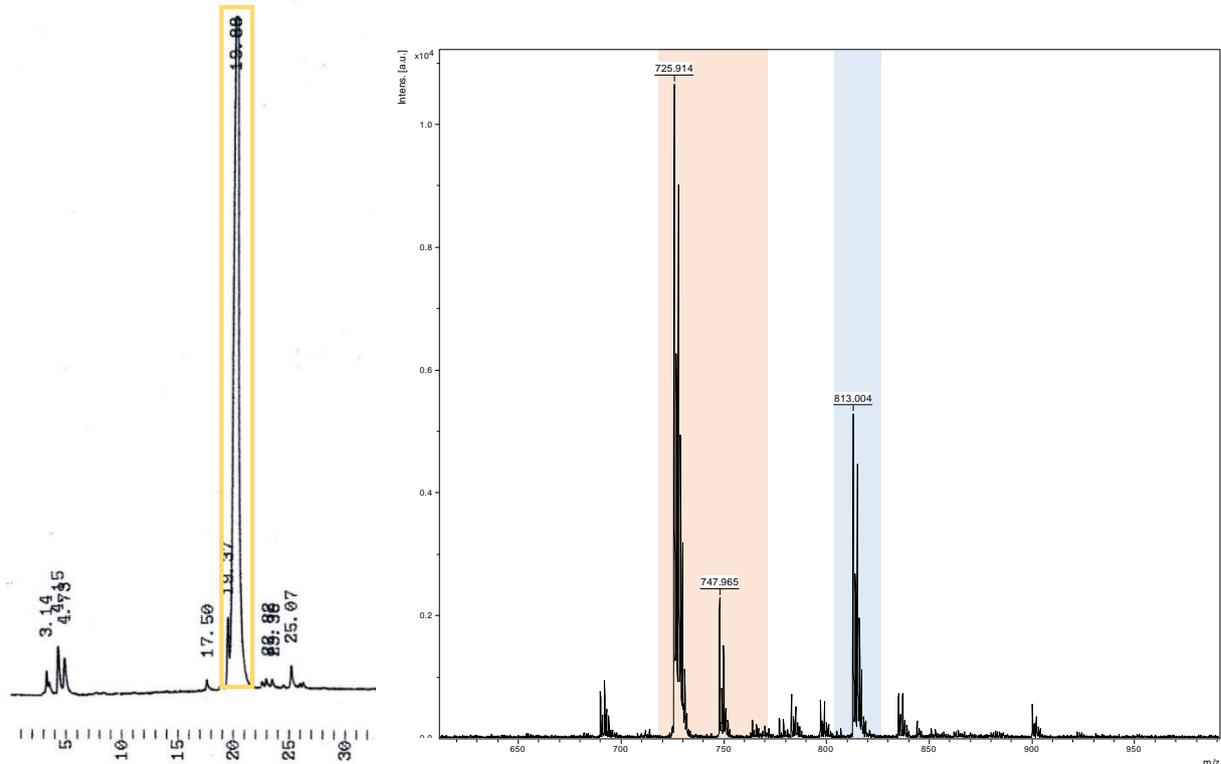


Abbildung 32: links: RP-HPLC Chromatogramm (Gradient: 5 % → 80 % System B, 30 min) nach Festphasenpeptidsynthese des Peptid-Antigen-Konjugats Diclofenac-βAla-SGSK. Die x-Achse entspricht der Retentionszeit in Minuten.

Rechts: MALDI-TOF MS Spektrum der Fraktion mit der Elutionszeit 19,99 min.

Neben dem $[M+H]^+$ -Pseudomolekülion, findet man auch die Natrium- und Kalium-Addukte ($[M+Na]^+$, $[M+K]^+$; Tabelle 13). Zusätzlich sind aber auch Peaks von Nebenprodukten zu erkennen. Die Masse des Nebenproduktes bei 813,004 könnte rein rechnerisch durch ein zusätzliches Serin in der Peptidkette erklärt werden.

Tabelle 13: Peakzuordnung des MALDI-TOF MS-Spektrums. Im Folgenden wurde die Annahme $z = 1$ getroffen. Für die Berechnung der Molaren Massen wurden die monoisotopischen Massen der Elemente verwendet. M entspricht Diclofenac- β Ala-SGSK.

Gemessene m/z	Berechnete Masse [Da]	Peakzuordnung	Produkt
725,914	726,234	[M+H] ⁺	Diclofenac- β Ala-SGSK
747,965	748,224	[M+Na] ⁺	Diclofenac- β Ala-SGSK
764,021	764,324	[M+K] ⁺	Diclofenac- β Ala-SGSK
813,004			Nebenprodukt

Prinzipiell wäre es möglich, das Konjugat weiter aufzureinigen z.B. durch geeignete Anpassung des Lösemittel-Gradienten. Dies ist aber nicht nötig. Für die Verwendung des Konjugats als Coating Material des indirekten ELISAs reicht die Reinheit aus. Zudem scheint das Nebenprodukt nur ein Serin mehr im Peptidgerüst zu besitzen und wäre somit auch problemlos als Konjugat einsetzbar.

Diclofenac-PEG(9)-K

Dieses Konjugat wurde bisher vereinfacht auch als Peptid-Antigen-Konjugat bezeichnet, ist aber eigentlich ein Aminosäure-Poly(ethylenglycol)-Antigen-Konjugat. Poly(ethylenglycol) wird oftmals in Immunoassays zur Abschirmung von Oberflächen bezüglich unspezifischer Wechselwirkungen von Assay- oder Matrixbestandteilen eingesetzt. Demzufolge bietet es sich auch als Antigen-Konjugat für das Coaten der ELISA-Wells an. Zusätzlich soll es für die Affinitätsaufreinigung des Antikörpers verwendet werden (Abschnitt 4.2.2.1).

Auch bei diesem Konjugat wurden nach der RP-HPLC Auftrennung MALDI-TOF MS-Spektren aufgenommen (Abbildung 33).

Ergebnisse

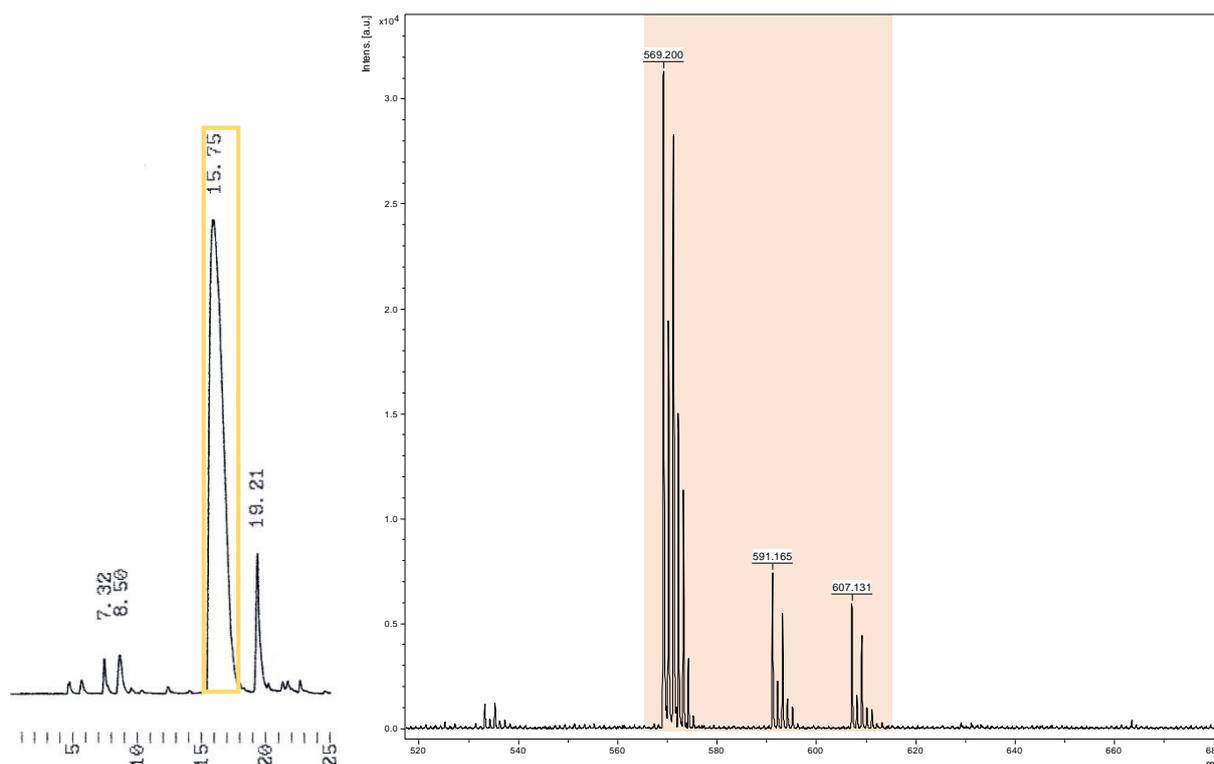


Abbildung 33: links: RP-HPLC Chromatogramm (Gradient: 10 % → 80 % System B, 30 min) nach Festphasenpeptidsynthese des „Peptid“-Antigen-Konjugats: Diclofenac-PEG(9)-K. Die x-Achse entspricht der Retentionszeit in Minuten.

Rechts: MALDI-TOF MS-Spektrum der Fraktion nach 15,75 min.

Die gefundenen Peaks der Hauptfraktion entsprechen dem erwarteten $[M+H]^+$ -Pseudomolekülion sowie den Natrium- und Kalium-Addukten ($[M+Na]^+$, $[M+K]^+$) (Tabelle 14). Es sind keine Nebenprodukte im MALDI-TOF MS Spektrum zu erkennen.

Tabelle 14: Peakzuordnung des MALDI-TOF MS-Spektrums. Im Folgenden wurde die Annahme $z = 1$ getroffen. Für die Berechnung der Molaren Massen wurden die monoisotopischen Massen der Elemente verwendet. M entspricht Diclofenac-PEG(9)-K.

Gemessene m/z	Berechnete Masse [Da]	Peakzuordnung	Produkt
569,200	569,185	$[M+H]^+$	Diclofenac-PEG(9)-K
591,165	591,175	$[M+Na]^+$	Diclofenac-PEG(9)-K
607,131	607,275	$[M+K]^+$	Diclofenac-PEG(9)-K

Das Diclofenac-PEG(9)-K liegt nach der RP-HPLC rein vor.

Anhand dieser Konjugatsynthese und -aufreinigung soll auf ein bei allen Konjugaten entstandenes Nebenprodukt hingewiesen werden: alle synthetisierten Konjugate beinhalteten die Aminosäure Lysin, deren Aminogruppe der Seitenkette mittels einer Boc-Schutzgruppe während der Festphasensynthese geschützt war. Diese wird wie alle anderen verwendeten orthogonalen Schutzgruppen am Ende unter Säurezugabe abgespalten. Als Zwischenprodukt entsteht hierbei ein Carbokation (Abbildung 34):

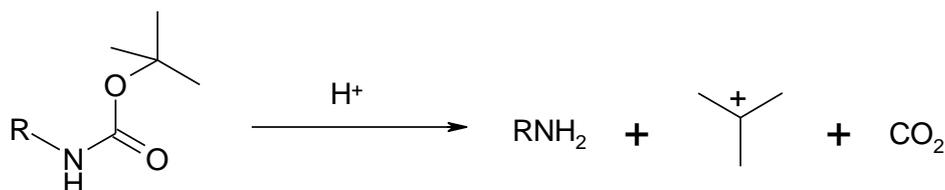


Abbildung 34: Abspaltung der Boc-Schutzgruppe unter Zugabe von Säure.

Dieses Carbokation kann mit einem aromatischen System, wie es in Diclo- bzw. Aceclofenac vorliegt, unter elektrophiler aromatischer Substitution reagieren. Zwar soll diese Nebenreaktion durch Phenolzugabe verhindert werden, aber das in Abbildung 35 dargestellte MALDI-TOF MS Spektrum der Fraktion mit der Retentionszeit 19,21 min zeigt, dass dies nicht vollständig der Fall war.

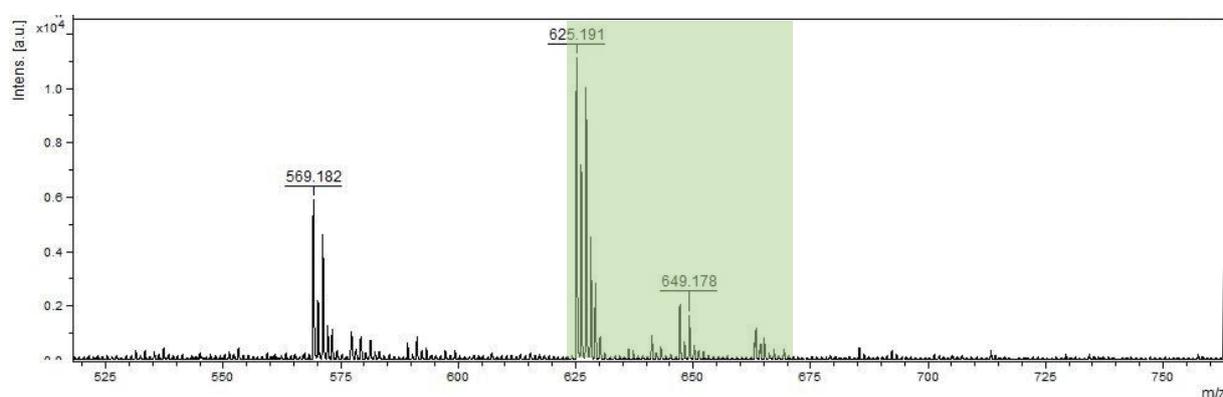


Abbildung 35: MALDI-TOF MS-Spektrum der Fraktion mit der Retentionszeit 19,21 min.

Diclofenac(tBu)-PEG(9)-K ist als Nebenprodukt entstanden (Tabelle 15).

Tabelle 15: Peakzuordnung des MALDI-TOF MS-Spektrums. Im Folgenden wurde die Annahme $z = 1$ getroffen. Für die Berechnung der Molaren Massen wurden die monoisotopischen Massen der Elemente verwendet. X entspricht Diclofenac(tBu)-PEG(9)-K, wobei am aromatischen System des Diclofenacs ein H durch tBu substituiert ist.

Gemessene m/z	Berechnete Masse [Da]	Peakzuordnung	Produkt
625,191	625,247	$[\text{X}+\text{H}]^+$	Diclofenac(tBu)-PEG(9)-K
647,178	647,237	$[\text{X}+\text{Na}]^+$	Diclofenac(tBu)-PEG(9)-K
662,203	662,337	$[\text{X}+\text{K}]^+$	Diclofenac(tBu)-PEG(9)-K

Die sich bereits an den Aromaten befindenden Substituenten haben einen Einfluss auf die Reaktivität und den Ort der Substitution (Abbildung 36).

Ergebnisse

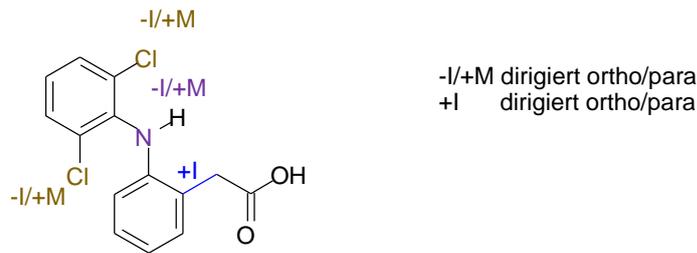


Abbildung 36: Mesomere und induktive Effekte der Substituenten der Aromaten des Diclofenacs.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass das Carbokation an den aromatischen Ring mit den Chlorsubstituenten dirigiert wird. Dies ist aber auch das Epitop des Diclofenacs. Demzufolge kann dieses Nebenprodukt, welches bei der obig dargestellten RP-HPLC bereits abgetrennt wurde, nicht weiter verwendet werden.

Nach der Aufreinigung und Charakterisierung wurden alle Konjugate lyophilisiert gelagert.

4.1.2.2 Kontrolle der Antikörperbildung mittels indirektem ELISA

Die Immunantwort ist oft von Tier zu Tier sehr unterschiedlich, selbst bei Tieren gleicher Rasse. Aus diesem Grund ist es vorteilhaft, möglichst viele Tiere gleichzeitig zu immunisieren [Copley 1996, Rehm 2006]. Jedoch müssen hierbei auch wirtschaftliche Gesichtspunkte in Erwägung gezogen werden und eine sorgfältige Kosten-Nutzen Rechnung erfolgen. Zur Herstellung des anti-Diclofenac Antikörpers wurden zwei erwachsene Kaninchen immunisiert. Die Kaninchenserum wurden erstmals 90 Tage nach Immunisierung der Tiere mittels indirektem ELISA auf anti-Diclofenac Antikörper untersucht. Im Anschluss daran erfolgten jeweils im Zeitabstand von je 30 Tagen weitere Kontrollen.

Als Negativkontrolle wurde das Peptid β Ala-SGSK verwendet. Als Positivkontrolle diente ein kommerziell erhältlicher anti-Diclofenac Antikörper. In Abbildung 37 ist exemplarisch ein indirekter ELISA dargestellt. In diesem wurden Kaninchenserum, welche 90, 120 und 150 Tagen nach Immunisierung entnommen wurden, auf die Bildung von anti-Diclofenac Antikörpern untersucht.

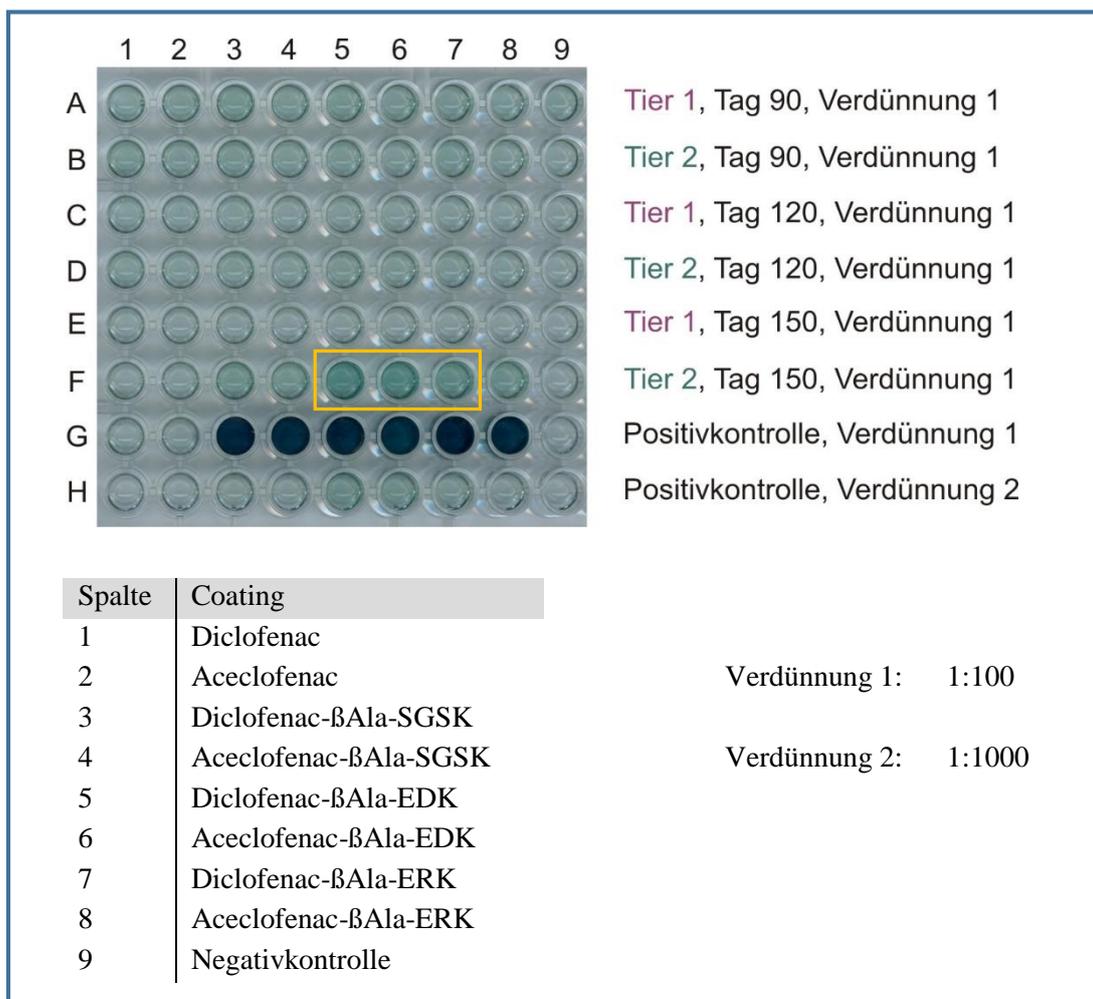


Abbildung 37: Indirekter ELISA der Kaninchenseren 90, 120 und 150 Tagen nach Immunisierung, sowie Positivkontrolle durch kommerziell erhältlichen anti-Diclofenac Antikörper.

Beide Tiere zeigten bis zu 120 Tage nach Immunisierung keine anti-Diclofenac Antikörper Bildung. Erst das Antiserum von Tier 2, welches 150 Tage nach Immunisierung entnommen wurde, enthält den gewünschten Antikörper. Im Gegensatz dazu zeigte Tier 1 nach wie vor keine Immunantwort auf Diclofenac.

Da die durchgeführten indirekten ELISAs in dieser Arbeit nur qualitativ und nicht quantitativ ausgewertet werden sollten, wurde die Farbreaktion nicht nach einer definierten Zeit gestoppt. Demzufolge sind verschiedene durchgeführte ELISAs auch nur qualitativ vergleichbar. Quantitativ vergleichbar sind jedoch die Absorptionswerte innerhalb eines einzelnen ELISAs. Für den in Abbildung 37 dargestellten indirekten ELISA wurden die in Tabelle 16 dargestellten Absorptionswerte gemessen:

Ergebnisse

Tabelle 16: Absorptionswerte des indirekten ELISAs, ermittelt mittels ELISA Reader (Absorption bei 405 nm).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0,277	0,269	0,325	0,297	0,314	0,291	0,294	0,238	0,267
B	0,333	0,266	0,307	0,271	0,271	0,243	0,286	0,231	0,192
C	0,254	0,215	0,249	0,201	0,226	0,205	0,190	0,195	0,186
D	0,301	0,235	0,276	0,233	0,318	0,257	0,269	0,223	0,186
E	0,198	0,203	0,187	0,163	0,181	0,148	0,159	0,148	0,151
F	0,221	0,204	0,431	0,357	0,876	0,7759	0,562	0,472	0,182
G	0,221	0,199	OVER	OVER	OVER	OVER	OVER	OVER	0,153
H	0,123	0,117	0,207	0,160	0,410	0,380	0,256	0,208	0,123

Die Absorptionswerte der Negativkontrollen (Spalte 9) deuten auf sehr geringe unspezifische Wechselwirkungen der Matrixbestandteile sowie der Primär- und Sekundärantikörper mit der Oberfläche hin. Dennoch wurden die erhaltenen Absorptionswerte der einzelnen Antiseren um den Betrag der unspezifischen Wechselwirkung korrigiert. Hierfür wurden die Absorptionswerte der Negativkontrollen von den anderen Absorptionswerten der jeweiligen Zeile subtrahiert (Tabelle 17).

Tabelle 17: Absorptionswerte des indirekten ELISAs, ermittelt mittels ELISA Reader (Absorption bei 405 nm). Die Absorptionswerte der Negativkontrollen wurden von den anderen Absorptionswerten der jeweiligen Zeile subtrahiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0,011	0,002	0,058	0,030	0,047	0,025	0,028	-0,029	0,000
B	0,141	0,074	0,115	0,079	0,079	0,051	0,094	0,039	0,000
C	0,068	0,028	0,063	0,015	0,040	0,019	0,003	0,009	0,000
D	0,115	0,049	0,090	0,046	0,131	0,070	0,083	0,036	0,000
E	0,046	0,051	0,035	0,012	0,030	-0,003	0,008	0,000	0,000
F	0,038	0,021	0,248	0,175	0,6943	0,594	0,3798	0,2905	0,000
G	0,068	0,046	OVER	OVER	OVER	OVER	OVER	OVER	0,000
H	0,000	-0,006	0,083	0,036	0,286	0,256	0,133	0,085	0,000

Die erhaltenen Absorptionswerte zeigen nun deutlich, was Abbildung 37 visuell erahnen ließ: 150 Tage nach Immunisierung zeigt Tier 2, ganz im Gegensatz zu Tier 1, eine Immunantwort. Anti-Diclofenac Antikörper wurde gebildet.

Wie bereits in Abschnitt 4.1.2 beschrieben, eignen sich Diclofenac bzw. Aceclofenac nicht zum Coaten der ELISA-Wells (Spalte 1 und 2). Auch bei der Positivkontrolle kann hier kein Signal erhalten werden (Spalte 1 und 2, Zeile G).

Die synthetisierten Peptid-Antigen Konjugate sind hingegen prinzipiell alle als Coatingsubstanzen einsetzbar. Als Linker wurden hierbei verschiedene Aminosäuresequenzen

gewählt und auf ihre Eignung untersucht. Die Sequenz SGSK zeichnet sich durch viele polare Seitenketten, die Sequenz EDK vor allem durch negativ geladene Seitenketten (Glu und Asp) und die Sequenz ERK vor allem durch positiv geladene Seitenketten (Arg und Lys) aus. Am geeignetsten scheinen Aminosäuresequenzen mit geladenen - insbesondere mit negativ geladenen Seitenketten - wie in Diclofenac- bzw. Aceclofenac-βAla-EDK, zu sein.

Beiden Tieren wurde erneut Immunogen injiziert und wiederum nach 30 Tagen (Tag 180) Blut entnommen. Auch 180 Tage nach der ersten Immunisierung hat Tier 1 keine anti-Diclofenac Antikörper gebildet (Abbildung 38).

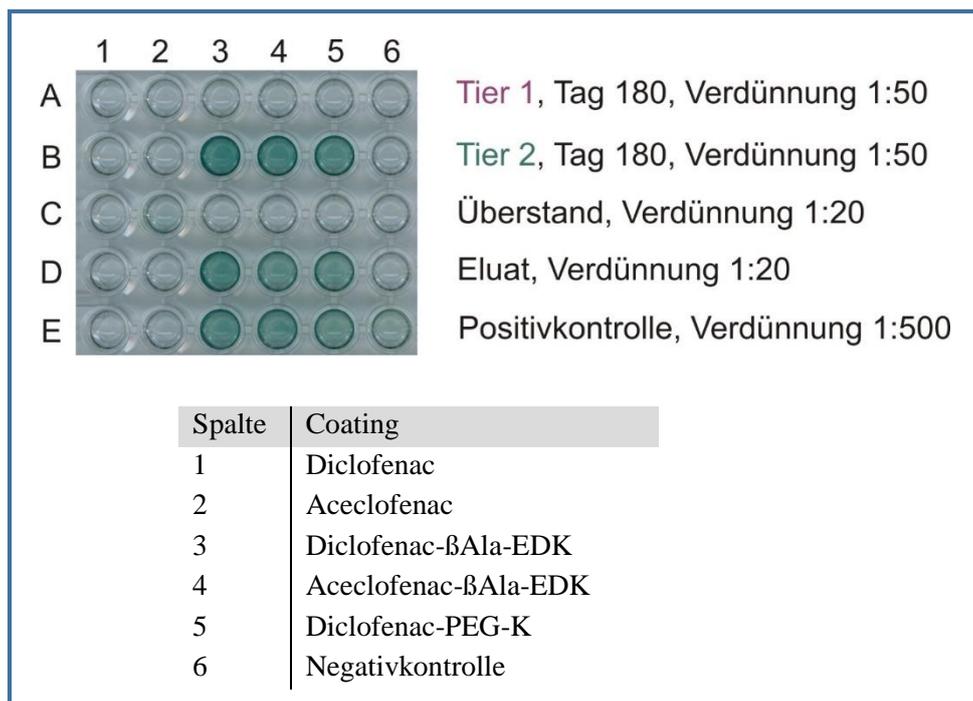


Abbildung 38: Indirekter ELISA der Seren von Tier 1 und Tier 2 180 Tage nach Immunisierung, sowie Positivkontrolle anhand eines kommerziell erhältlichen anti-Diclofenac Antikörpers. Zusätzlich wurden der Überstand und das Eluat einer Affinitätschromatographie auf Anwesenheit von anti-Diclofenac Antikörper untersucht.

Dies wird auch durch die gemessenen Absorptionswerte bestätigt (Tabelle 18):

Tabelle 18: Absorptionswerte des indirekten ELISAs. Die Absorptionswerte der Negativkontrollen wurden von den anderen Absorptionswerten der jeweiligen Zeile subtrahiert.

	1	2	3	4	5	6
A	0,019	0,029	0,037	0,023	-0,024	0,000
B	0,031	-0,008	OVER	OVER	OVER	0,000
C	0,006	0,519	0,021	0,035	-0,033	0,000
D	-0,015	-0,032	OVER	2,251	2,378	0,000
E	0,003	-0,012	OVER	OVER	2,225	0,000

Ergebnisse

Kaninchen 2 wurde 180 Tage nach der ersten Immunogen-Injektion ein drittes Mal Immunogen injiziert und am 210. Tag ausgeblutet.

In dem in Abbildung 38 dargestellten indirekten ELISA sind bereits erste Ergebnisse der Affinitätschromatographie dargestellt, auf die in Abschnitt 4.2.2.2 näher eingegangen werden soll. Aus diesem Grund sollen hier nur die Randdaten erläutert werden: Als Antigen-Konjugat für die Affinitätschromatographie wurde in diesem Fall Diclofenac-PEG-K verwendet. Die Elution wurde mit einer ACN/Propionsäure-Mischung (20 Vol% ACN, 1 Vol% Propionsäure in destilliertem entsalzten Wasser) durchgeführt. Der indirekte ELISA bestätigt die erfolgreiche Durchführung der Affinitätsaufreinigung: im Eluat kann anti-Diclofenac Antikörper, im Überstand der Säule (Serum nach Affinitätsaufreinigung) kann kein anti-Diclofenac Antikörper mehr nachgewiesen werden.

4.2 Antikörperaufreinigung

In der Regel liegt der nachzuweisende Analyt in einer komplexen Probenmatrix wie beispielsweise Milch oder Flusswasser vor. Matrixeffekte zu reduzieren oder zu eliminieren, ist bei der Entwicklung und Etablierung von Immunoassays von essentieller Bedeutung, aber auch zeit- und kostenintensiv. Umso elementarer ist demzufolge, dass nicht noch zusätzliche Matrixeffekte durch die Matrices der Immunoassay-Bestandteile hinzukommen. Sowohl der verwendete kommerziell erhältliche, als auch der selbst hergestellte anti-Diclofenac Antikörper liegen in Kaninchen Serum vor. Serum selbst ist eine komplexe Matrix, die aus einer Vielzahl von Proteinen wie Albumin oder Globulinen besteht. Diese können potentiell mit den Immunoassay-Bestandteilen oder der Immunoassay-Oberfläche wechselwirken und somit das spezifische Bindungssignal eines Immunoassays stören. Um den Einfluss des Kaninchenserums auf den Immunoassay zu untersuchen, wurden RfS-Messungen durchgeführt (Abbildung 39).

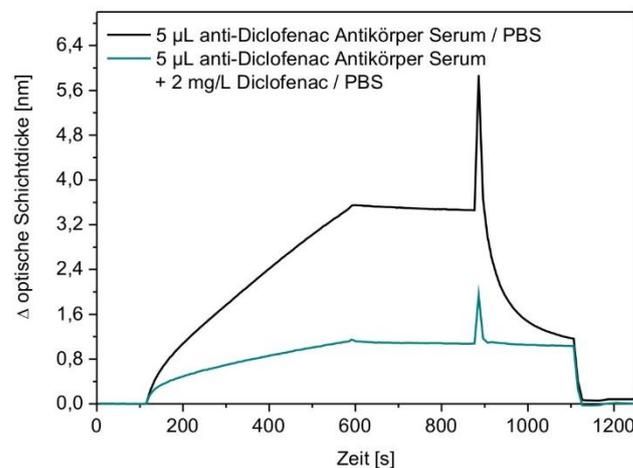


Abbildung 39: RfS-Bindungskurve von kommerziell erhältlichem anti-Diclofenac Antikörper Serum (schwarze Kurve). Um zwischen spezifischer und unspezifischer Wechselwirkung unterscheiden zu können, wurde ein Bindungsinhibitionstest durchgeführt (blaue Kurve). Bei der verwendeten Diclofenac-Konzentration (2 mg/L) sollten alle Antikörper Paratope abgesättigt sein. Es dürfte kein Bindungssignal zu beobachten sein.

Der Bindungsinhibitionstest (blaue Kurve) deutet auf hohe unspezifische Wechselwirkungen der Antikörperlösung mit der Oberfläche hin. Um die Matrixeffekte des Serums zu minimieren bzw. im Idealfall zu eliminieren, wurde der Antikörper aufgereinigt.

Wie in Abschnitt 2.1.6 beschrieben, gibt es verschiedene Arten der Antikörperaufreinigung: Es können sowohl physiko-chemischen Eigenschaften, als auch Affinitäten zu spezifischen Molekülen (z.B. Protein A, Protein G, Antigen) genutzt werden. Je nach verwendeter Methode unterscheidet sich auch die Reinheit des Antikörpers signifikant.

90 % der Proteine eines Serums sind Nicht-Immunglobuline wie Albumin, Transferrin u.a. Demzufolge enthält 1 mL Serum ca. 5-10 mg Antikörper, davon sind in der Regel 1-5 % (0,05-0,5 mg) spezifisch gegen das immunisierte Antigen gerichtet [Gruber 2007]. Manche Methoden entfernen nur die Nicht-Immunglobuline des Serums, andere sowohl die Nicht-

Ergebnisse

Immunglobuline als auch andere im Serum vorhandene Antikörper, die nicht spezifisch gegen das gewünschte Antigen gerichtet sind. Welche Aufreinigung angewandt wird, hängt von der Anwendung des Antikörpers und der damit erforderlichen Reinheit ab.

4.2.1 Klassenspezifische Aufreinigung

Um alle Proteine und Immunglobuline außer der Immunglobuline G abzutrennen, wurde eine Melon Gel IgG Spin Aufreinigung durchgeführt. Da bei dieser Aufreinigung die Störproteine unspezifisch mit dem Melon Gel wechselwirken und somit gebunden werden, ist keine Elution der IgG-Antikörper von Nöten. Dies ist ein großer Vorteil gegenüber anderen klassenspezifischen Aufreinigungen, bei denen im Gegensatz dazu in der Regel die spezifische Affinität der gewünschten Proteine zur Aufreinigung genutzt wird. Es werden nicht nur Reagenzien und somit Zeit und Kosten gespart, sondern es wird vor allem eine Aufreinigung der IgG-Antikörper unter physiologischen Bedingungen ermöglicht.

Nach der Antikörperaufreinigung wurden wiederum RfS-Messungen durchgeführt. Diese sind in Abbildung 40 dargestellt:

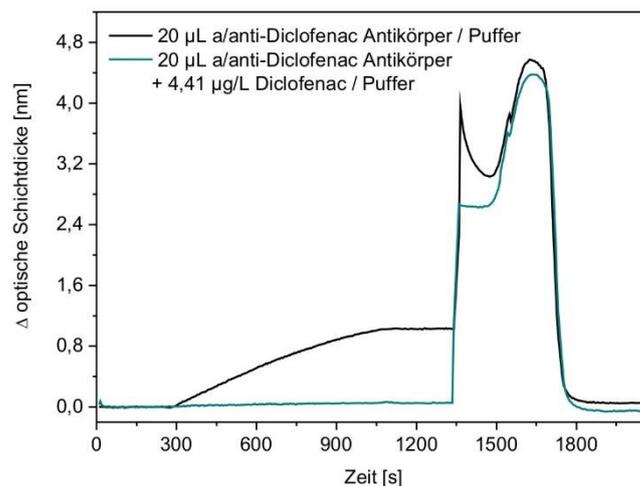


Abbildung 40: RfS-Bindungskurve von kommerziell erhältlichen aufgereinigten anti-Diclofenac-Antikörper (schwarze Kurve). Um zwischen spezifischer und unspezifischer Wechselwirkung unterscheiden zu können, wurde ein Bindungsinhibitionstest durchgeführt (blaue Kurve). Mit der verwendeten Diclofenac-Konzentration sollten alle Antikörper Paratope abgesättigt sein. Es dürfte kein Bindungssignal zu beobachten sein.

Die erhaltene Bindungskurve sowie der durchgeführte Bindungsinhibitionstest zeigen, dass das gemessene Bindungssignal nach Antikörper-Aufreinigung komplett spezifisch ist. Die den Assay störenden Serumproteine konnten vollständig entfernt werden. Die anderen, noch in der Lösung vorhandenen Immunglobuline G scheinen den Immunoassay nicht zu beeinflussen.

Da durch die Aufreinigung die Antikörperlösung stark verdünnt wurde, wurde ein stabilisierendes Protein (Ovalbumin, OVA) zugegeben. Dies ist gängige Praxis, um Antikörperverluste durch Denaturierung oder durch Adsorption an die Gefäßwände zu

minimieren bzw. zu verhindern [Biddlecombe 1995]. Zuvor wurde sichergestellt, dass OVA keine unspezifische Wechselwirkung mit der Sensoroberfläche zeigt.

4.2.1.1 Vor- und Nachteile der klassenspezifischen Aufreinigung

In Tabelle 19 sind die Vor- und Nachteile dieser Antikörperaufreinigung zusammenfassend dargestellt:

Tabelle 19: Vor- und Nachteile der Melon Gel IgG Spin Aufreinigung

Vorteile	Nachteile
❖ Käuflicher Kit (schnell ca. 20 min, einfach zu handhaben)	---
❖ Reproduzierbare Aufreinigung	---
❖ Keine Elutionsmittel von Nöten (Antikörper wird keinen harschen, z.T. denaturierenden Bedingungen ausgesetzt)	---
❖ Andere IgGs und OVA stabilisieren die Lösung	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Keine vollständige Aufreinigung. Alle IgGs des Serums sind im Eluat ➤ Keine Konzentrationsangaben möglich ➤ Nicht geeignet für nachfolgende Markierung des Antikörpers z.B. mit Fluoreszenzfarbstoff

4.2.2 Affinitätschromatographie

Um die gegen Diclofenac gerichteten Immunglobuline sowohl von anderen Serumproteinen wie beispielsweise Albumin als auch von allen anderen im Serum vorkommenden Antikörpern aller Klassen abzutrennen, wurde eine Affinitätschromatographie durchgeführt. Die Affinitätschromatographie bietet den höchsten Reinigungsgrad aller Antikörper-Aufreinigungsmethoden [Batista-Viera 2011]. Nach der Aufreinigung wurden Proteingehalt (UV-VIS Spektroskopie), Reinheit (SDS-PAGE, In-Gel-Verdau, MALDI-TOF MS) und Funktionalität (indirekter ELISA) der Antikörper bestimmt.

Die wichtigsten Faktoren für die erfolgreiche Durchführung einer Affinitätschromatographie sind die geeignete Wahl der Erkennungsstruktur sowie des Elutionsmittels. Auf diese soll im Folgenden näher eingegangen werden.

Ergebnisse

4.2.2.1 Erkennungsstruktur

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Affinitätschromatographie wurden sowohl Diclofenac- β Ala-SEDK als auch Diclofenac-PEG(9)-K als Erkennungsstruktur an CNBr-aktivierte Sepharose kovalent immobilisiert. Zur vollständigen Wechselwirkung von Antigen und Antikörper ist analog zum indirekten ELISA ein Spacer notwendig, da es sich um eine Reaktion in heterogener Phase handelt [Holtzhauer 1996]. Dieser Spacer sollte mindestens 4-6 Kohlenstoffbindungen lang sein, um eine vollständige Antigen-Antikörper Wechselwirkung zu gewährleisten [Bermudez 1975]. Hierbei handelt es sich selbstverständlich nur um einen groben Richtwert, der je nach Antigen-Antikörpersystem noch einmal variieren kann. In dieser Arbeit wurden sowohl Lysin-PEG(9) als auch Lysin-Asparaginsäure-Glutaminsäure-Serin- β Alanin als Spacer eingesetzt. Poly(ethylenglycol) wird, wie bereits in Abschnitt 4.1.2.1 beschrieben, oftmals zur Reduktion unspezifischer Wechselwirkungen verwendet. Somit erfüllt es bei der Affinitätschromatographie zwei Funktionen: Es dient als Spacer und erhöht durch die Reduzierung unspezifischer Wechselwirkungen die Trennreinheit. Leider ist das für die Synthese des Aminosäure-PEG(9)-Diclofenac Konjugats zu verwendende geschützte PEG(9) nicht kostengünstig, und die Ausbeute der Synthese sehr gering. Durch seine Hydrophobizität war das Diclofenac-PEG(9)-K Konjugat zudem nur schwer in wässrigen Systemen wie dem Kopplungspuffer löslich. Aus diesen Gründen wurde zusätzlich das kleine Peptid, Lys-Asp-Glu-Ser- β Ala, an Diclofenac gekoppelt. Dieses erfüllt ebenfalls die Eigenschaften eines Spacers, besitzt eine für dieses System geeignete Aminosäuresequenz (Abschnitt 4.1.2.2) und ist zudem in guten Ausbeuten herstell- und aufreinigbar. Auch die Löslichkeit in wässrigen Systemen wie dem Kopplungspuffer ist gegeben.

Beide Erkennungsstrukturen waren sehr gut für den Einsatz in den in dieser Arbeit durchgeführten Affinitätsaufreinigungen geeignet (Abbildung 41 - Abbildung 45).

4.2.2.2 Elutionsmittel

Der kritischste Schritt der Affinitätschromatographie ist die Elution des gebundenen spezifischen Antikörpers von der Affinitätssäule. Das Elutionsmittel muss die Wechselwirkungen zwischen Antigen und Antikörper lösen, darf dabei aber nicht den Antikörper selbst denaturieren. Dies ist nicht trivial, da sowohl die affine Wechselwirkung als auch die Antikörperstruktur selbst durch die gleichen physikochemischen Wechselwirkungen zustande kommen. Um die Belastung auf den Antikörper so gering wie möglich zu halten, sollte somit das schonendste funktionierende Elutionsmittel verwendet werden. Die Bedingungen für das reversible Lösen der Antigen-Antikörper Wechselwirkungen sind stark vom untersuchten Antigen-Antikörper System und den dort vorherrschenden physiko-chemischen Wechselwirkungen abhängig und nicht verallgemeinerbar. Prinzipiell führen aber oftmals entweder saure oder alkalische Bedingungen (vor allem wenn Ionenbindungen eine große Rolle spielen) oder Änderungen der Ionenstärke (vor allem bei Ionenbindungen oder hydrophoben Wechselwirkungen) zur erfolgreichen Elution funktionaler Antikörper [Batista-Viera 2011]. Chaotrope oder auch denaturierende Reagenzien werden vor allem dann eingesetzt, wenn die

Affinität der Antigen-Antikörper Wechselwirkung so groß ist, dass schonende Elutionsmittel keinen Erfolg zeigen [Angal 1990]. Erhöhte Temperaturen werden heute kaum noch zur Elution angewandt [Engels 2012].

Um eine Denaturierung des Antikörpers zu vermeiden, sollte dieser nach Elution so schnell wie möglich wieder in eine Umgebung gelangen, die physiologischen Bedingungen (pH, Ionenstärke) entspricht.

In Abschnitt 4.1.2.2 wurde bereits auf eine durchgeführte Affinitätschromatographie verwiesen. Die Elution wurde mit einer ACN/Propionsäure-Mischung (20 % (v/v) ACN, 1 % (v/v) Propionsäure in destilliertem entsalzten Wasser) durchgeführt. Zur Neutralisation wurde N,N-Bis(3-aminopropyl)ethylendiamin verwendet [Proll 2004]. Das Ergebnis des ELISAs (Abbildung 38) ist vielversprechend. Im Überstand der Säule, d.h. im Serum nach Aufreinigung, ist kein anti-Diclofenac Antikörper mehr nachweisbar, dafür aber im Eluat (Antikörper bereits in PBS überführt und aufkonzentriert). Dennoch sind die hierbei verwendeten Elutions- und Neutralisierungslösungen nicht ideal. Bei beiden lässt sich eine starke Denaturierung des Antikörpers beobachten, welche zu großen Ausbeuteverlusten führt. Aus diesen Gründen wurden verschiedene andere Elutionsmittel auf ihre Eignung für die Affinitätsaufreinigung von anti-Diclofenac Antikörper untersucht (Tabelle 20):

Tabelle 20: verwendete Elutionsmittel

0,1 M Citronensäure; pH 2,5	pH-Änderung (sauer)
6 M Guanidinhydrochlorid + 6 M Harnstoff; pH 2,7	Chaotrope Reagenzien
100 mM Triethylamin pH 11,5	pH-Änderung (alkalisch)
0,5 M Ammoniumthiocyanat	Chaotropes Salz
1,6 M Magnesiumchlorid	Änderung der Ionenstärke
Acetonitril/Propionsäure-Mischungen in verschiedenen Volumenverhältnissen	pH-Änderung (sauer) + leicht denaturierend

Citronensäure bzw. Guanidinhydrochlorid/Harnstoff als Elutionsmittel

Sowohl Citronensäure als auch eine Mischung aus Guanidinhydrochlorid und Harnstoff sind beliebte Elutionsmittel bei Affinitätsaufreinigungen. Citronensäure kommt vor allem dann erfolgreich zum Einsatz, wenn ionische Wechselwirkungen die Antigen-Antikörper Wechselwirkung dominieren. Vorteilhaft sind hierbei vor allem die vergleichsweise milden Elutionsbedingungen. Spielen vor allem hydrophobe Wechselwirkungen bei der affinen Bindung eine Rolle, bieten sich chaotrope Reagenzien an. Die Funktionalität des Antikörpers nach Elution wurde mittels indirektem ELISA untersucht (Abbildung 41):

Ergebnisse



Abbildung 41: Indirekter ELISA des Überstands und der Eluate nach Affinitätschromatographie. Als Elutionsmittel wurden 0,1 M Citronensäure pH 2,5, 6 M Guanidiniumhydrochlorid + 6 M Harnstoff pH 2,7 sowie eine ACN (20 % (v/v)) / Propionsäure (1% (v/v)) Mischung verwendet. Als Positivkontrolle diente unaufgereinigtes Serum von Tier 2. Diclofenac-PEG-K wurde auf Grund der geringen Syntheseausbeute nur halb so konzentriert als Coatingmaterial eingesetzt. Demzufolge ist hier auch ein deutlich schwächeres Signal zu erwarten.

Die erhaltenen korrigierten Absorptionswerte sind in Tabelle 21 dargestellt:

Tabelle 21: Korrigierte Absorptionswerte des indirekten ELISAs (Abbildung 41). Die Absorptionswerte der Negativkontrollen wurden von den anderen Absorptionswerten der jeweiligen Zeile subtrahiert.

<>	1	2	3	4
A	0,3825	1,8251	2,0261	0,0000
B	-0,0035	-0,0636	0,2585	0,0000
C	0,1721	0,6578	1,3833	0,0000
D	0,1209	0,2270	0,8193	0,0000
E	0,0482	0,0298	0,4837	0,0000
F	0,0526	0,0004	0,3705	0,0000
G	0,0431	-0,0231	0,2836	0,0000
H	0,0114	-0,0343	0,2618	0,0000

Auf den ersten Blick scheinen alle in diesem indirekten ELISA untersuchten Elutionsmittel funktionale Antikörper eluiert zu haben. Nicht ganz nachvollziehbar sind jedoch die im ELISA-Reader erhaltenen Absorptionswerte, vor allem im Hinblick auf die unterschiedlichen Verdünnungen der Eluate (1:50 und 1:100). Eine mögliche Erklärung für die erhaltenen Werte könnten unspezifische Wechselwirkungen von denaturierten Antikörpern an die mit Antigen-Konjugat funktionalisierten Wells sein. Um dies zu überprüfen, wurde ein indirekter ELISA in

Kombination mit einem Bindungsinhibitionstest durchgeführt. In Abbildung 42 sind links ein indirekter ELISA ohne Bindungsinhibition und rechts ein indirekter ELISA in Kombination mit einem Bindungsinhibitionstest dargestellt:

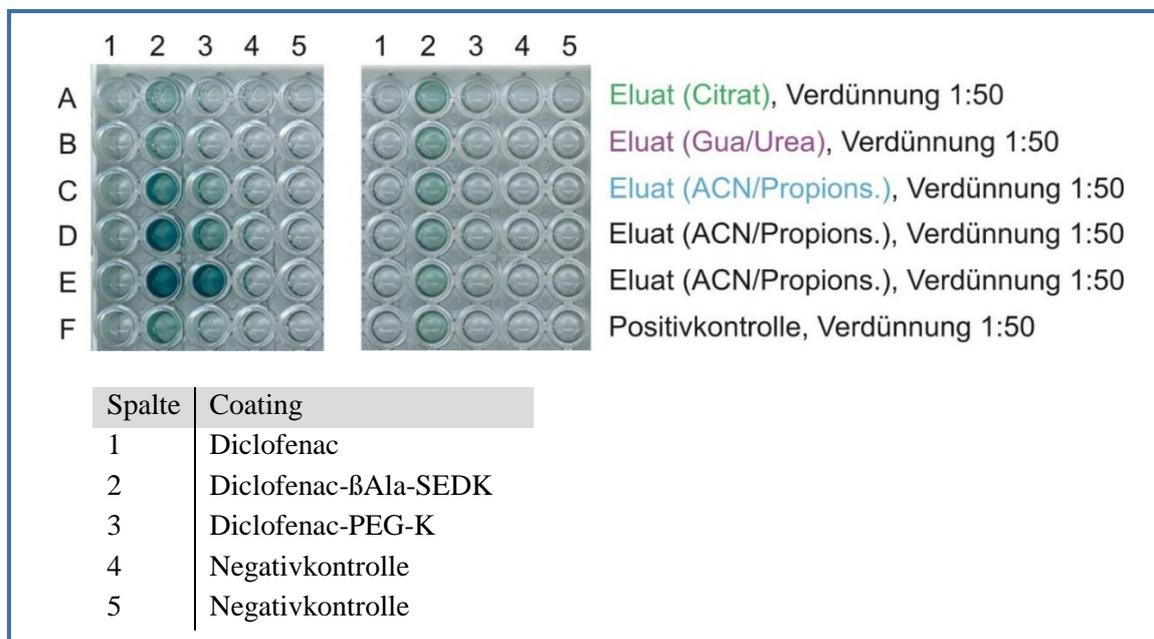


Abbildung 42: Indirekter ELISA der Eluate ohne Bindungsinhibitionstest (links) und mit Bindungsinhibitionstest (rechts). Als Positivkontrolle diente kommerziell erhältlicher, mit der Melon Gel IgG Spin Methode aufgereinigter, Antikörper.

Die Eluate der Zeilen A, B und C entsprechen den oben beschriebenen Eluaten (Abbildung 41). Die Eluate der Zeilen D und E wurden bei Affinitätschromatographien erhalten, die in dieser Arbeit nicht näher beschrieben sind.

Um die erhaltenen Ergebnisse besser vergleichen zu können, wurden auch hier die Absorptionswerte gemessen (Tabelle 22).

Tabelle 22: Korrigierte Absorptionswerte des indirekten ELISAs ohne (links) und in Kombination mit einem Bindungsinhibitionstest (rechts). Die Absorptionswerte der Negativkontrollen wurden gemittelt und von den anderen der jeweiligen Zeile subtrahiert.

<>	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
A	0,038	0,189	0,021	0,000	0,000	-0,014	0,189	0,002	0,000	0,000
B	0,030	0,190	0,023	0,000	0,000	0,011	0,195	0,022	0,000	0,000
C	0,046	0,591	0,154	0,000	0,000	-0,024	0,166	-0,001	0,000	0,000
D	0,057	1,022	0,318	0,000	0,000	-0,009	0,176	0,021	0,000	0,000
E	0,069	1,421	0,976	0,000	0,000	-0,015	0,151	-0,006	0,000	0,000
F	0,062	0,324	0,066	0,000	0,000	-0,028	0,142	-0,001	0,000	0,000

Betrachtet man die 2. Spalte (Coating: Diclofenac-βAla-SEDK) des indirekten ELISAs in Kombination mit dem Bindungsinhibitionstests, wird deutlich, dass hier noch ein geringes Signal von durchschnittlich 0,17 bei allen Eluaten und bei der Positivkontrolle zu erkennen ist. Dies lässt auf unspezifische Wechselwirkungen des Antikörpers mit der Oberfläche schließen. Ganz anders verhält es sich bei den mit Diclofenac-PEG-K (Spalte 3) gecoateten Wells. Hier

Ergebnisse

sind keine Signale im ELISA mit Bindungsinhibitionstest messbar. Dies ist auf die gut abschirmenden und somit unspezifische Wechselwirkungen reduzierenden Eigenschaften des PEGs zurückzuführen.

Um die Elutionsmittel-Eignung von Citronensäure bzw. der Mischung aus Guanidinhydrochlorid und Harnstoff zu ermitteln, wurden die Absorptionswerte des indirekten ELISAs mit Bindungsinhibitionstest von dem indirekten ELISA ohne Bindungsinhibitionstest abgezogen (Tabelle 23). Hierbei ist vor allem die 2. Spalte von Interesse, da unspezifische Wechselwirkungen das Signal im ELISA ohne Bindungsinhibitionstest beeinflusst haben.

Tabelle 23: Korrigierte Absorptionswerte der 2. Spalte des indirekten ELISAs ohne Bindungsinhibitionstest.

<>	2
A	0,001
B	-0,005
C	0,425
D	0,846
E	1,270
F	0,182

Die korrigierten Absorptionswerte zeigen, dass weder Citronensäure (Zeile A) noch die Guanidinhydrochlorid/Harnstoff-Mischung (Zeile B) als Elutionsmittel für die hier durchgeführte Affinitätschromatographie in Frage kommen. Zwar bindet der anti-Diclofenac Antikörper während der Inkubation des Serums vollständig an die Affinitätssäule, jedoch gelingt eine Elution mit diesen Elutionsmitteln nur in sehr geringem Maße, und die Antikörper, die eluiert wurden, sind nicht mehr funktional. Die mittels UV-VIS Spektroskopie für die Eluate erhaltenen Proteingehalte sind auf denaturierte Antikörper und noch in der Lösung vorhandene Serumproteine (Verunreinigung) zurückzuführen (Abschnitt 4.2.2.3).

Triethylamin, Ammoniumthiocyanat bzw. Magnesiumchlorid als Elutionsmittel

Um zu untersuchen, wie sich eine Erhöhung des pH Wertes, eine Änderung der Ionenstärke oder ein anderes chaotropes Salz auf die Elution des anti-Diclofenac Antikörpers von der Affinitätssäule auswirken, wurden Triethylamin, Magnesiumchlorid und Ammoniumthiocyanat als Elutionsmittel verwendet.

Weder die Magnesiumchlorid- noch die Ammoniumthiocyanat-Lösung vermögen die affine Wechselwirkung zwischen Diclofenac und anti-Diclofenac Antikörper wirklich zu lösen. Es wurden nur sehr geringe Proteingehalte in den Eluaten nachgewiesen. Ganz anders verhält es sich für das Elutionsmittel Triethylamin. Nach der Affinitätsaufreinigung wurde hier ein großer Absorptionswert bei einer Wellenlänge von 280 nm beobachtet, der auf eine Antikörperkonzentration von ca. 0,84 g L⁻¹ schließen lassen würde.

Um die Funktionalität der eluierten Antikörper zu überprüfen, wurde ein indirekter ELISA durchgeführt (Abbildung 43). Die verwendeten Antikörperlösungen wurden zum Teil im

Vorfeld des ELISAs mit Diclofenac inkubiert, um spezifische von unspezifischen Signalen zu unterscheiden (Bindungsinhibitionstest, Spalte 3):

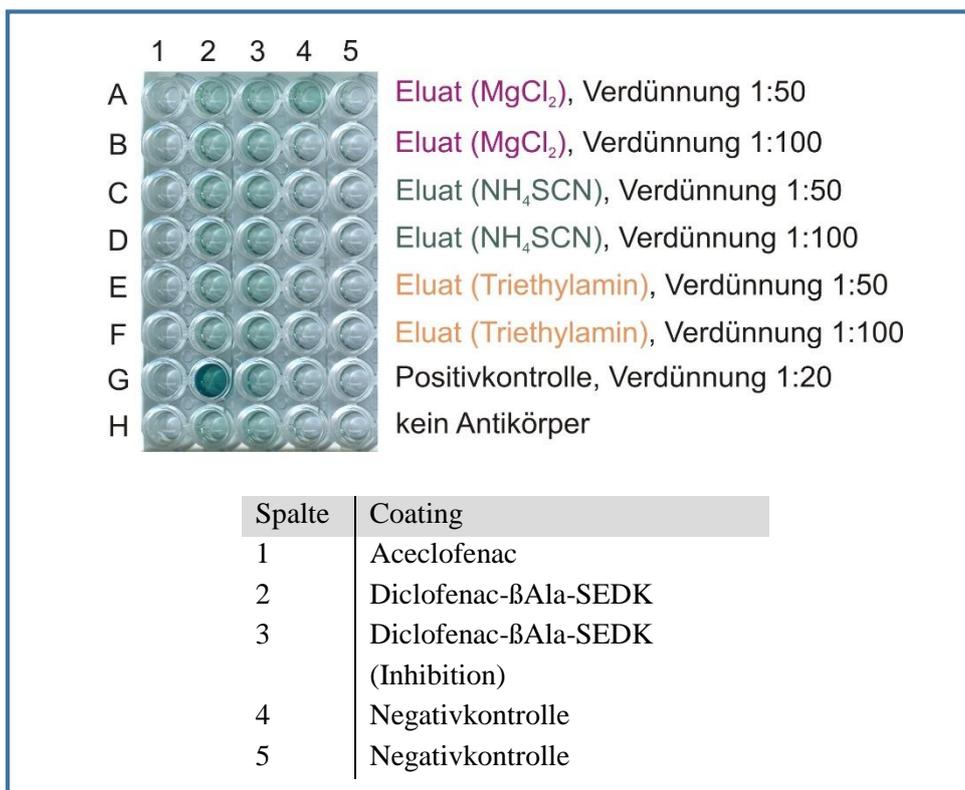


Abbildung 43: Indirekter ELISA der Eluate nach Affinitätschromatographie. Als Elutionsmittel wurden 0,5 M Ammoniumthiocyanat, 1,2 M Magnesiumchlorid sowie 0,1 M Triethylamin pH 11,5 verwendet. Als Positivkontrolle diente kommerziell erhältlicher, mit der Melon Gel IgG Methode aufgereinigter, Antikörper.

Alle drei Elutionsmittel sind für das untersuchte Antigen/Antikörper-System ungeeignet. Es sind keine funktionalen Antikörper in den Lösungen vorhanden. Die erhaltenen leichten Farbsignale sind auf unspezifische Wechselwirkung zurückzuführen (Tabelle 24). Nur für die Positivkontrolle kann ein spezifisches Signal erhalten werden (Spalte 2, Zeile G).

Tabelle 24: Korrigierte Absorptionswerte des indirekten ELISAs bezüglich der Negativkontrollen (links), bezüglich der Negativkontrollen und der unspezifischen Wechselwirkungen (rechts).

<>	1	2	3	4	5
A	0,006	0,169	0,168	0,000	0,000
B	0,002	0,175	0,145	0,000	0,000
C	0,011	0,157	0,144	0,000	0,000
D	-0,006	0,134	0,137	0,000	0,000
E	0,004	0,138	0,150	0,000	0,000
F	-0,003	0,131	0,139	0,000	0,000
G	0,016	1,164	0,156	0,000	0,000
H	-0,007	0,130	0,129	0,000	0,000

<>	2
A	0,002
B	0,030
C	0,014
D	-0,003
E	-0,012
F	-0,008
G	1,007
H	0,000

Ergebnisse

Demzufolge scheint der Antikörper zwar im basischen eluierbar zu sein, er wird dabei aber gleichzeitig auch irreversibel denaturiert.

Acetonitril, Propionsäure und verschiedene Acetonitril/Propionsäure-Mischungen als Elutionsmittel

Da alle milderen Elutionsmittel für die Aufreinigung des anti-Diclofenac Antikörpers nicht geeignet waren, wurden Acetonitril, Propionsäure und verschiedene Acetonitril/Propionsäure-Mischungen (unterschiedliche Volumenverhältnissen) auf ihre Eignung untersucht. Hierzu wurde eine Affinitätsäule nach Inkubation mit Serum, Entfernung des Überstands und Spülen mit Puffer, in drei gleiche Anteile geteilt. Im ersten Anteil der Säule wurde eine Elution mit steigender Propionsäure-Konzentration und im zweiten Anteil eine Elution mit steigender Acetonitril-Konzentration durchgeführt. Der dritte Anteil wurde mit steigenden Konzentrationen einer Mischung aus Acetonitril und Propionsäure behandelt. Obwohl für die Eluate des ersten und zweiten Säulenanteils nur marginale Proteingehalte mittels UV-VIS Spektroskopie bestimmt werden konnten, wurden trotzdem einzelne mittels indirektem ELISA untersucht (Abbildung 44):

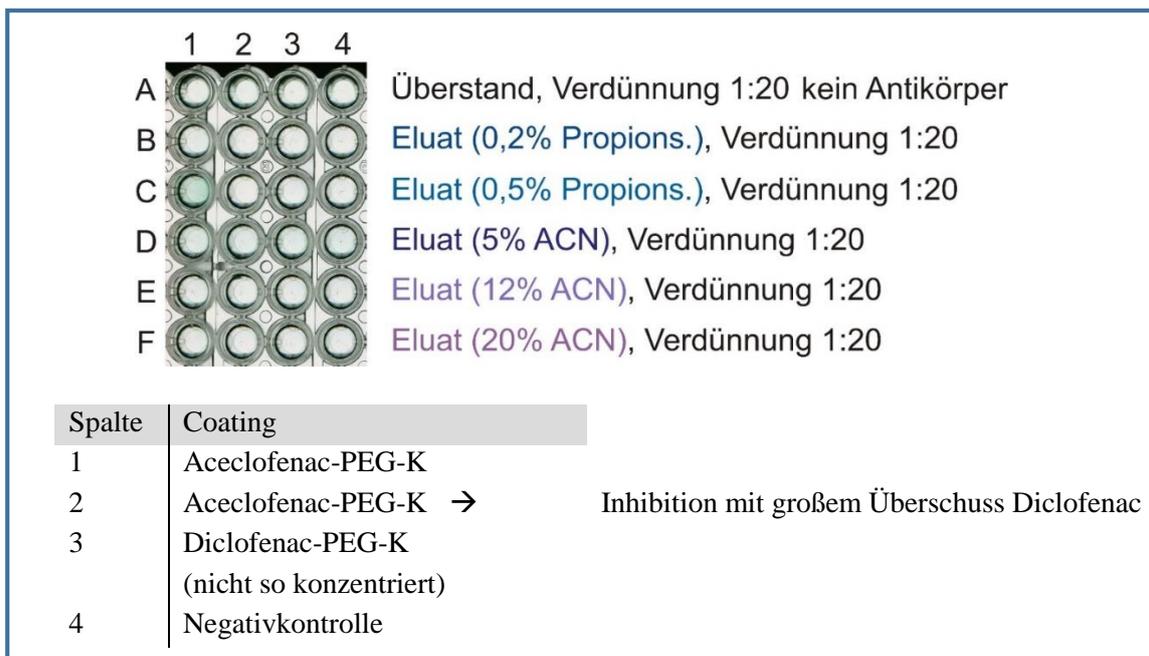


Abbildung 44: Indirekter ELISA nach Affinitätschromatographie. Als Elutionsmittel wurden 0,2 und 0,5%ige Propionsäure, sowie 5, 12 und 20%ige ACN verwendet.

Wie bereits rein visuell erkennbar ist, scheint nur bei der Elution mit 0,5%iger Propionsäure funktionaler anti-Diclofenac Antikörper eluiert worden zu sein. Dies wird auch durch die erhaltenen Absorptionswerte im ELISA-Reader bestätigt (Tabelle 25):

Tabelle 25: Korrigierte Absorptionswerte des indirekten ELISAs bezüglich der Negativkontrolle (Spalte 4).

<>	1	2	3	4
A	0,015	0,008	0,001	0,000
B	0,019	-0,005	0,001	0,000
C	0,107	-0,010	0,000	0,000
D	0,013	-0,003	0,008	0,000
E	0,019	-0,008	-0,005	0,000
F	0,017	-0,006	-0,001	0,000

Der Proteingehalt ist jedoch auch nach Elution mit 0,5%iger Propionsäure sehr gering. Der Großteil der anti-Diclofenac Antikörpers verbleibt gebunden auf der Affinitätssäule. 0,5%ige Propionsäure ist demzufolge zwar in der Lage, funktionalen Antikörper zu eluieren, die Ausbeute ist jedoch so gering, dass eine quantitative Affinitätschromatographie nicht durchführbar ist.

Für die Eluate des dritten Säulenanteils konnten deutlich höhere Proteingehalte bestimmt werden. Auch hier wurden nur einzelne Eluate mittels indirektem ELISA auf funktionale Antikörper untersucht (Abbildung 45):

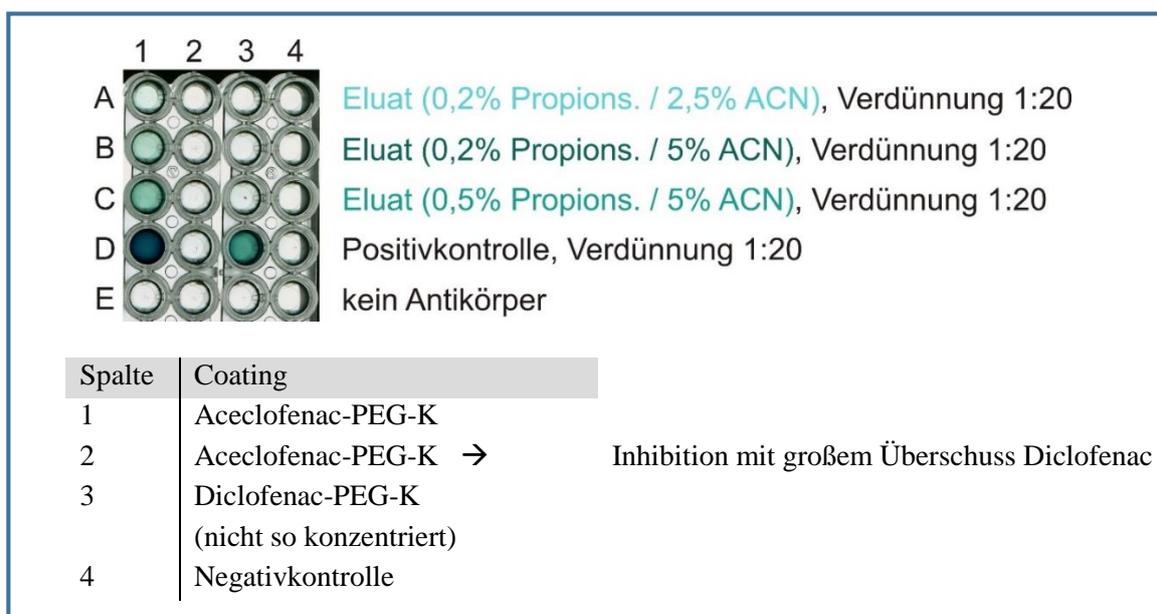


Abbildung 45: Indirekter ELISA der Eluate nach Affinitätschromatographie. Als Elutionsmittel wurden verschiedene Mischungen von Propionsäure und Acetonitril verwendet. Als Positivkontrolle diente kommerziell erhältlicher, mit der Melon Gel IgG Spin Methode aufgereinigter, Antikörper.

Die erhaltenen Absorptionswerte sind in Tabelle 26 dargestellt:

Ergebnisse

Tabelle 26: Bezüglich der Negativkontrolle (Spalte 4) korrigierte Absorptionswerte des indirekten ELISAs.

<>	1	2	3	4
A	0,045	-0,015	-0,009	0,000
B	0,168	0,008	0,019	0,000
C	0,360	-0,004	0,047	0,000
D	2,291	-0,009	0,863	0,000
E	0,005	0,002	-0,005	0,000

Da als Coatingmaterial der ELISA-Wells Aceclofenac-PEG-K verwendet wurde, welches unspezifische Wechselwirkungen effizient verhindert, sind in diesem ELISA keine unspezifischen Signale zu erkennen (Spalte 2). Die Absorptionssignale (Spalte 1, Spalte 3) müssen folglich nicht bezüglich unspezifischer Wechselwirkungen korrigiert werden.

Ab einer Propionsäurekonzentration von 0,2 % in Kombination mit einer Acetonitrilkonzentration von 5 % findet eine signifikante Elution von funktionellem Antikörper statt. Wird die Konzentration der Propionsäure in der Mischung weiter erhöht, wird mehr Antikörper eluiert. Der eluierte Antikörper ist trotz der im Vergleich saureren Bedingungen nach der Elution funktional.

Da diese Propionsäure- und Acetonitril-Konzentrationen deutlich geringer sind als bei der ursprünglich verwendeten Lösung aus 1%iger Propionsäure und 20%igem Acetonitril, sind diese Elutionslösungen deutlich schonender und somit besser geeignet, funktionalen anti-Diclofenac Antikörper von der Affinitätssäule zu eluieren.

4.2.2.3 Reinheit der Eluate

Die Reinheit der einzelnen Antikörper-Lösungen nach Affinitätschromatographie wurde mittels SDS-PAGE mit anschließendem In-Gel-Verdau und MALDI-TOF MS Analyse überprüft. Zusätzlich kann anhand der Ergebnisse eine Aussage getroffen werden, ob in den Eluaten, die trotz hoher Proteinkonzentration im indirekten ELISA kein spezifisches Signal erzeugten, generell kein spezifischer Antikörper oder nur kein funktioneller Antikörper vorlag. In Abbildung 46 ist beispielhaft ein für verschiedene Eluate nach SDS-PAGE erhaltenes Gel dargestellt:

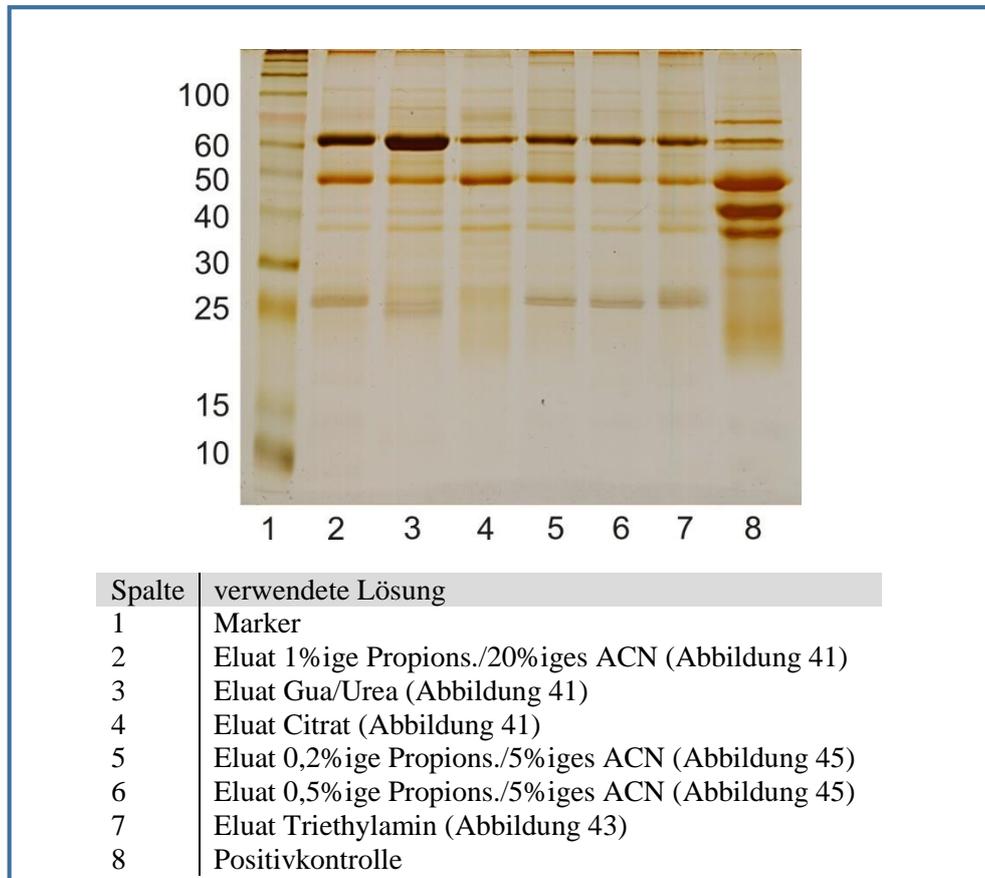


Abbildung 46: SDS-PAGE der Eluate nach Affinitätschromatographie. Als Positivkontrolle diente kommerziell erhältlicher, mit der Melon Gel IgG Spin Methode aufgereinigter, Antikörper.

Da die Banden mittels Silber angefärbt wurden, lassen sich über die Bandenintensität keine Aussagen über die Quantität der Proteine machen.

Bei allen Eluaten sind Banden sowohl für die schweren (ca. 53 kDa) als auch für die leichten (ca. 23-25 kDa) Ketten eines IgGs zu erkennen. Dies lässt sich mittels anschließendem In-Gel Verdau und MALDI-TOF MS Analyse bestätigen.

Des Weiteren sind noch Verunreinigungen der Eluate beispielsweise durch Apolipoprotein A-I ($M = 30578$ Da), Serum Paraxonase/Acylesterase ($M = 40156$ Da), Serumalbumin ($M = 70861$ Da) oder Serotransferase ($M = 78901$ Da) zu finden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass durch längeres Spülen der Affinitätssäule mit PBS vor der Elution die Verunreinigung des Eluats durch Serumalbumin und Serotransferase drastisch reduziert werden kann (Daten nicht gezeigt). Die anti-Diclofenac Antikörper liegen somit in guter Reinheit vor.

Ergebnisse

4.2.2.4 Vor- und Nachteile der Affinitätschromatographie

Eine Affinitätsaufreinigung des polyklonalen anti-Diclofenac Antikörpers konnte durch geeignete Wahl der Erkennungsstruktur und des Elutionsmittels erfolgreich durchgeführt werden. Dennoch ist diese Aufreinigungsmethode deutlich langwieriger und komplexer als die bloße Abtrennung einiger Serumproteine und sollte nur dann durchgeführt werden, wenn eine hochreine Antikörperlösung wie z.B. zur Fluoreszenzmarkierung der Antikörper von Nöten ist. Die Vor- und Nachteile der Affinitätschromatographie sind in Tabelle 27 zusammengefasst:

Tabelle 27: Vor- und Nachteile der Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Vorteile	Nachteile
❖ (annähernd) vollständige Aufreinigung	---
➤ Konzentrationsangabe des Antikörpers möglich	
➤ Sehr gut geeignet für nachfolgende Markierung des Antikörpers z.B. mit Fluoreszenzfarbstoff	
❖ reproduzierbar	---
---	❖ zeitaufwendig in der Entwicklung und Durchführung
---	❖ Elutionsmittel (Antikörper wird z.T. harschen, denaturierenden Bedingungen ausgesetzt)

4.3 Immunoassayentwicklung und -optimierung in Puffer

4.3.1 Allgemeine Assaybedingungen

Da Realmatrices wie Oberflächenwasser oder Nahrungsmittel eine Vielzahl von Matrixkomponenten aufweisen, wurde der Immunoassay zuerst in Puffer entwickelt, optimiert und etabliert. Um eine hohe Selektivität, Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Stabilität des Immunosensors zu gewährleisten, müssen verschiedene Faktoren wie das zu verwendende Assayformat, die Konzentration und Reinheit des Antikörpers oder die Beschaffenheit und Charakteristik der Sensoroberfläche berücksichtigt werden.

Im hier vorliegenden Fall wird anhand eines Bindungsinhibitionsassays ein signifikant höheres Signal zu Rausch Verhältnis im Vergleich zu einem direkten Assayformat erzielt, bei welchem der Antikörper auf der Oberfläche immobilisiert werden würde. Dies ist ganz trivial auf die deutlich unterschiedlichen Molaren Massen und Größen des Antigens bzw. des Antikörpers zurückzuführen (Abbildung 47). So beträgt beispielsweise das Verhältnis der Molaren Masse des Diclofenacs zu Molaren Masse des anti-Diclofenac Antikörpers ca. 1:503.

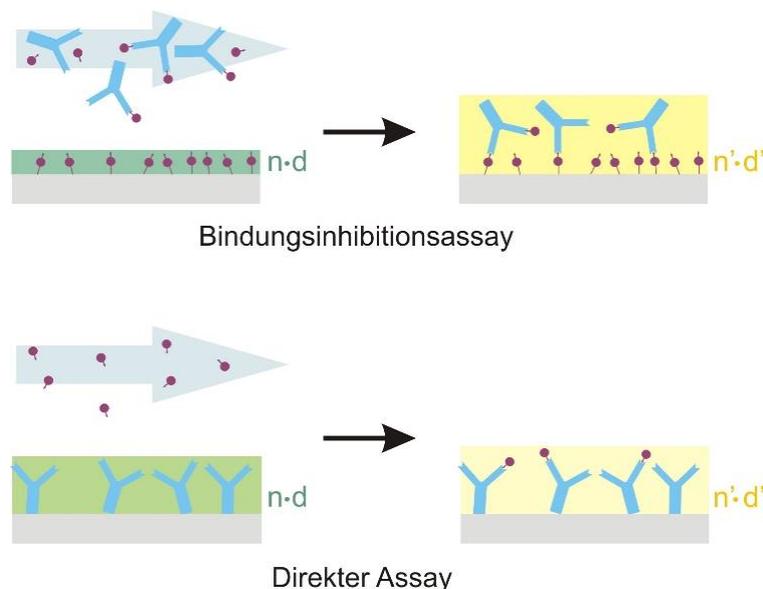


Abbildung 47: Änderung der optischen Schichtdicke der sensitiven Schicht bei Durchführung eines Bindungsinhibitionsassays (oben) und bei Durchführung eines direkten Assays (unten). Das Antigen wurde zur besseren Übersichtlichkeit überproportional groß dargestellt.

Zudem ist die Immobilisierung von Aceclofenac, einem Derivat des Diclofenacs, auf der Oberfläche wünschenswert, da die erhaltene Sensoroberfläche chemisch stabil, einfach zu regenerieren und somit mehrfach verwendbar ist. Durch das Polymer Poly(ethylenglycol), welches als Zwischenschicht aufgebracht wird, können zudem unspezifische Wechselwirkungen von Immunoassay- oder Matrixbestandteilen mit der Sensoroberfläche in der Regel effektiv reduziert oder sogar komplett verhindert werden.

Ergebnisse

Die verwendete Oberflächenmodifikation, die all die oben aufgeführten Anforderungen wie Selektivität, Robustheit, Stabilität, Mehrfachverwendbarkeit und eine große Zahl an Bindungsstellen gewährleistet, wird in 3.6.1 detailliert beschrieben.

Um quantitative Ergebnisse zu erzielen, muss die Bindung des Antikörpers an die Oberfläche diffusions-kontrolliert sein. Dies wird durch die in Abschnitt 2.2.2 erläuterten Maßnahmen sichergestellt.

Während der Probeninjektion wird bei diffusions-kontrollierten Bindungsvorgängen an der Sensoroberfläche ein lineares Bindungssignal mittels RIfS detektiert. Die Steigung eines definierten Bereiches dieses linearen Bindungssignals wird in der Regel zur Auswertung herangezogen (3.7.3). Sowohl der verwendete kommerziell erhältliche als auch der selbst hergestellte anti-Diclofenac Antikörper sind polyklonal und liegen in Kaninchen-Serum vor. Wie in Abschnitt 4.2 beschrieben, treten unerwünschte Matrixeffekte durch Serumbestandteile während der Durchführung des Immunoassays auf. Kein lineares, sondern ein gekrümmtes Bindungssignal wird während der Probeninjektion erhalten. Zudem ist das Signal nicht vollständig inhibierbar. Beide beobachteten Effekte sprechen für unspezifische Wechselwirkungen der Serumbestandteile mit der Sensoroberfläche. Um diese Matrixeffekte zu vermeiden, wurden die polyklonalen Antikörper aufgereinigt. Als Aufreinigungsmethoden wurden sowohl eine Melon Gel IgG Spin Aufreinigung als auch eine Affinitätsaufreinigung durchgeführt. Mittels Affinitätsaufreinigung kann der gewünschte Antikörper annähernd vollständig von anderen Serumproteinen oder Antikörpern abgetrennt werden. Von Nachteil ist hierbei jedoch der vergleichsweise große Zeitaufwand. Für Messungen mit der markierungsfreien Reflektometrischen Interferenzspektroskopie genügt eine nicht so zeitaufwendige klassenspezifische Aufreinigung (4.2.1). Dies wird anhand der Messungen in Abbildung 40 verdeutlicht. Nach Aufreinigung des polyklonalen Antikörpers mittels Melon Gel IgG Spin Aufreinigung wird ein lineares Bindungssignal erhalten. Des Weiteren kann das Bindungssignal vollständig inhibiert werden. Es sind keine Matrixeffekte mehr zu beobachten. Die anderen Antikörper der Klasse G, welche durch diese Aufreinigung nicht entfernt werden, beeinflussen den durchgeführten Immunoassay nicht, sondern haben zusätzlich den positiven Effekt, die verdünnte Antikörperlösung zu stabilisieren [Rau 2011]. Wenn im Folgenden von aufgereinigtem Antikörper gesprochen wird, kann immer von mittels Melon Gel IgG Spin Aufreinigung aufgereinigtem Antikörper ausgegangen werden.

Um die verdünnte Antikörperlösung weiter zu stabilisieren, wäre es vorteilhaft, ein großes Protein wie Ovalbumin zu der Antikörper-Lösung zugeben zu können [Rau 2011]. Es muss jedoch sichergestellt sein, dass dieses nicht unspezifisch mit der Sensoroberfläche wechselwirkt. Aus diesem Grund wurde Ovalbumin in hoher Konzentration (1 g L^{-1}) über die Oberfläche geleitet. Trotz der hohen Konzentration konnte kein Signal und demzufolge keine unspezifische Wechselwirkung mit der Sensoroberfläche beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Ovalbumin wurde somit als Stabilisierungsprotein verwendet.

4.3.2 Regeneration der Sensoroberfläche

Um Zeit und Kosten zu reduzieren, aber auch um die Assayentwicklung, -optimierung und -etablierung zu vereinfachen, ist es vorteilhaft, möglichst viele Messungen auf einem Transducer durchzuführen. Die Oberflächenmodifikation sollte hierfür stabil und der Transducer regenerierbar sein. Im Gegensatz zur Affinitätschromatographie, bei der das Elutionsmittel den Antikörper nicht irreversibel denaturieren darf, stellt eine Denaturierung in diesem Fall kein Problem dar. Der Antikörper wird nach der Regeneration verworfen. Einzige Bedingung an das Regenerationsmittel ist die Unversehrtheit der Sensoroberfläche nach der Regeneration.

Mittels RfS wurden verschiedene gängige Regenerationsmittel auf ihre Regenerations-eigenschaften untersucht. In Abbildung 48 ist eine RfS-Messung dargestellt, bei der zuerst eine Regeneration mit 0,1 M Citronensäure (pH 1,5) und anschließend mit 0,5 %iger SDS-Lösung (pH 2,2) durchgeführt wurde:

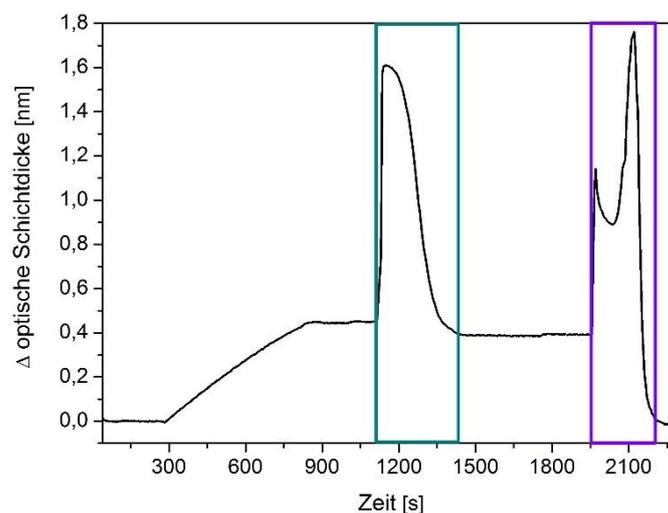


Abbildung 48: Regeneration des anti-Diclofenac Antikörper Bindungssignals mit 0,1 M Citronensäure, pH 1,5 (grün umrandet) und anschließend mit 0,5 %iger SDS-Lösung, pH 2,2 (lila umrandet).

0,1 M Citronensäure (pH 1,5) eignet sich kaum als Regenerationsmittel für das hier untersuchte Antigen/Antikörper-System. Die Signalhöhe nach Regeneration liegt bei 88,82 % des Ursprungssignals. Dieses Ergebnis entspricht den obigen Untersuchungen zur Eignung von Citronensäure als Elutionsmittel bei der Affinitätschromatographie (Abschnitt 4.2.2.2). Ganz im Gegensatz dazu kann das stark Protein-denaturierende SDS die Transduceroberfläche vollständig regenerieren, ohne die Oberfläche selbst zu beschädigen.

Citronensäure, SDS sowie alle weiteren untersuchten Regenerationsmittel sind in Tabelle 28 aufgelistet:

Ergebnisse

Tabelle 28: Vergleich verschiedener Regenerationsmittel

Regenerationsmittel	Restsignalhöhe nach Regeneration [%]
8 M Harnstoff, pH 1,5	99,98
10 % Ethanol	92,43
10 % Ethanol + 3 % DMSO + 2 % Butanol	91,68
0,1 M Citronensäure, pH 1,5	88,82
6 M Guanidinhydrochlorid, pH 2	46,54
6 M Guanidinhydrochlorid + 8 M Harnstoff, pH 3	33,33
6 M Guanidinhydrochlorid + 8 M Harnstoff, pH 2,5	14,72
6 M Guanidinhydrochlorid + 8 M Harnstoff, pH 2	10,74
0,5 % SDS pH 2,2	0

Nur mit 0,5%iger SDS-Lösung konnte eine vollständige Regeneration der Oberfläche erreicht werden. Demzufolge wurde dieses in allen folgenden RfS-Messungen zur Regeneration verwendet. Die Unversehrtheit der Oberfläche wurde mit Langzeitstabilitätsmessungen bewiesen. Bis zu 100 Messungen auf einem Transducer konnten über mehrere Tage durchgeführt werden (Daten nicht gezeigt).

4.3.3 Reproduzierbarkeit und Spezifität des Bindungssignals

Um die Reproduzierbarkeit der erhaltenen Bindungssignale zu überprüfen, werden in der Regel mindestens Dreifachmessungen durchgeführt. In Abbildung 49 ist eine Dreifachmessung beispielhaft dargestellt:

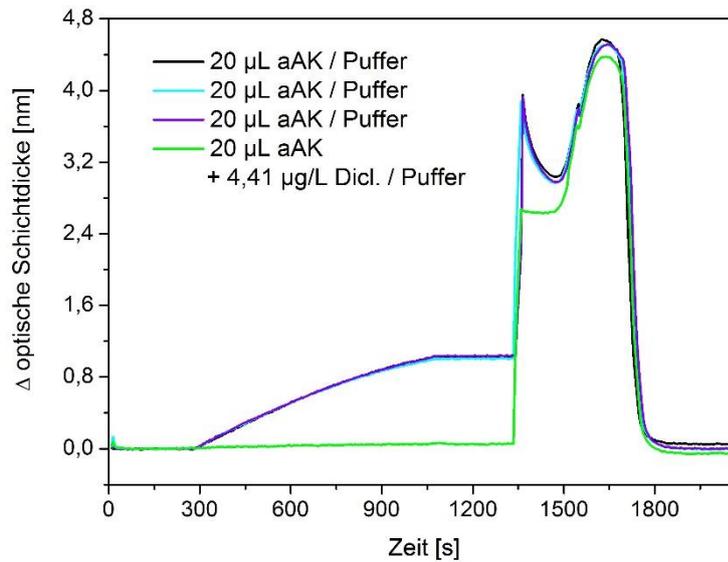


Abbildung 49: Dreifachmessung von 20 μL aufgereinigtem Antikörper (aAK) in PBS-Puffer. Für den Bindungsinhibitionstest wurde der Antikörper mit 4,41 $\mu\text{g/L}$ Diclofenac vorinkubiert.

Die Standardabweichung der Bindungssignale beträgt 0,3 %. Der Biosensor weist somit eine sehr gute Intra-Chip Reproduzierbarkeit auf.

Um sicherzustellen, dass das beobachtete Bindungssignal auf der spezifischen Wechselwirkung des Epitops des Antigen-Derivats mit einem Paratop des Antikörpers beruht, wird ein Bindungsinhibitionstest durchgeführt. Hierbei wird Diclofenac in sehr großen molaren Überschuss zur Lösung zugegeben. Wie bereits in Abschnitt 4.2.1 dargestellt, wird wie gewünscht kein Signal erhalten. Die Spezifität der Wechselwirkung des anti-Diclofenac Antikörpers mit der Transduceroberfläche ist somit erwiesen.

4.3.4 Kalibrierung und Validierung des Biosensors in Puffer

Basierend auf diesen optimierten Bedingungen, wurde der Biosensor in Puffer entsprechend der unter Abschnitt 3.7.3.1 beschriebenen Routine kalibriert. Hierzu wurde der Antikörper mit Diclofenac-Konzentrationen von 0,0044 $\mu\text{g L}^{-1}$ bis 16,400 $\mu\text{g L}^{-1}$ vorinkubiert. Die gemessene Kalibrierkurve und die entsprechende Logistikkfunktion sind in Abbildung 50 dargestellt.

Ergebnisse

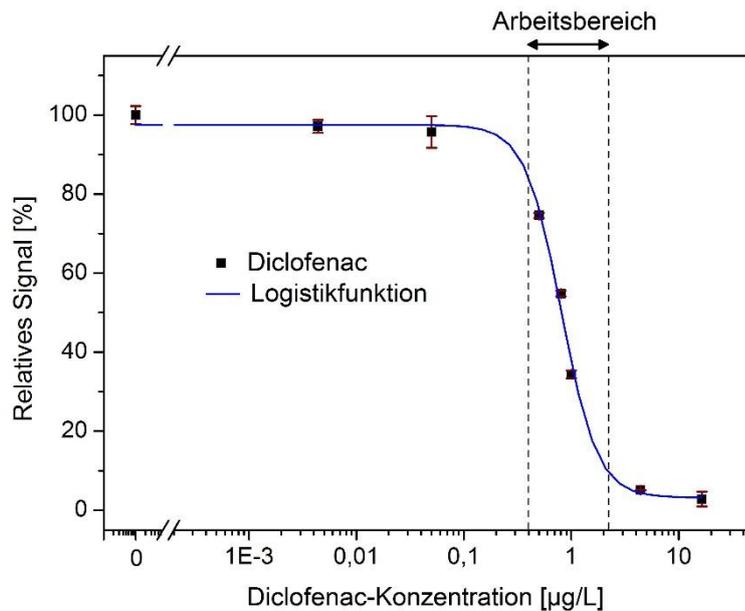


Abbildung 50: Kalibrierkurve, Logistikkfunktion und Arbeitsbereich der Kalibrierung des Biosensors in Puffer.

In Puffer wird für Diclofenac eine Nachweisgrenze von 284 ng L^{-1} , eine Bestimmungsgrenze von 493 ng L^{-1} und ein Arbeitsbereich von $0,399 - 2,227 \text{ µg L}^{-1}$ erhalten. In Tabelle 29 sind die Parameter der Logistikkfunktion, Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie der Arbeitsbereich zusammengefasst:

Tabelle 29: Parameter der Logistikkfunktion, Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie Arbeitsbereich der Kalibrierkurve in Puffer

A_1 [%]	$96,81 \pm 2,00$
A_2 [%]	$3,21 \pm 2,59$
x_0 [µg L^{-1}]	$0,81 \pm 0,03$
p	$2,63 \pm 0,41$
LOD [ng L^{-1}]	284,2
LOQ [ng L^{-1}]	493,3
Arbeitsbereich [µg L^{-1}]	0,399 – 2,227

Um die gemessene Kalibrierkurve zu validieren, wurden Wiederfindungsraten bestimmt. Hierfür wurden Proben mit vier verschiedenen Diclofenac-Konzentrationen ($0,56 \text{ µg L}^{-1}$, $1,11 \text{ µg L}^{-1}$, $1,48 \text{ µg L}^{-1}$ und $1,85 \text{ µg L}^{-1}$) versetzt, gemessen und unter Verwendung der obigen Logistikkfunktion ausgewertet. Die Wiederfindungsraten sind in Abbildung 51 dargestellt:

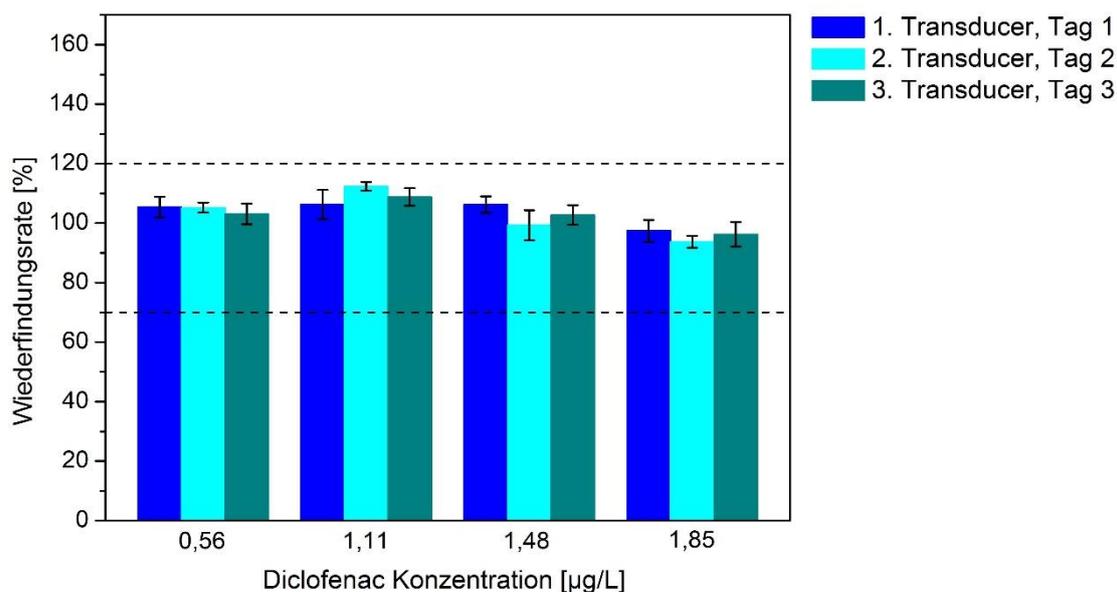


Abbildung 51: Wiederfindungsraten vierer Diclofenac-Konzentrationen durch Dreifachmessungen in Puffer bestimmt. Die Messungen wurden an drei verschiedenen Tagen auf drei verschiedenen Transducern durchgeführt. Die Diclofenac-Konzentrationen wurden aus drei verschiedenen Diclofenac Stammlösungen hergestellt. Zudem wurde der Antikörper aus zwei verschiedene Antiseren aufgereinigt, gelagert und verwendet: Antikörper Stammlösung 1 für Messungen auf den Transducern 1 und 2 und Antikörper Stammlösung 2 für Messungen auf dem Transducer 3.

Die gestrichelten Linien begrenzen den von der AOAC International empfohlenen Bereich von 70 – 120 %.

Es konnten sehr gute Wiederfindungsraten mit kleinen Standardabweichungen erhalten werden (Tabelle 30).

Tabelle 30: Wiederfindungsraten (Mittelwert und Standardabweichung) basierend auf der Logistikfunktion der Kalibrierkurve in Puffer.

gespikte Konz.	Transducer	detekt. Konz. [µg/L]	gespikte Konz. [µg/L]	WF [%]	SD [%]
1. Konz.	1	0,59	0,56	105,4	3,5
	2	0,59		105,2	1,7
	3	0,58		103,2	3,5
2. Konz.	1	1,18	1,11	106,3	4,9
	2	1,24		112,4	1,5
	3	1,21		108,8	2,9
3. Konz.	1	1,57	1,48	106,2	2,7
	2	1,47		99,3	5,0
	3	1,52		102,8	3,3
4. Konz.	1	1,81	1,85	97,4	3,7
	2	1,74		93,7	2,0
	3	1,79		96,2	4,1

Ergebnisse

Die Messungen wurden an drei verschiedenen Tagen auf drei verschiedenen Transducern durchgeführt. Zusätzlich wurden verschiedene Antikörper-Stammlösungen, welche nach Melon Gel IgG Spin Aufreinigungen erhalten wurden, sowie verschiedene Diclofenac Stammlösungen verwendet. Somit wurde mit diesen Messungen nicht nur die Kalibrierkurve validiert, sondern auch die sehr gute Inter-Chip Reproduzierbarkeit, die sehr gute Reproduzierbarkeit des Antikörper-Aufreinigungsschrittes sowie die sehr gute Reproduzierbarkeit der Herstellung und Verdünnung der Diclofenac-Stammlösung bewiesen.

4.4 Quantifizierung von Diclofenac in der Probenmatrix Kuhmilch

Exemplarisch für Lebensmittel tierischen Ursprungs wurde in dieser Arbeit Kuhmilch als Probenmatrix verwendet. Auf Grund seiner vielen Bestandteile wie beispielsweise verschiedener Fette, Proteine, Kohlenhydrate, Vitamine oder Spurenelemente [Auldiss 1998, Glantz 2012], die alle potentiell Matrixeffekte verursachen können, stellt Kuhmilch eine sehr komplexe Probenmatrix dar. Der Einfluss der Matrixeffekte ist dabei umso gravierender, je geringer die zu messende Analyt-Konzentration ist. Dies gilt insbesondere für markierungsfreie Nachweismethoden. Mögliche Matrixeffekte sind in Tabelle 31 aufgeführt:

Ergebnisse

Tabelle 31: Zusammenfassung möglicher Matrixeffekte

Matrixeffekt	Einfluss auf die Messung
<ul style="list-style-type: none"> ❖ unspezifische WW mit dem Analyt ❖ unspezifische WW mit dem Antikörper <ul style="list-style-type: none"> ➤ Störung/Hinderung der spezifischen Antigen-Antikörper WW in Lösung (a) ➤ Störung/Hinderung der spezifischen WW zwischen immobilisiertem Antigen-Derivat und Antikörper (b) 	<p style="text-align: center;">effektive Antigen- bzw. Antikörper-Konzentration \neq tatsächliche Antigen- bzw. Antikörper-Konzentration</p>
<ul style="list-style-type: none"> ❖ unspezifische WW mit der Sensoroberfläche <ul style="list-style-type: none"> ➤ Störung/Hinderung der spezifischen WW zwischen immobilisiertem Antigen-Derivat und Antikörper (c) 	<p style="text-align: center;">Unspezifisches Signal</p> <p style="text-align: center;">effektive Antikörper-Konzentration \neq tatsächliche Antikörper-Konzentration</p>
<ul style="list-style-type: none"> ❖ Änderung der physiko-chemischen Bedingungen in Lösung wie Streuquerschnitt, Brechungsindex, Ionenstärke oder pH-Wert <ul style="list-style-type: none"> ➤ Änderung der Wechselwirkungskinetik (d) ➤ Streuung wie z.B. Tyndall-Streuung (e) 	<p style="text-align: center;">Andere Signaldynamik</p> <p style="text-align: center;">Überlagerung des tatsächlichen Signals</p>

Bisherige Standardmethoden zur Quantifizierung von Diclofenac wie beispielsweise Flüssig- oder Gaschromatographie benötigen umfangreiche Probenvorbereitungen wie Extraktionen oder Aufreinigungsschritte, um in der Matrix Milch messen zu können [Gallo 2008, Dowling 2009, Dowling 2010, Azzouz 2011, Dubreil-Chéneau 2011, Gentili 2012, Peng 2013]. Um den zu entwickelnden Biosensor von diesen bereits vorhandenen Standardmethoden abzugrenzen zu können, sollen die Messungen ohne Probenvorbereitung durchgeführt werden.

4.4.1 Identifizierung Matrix-spezifischer Matrixeffekte

Messungen in komplexen Matrices wie Milch stellen nach wie vor eine große Herausforderung bei der Biosensorentwicklung dar [Rau 2012]. Um Matrixeffekte, die nicht Assay- sondern Matrix-spezifisch sind, zu untersuchen, wurden erste Testmessungen in Kuhmilch mittels eines Modellanalyten durchgeführt. Zu diesen nicht Assay-spezifischen Matrixeffekten zählt beispielsweise die Tyndall-Streuung.

Als Modellanalyt wurde Testosteron ausgewählt, da der zugehörige Immunoassay in Puffer bereits sehr gut mittels RIfS charakterisiert wurde [Rau 2011, Rau 2012].

Typische Signalkurven in pasteurisierter Vollmilch mit und ohne Zugabe von anti-Testosteron Antikörper sind in Abbildung 52 dargestellt:

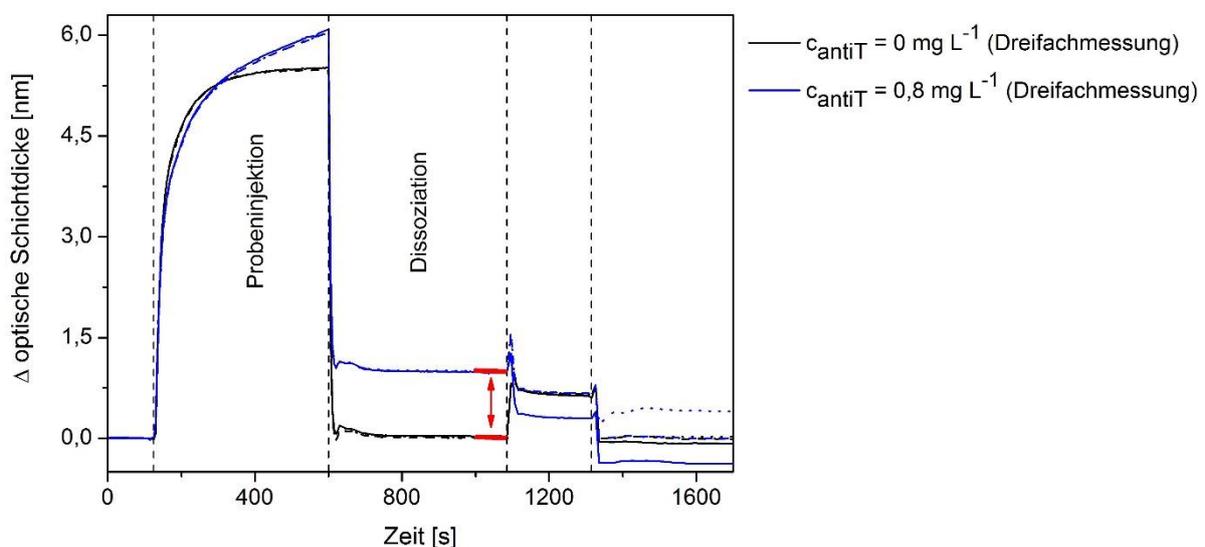


Abbildung 52: Typische Bindungskurven in pasteurisierter Vollmilch ohne und mit Zugabe von anti-Testosteron Antikörper. Das Bindungssignal wird über die mittlere Höhe am Ende der Dissoziationsphase ausgewertet.

Während die Probe über die Oberfläche geleitet wird, ist eine exorbitante Änderung der optischen Schichtdicke zu beobachten. Diese wird vor allem durch Tyndall Streuung sowie die Änderung des Brechungsindex verursacht, die das spezifische Bindungssignal überlagern.

Ergebnisse

Eine Auswertung des Bindungssignals während der Probeninjektion ist somit kaum möglich. Alternativ kann jedoch die Höhe des Bindungssignals in einem definierten Bereich der Dissoziationsphase ausgewertet werden (Abschnitt 3.7.3).

Ohne den Zusatz von anti-Testosteron Antikörper sollte das gemessene Signal während der Dissoziationsphase auf die Höhe der Baseline zurückkehren. Je anfälliger jedoch die Sensoroberfläche für unspezifische Wechselwirkungen von Matrixbestandteilen ist, desto höher ist das Signal während der Dissoziationsphase. Da bei diesen Messungen in pasteurisierter Vollmilch mit einem Fettgehalt von 3,5 % gemessen wurde, ist die hier zu beobachtende unspezifische Wechselwirkung (0,3 nm hohes Signal am Ende der Dissoziationsphase), als sehr gering einzuschätzen. Auf Grund der sehr gut reproduzierbaren Ergebnisse, wurde der Biosensor in Vollmilch kalibriert. Um von den unspezifischen Bindungen der Matrixbestandteile an der Oberfläche unabhängig zu sein und um somit Messungen verschiedener Milchproben, die sich in ihrer Zusammensetzung unterscheiden, zu vergleichen, wurde in diesem Fall die relative und nicht die absolute Signalhöhe während eines bestimmten Zeitraums der Dissoziationsphase ausgewertet. Der Biosensor wurde unter Verwendung von Testosteron-Konzentrationen im Bereich von $0,0002 \mu\text{g L}^{-1}$ bis $270 \mu\text{g L}^{-1}$ kalibriert. In Abbildung 53 ist die Kalibrierkurve mit dem erhaltenen Arbeitsbereich dargestellt:

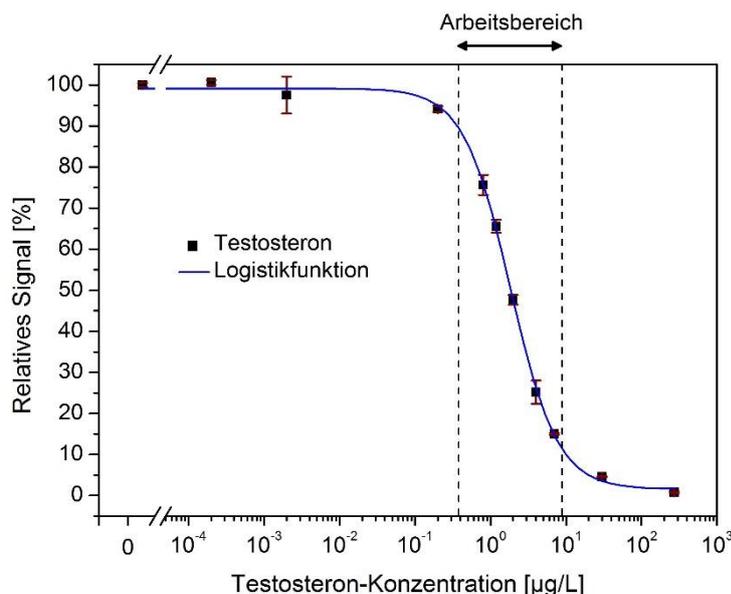


Abbildung 53: Kalibrierkurve, Logistikkfunktion und Arbeitsbereich der Testosteron-Kalibrierung in pasteurisierter Vollmilch (3,5 % Fett).

Trotz der sehr komplexen Matrix ist keine Probenvorbereitung von Nöten. Durch die verwendete Auswertestrategie konnte direkt in unverdünnter Vollmilch gemessen werden. Dank dieser Optimierungen wurden sehr niedrige Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erhalten. Diese liegen trotz der komplexen Matrix im Bereich derer, die in der sehr viel einfacheren Probenmatrix Puffer erhalten wurden [Rau 2012].

In Tabelle 32 sind die Parameter der Logistikkfunktion, Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie der Arbeitsbereich zusammengefasst:

Tabelle 32: Parameter, Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie Arbeitsbereich der Testosteron-Kalibrierung in pasteurisierter Vollmilch (3,5 % Fett).

A ₁ [%]	99,2 ± 0,6
A ₂ [%]	1,6 ± 0,9
x ₀ [µg L ⁻¹]	1,84 ± 0,05
p	1,40 ± 0,05
LOD [ng L ⁻¹]	94,4
LOQ [ng L ⁻¹]	229,3
Arbeitsbereich [µg L ⁻¹]	0,380 – 8,862

Um die Qualität der Kalibrierkurve zu überprüfen, wurden Wiederfindungsraten bestimmt. Hierzu wurden Proben pasteurisierter Vollmilch mit drei verschiedenen Testosteron-Konzentrationen (0,4 µg L⁻¹, 3,0 µg L⁻¹ und 6,0 µg L⁻¹) versetzt. Die erhaltenen Bindungssignale wurden unter Zuhilfenahme der Kalibrierkurve und der zugehörigen Logistikfunktion ausgewertet. Es konnten gute Wiederfindungsraten mit kleinen Standardabweichungen im Bereich zwischen 70 – 120 %, wie von der AOAC empfohlen, erhalten werden, die die Qualität der Kalibrierkurve bestätigen (Abbildung 54). Der scheinbar systematische Abfall der Wiederfindungsraten mit zunehmender Testosteron-Konzentration konnte durch Wiederholungsmessungen widerlegt werden.

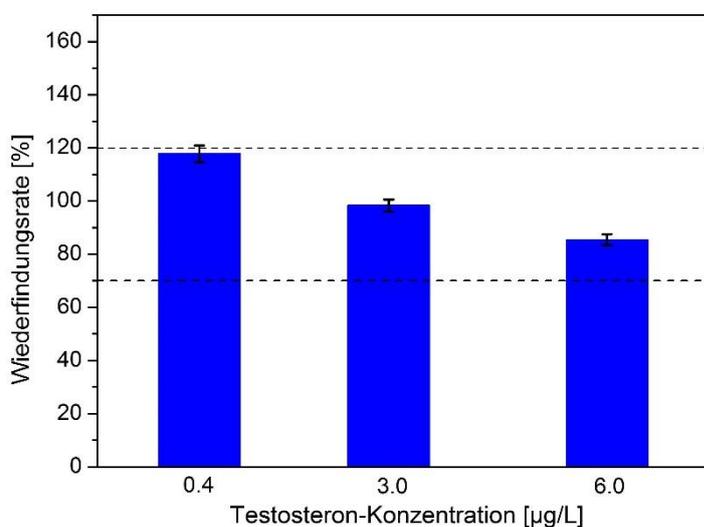


Abbildung 54: Wiederfindungsraten von drei Testosteron-Konzentrationen (0,4 µg L⁻¹, 3,0 µg L⁻¹ und 6,0 µg L⁻¹) in pasteurisierter Vollmilch (Fettgehalt: 3,5 %).

Unter Zuhilfenahme des Modellsystems Testosteron/anti-Testosteron Antikörper konnten somit erste Erkenntnisse über den Einfluss der Probenmatrix Milch auf Messungen mit der markierungsfreien Reflektometrischen Interferenzspektroskopie gewonnen werden. Matrix-spezifische Matrixeffekte wie Änderungen des Brechungsindex oder Tyndall-Streuung wurden identifiziert und konnten durch eine geeignete Auswertemethode umgangen werden.

Ergebnisse

Anhand dieser Optimierung wurden reproduzierbare quantitative Messungen erhalten, ohne dass eine Probenvorbereitung von Nöten war.

4.4.2 Identifizierung Assay-spezifischer Matrixeffekte

Assay-spezifische Matrixeffekte wie unspezifische Wechselwirkungen der Matrixbestandteile mit Antigen, Antikörper oder Sensoroberfläche sollen im Folgenden anhand Abbildung 55 und Abbildung 56 für das vorliegende Diclofenac/anti-Diclofenac-Antikörper System untersucht und diskutiert werden.

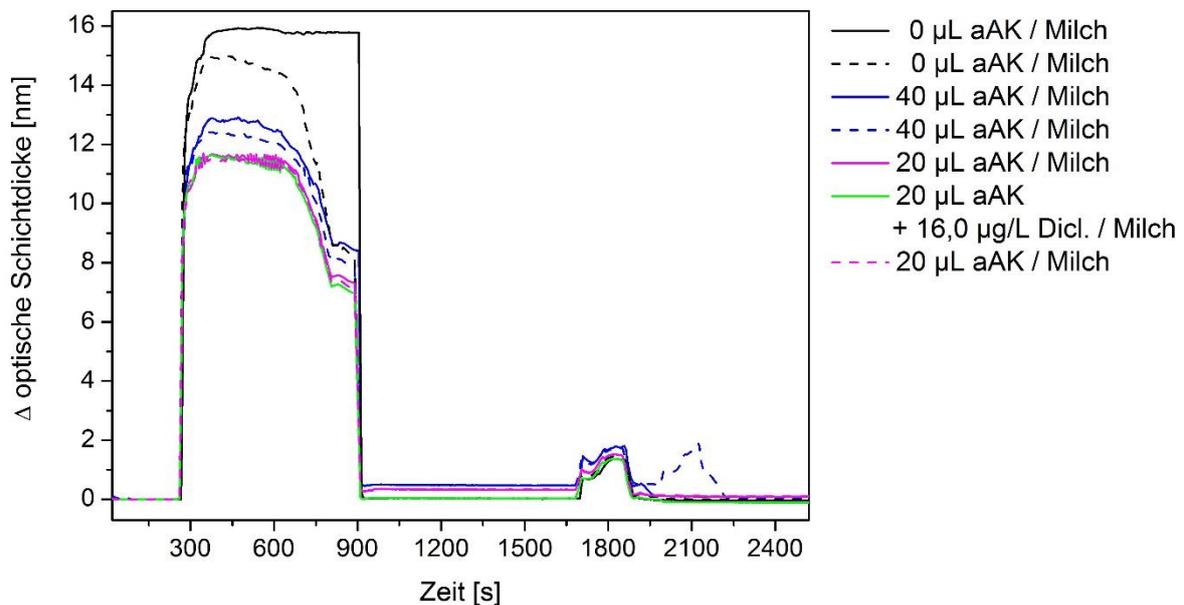


Abbildung 55: Typische Bindungskurven in pasteurisierter Milch, welche keiner Probenvorbereitung unterworfen wurde.

Wie in Abschnitt 3.7.3 beschrieben, überlagern die Brechungsindexänderung sowie die Tyndall-Streuung das Bindungssignal während der Probeninjektion und machen eine Auswertung kaum möglich. Die Auswertung muss über die Höhe eines definierten Bereiches der Dissoziationsphase erfolgen. In Abbildung 56 ist der Dissoziationsbereich der obigen Messungen vergrößert dargestellt:

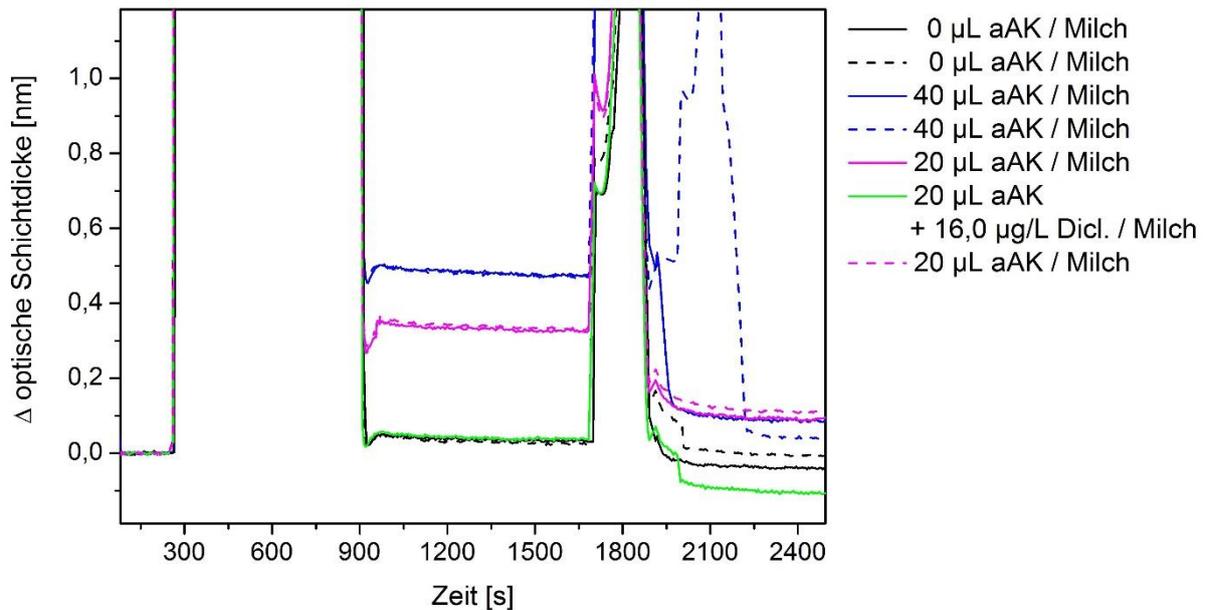


Abbildung 56: Vergrößerte Darstellung des Dissoziationsbereichs der Messungen aus Abbildung 55.

Eine große Herausforderung bei der Entwicklung von optischen Biosensoren, die für Milchmessungen eingesetzt werden sollen, ist die Reduzierung unspezifischer Wechselwirkungen insbesondere von Fetten und Proteinen mit der Sensoroberfläche. Um diese unerwünschten Wechselwirkungen zu minimieren, sind die Eigenschaften der Sensoroberfläche entscheidend. Dies gilt vor allem dann, wenn die Milchfette und -proteine in der Probe verbleiben, sprich wenn eine Probenvorbereitung vermieden werden soll.

Die Sensoroberfläche wurde wie in Abschnitt 3.6.1 beschrieben modifiziert, um möglichst geringe unspezifische Wechselwirkungen zu erhalten. Durch die Bestimmung der Hydrophobizität der sensitiven Schicht können erste Schlussfolgerungen auf die Anfälligkeit der Oberfläche bezüglich unspezifischer Wechselwirkungen von Milchfetten gezogen werden. Hierfür wurde die Hydrophobizität der sensitiven Schicht dreier Transducer mittels Kontaktwinkelmessungen bestimmt. Als Mittelwert konnte 39° erhalten werden. Demzufolge sollte die Oberfläche kaum anfällig für unspezifische Wechselwirkungen von Fetten sein. Diese Annahme konnte mittels RfS-Messungen bestätigt werden (Abbildung 56). Bei Milchmessungen ohne Zugabe von anti-Diclofenac Antikörper sollte das Signal am Ende der Dissoziationsphase der Höhe der Baseline entsprechen. Je anfälliger die Oberfläche bezüglich unspezifischer Wechselwirkungen mit Matrixbestandteilen, desto höher ist das Signal am Ende der Dissoziationsphase. Die verwendete Oberfläche ist sehr gut für Milchmessungen geeignet: das Signal am Ende der Dissoziationsphase liegt nur 0,02 nm über der Höhe der Baseline. Demzufolge sind unspezifische Wechselwirkungen der Matrixbestandteile mit der Sensoroberfläche vernachlässigbar. Es ist nicht nötig, die erhaltenen Bindungssignale mit den Bindungssignalen der reinen Milchmessungen zu referenzieren, stattdessen kann direkt die absolute Signalthöhe ausgewertet werden.

Da am Anfang der Dissoziationsphase noch Milchbestandteile von der Oberfläche und aus der Flusszelle gespült werden, ist es vorteilhaft, die Signalthöhe am Ende der Dissoziationsphase

Ergebnisse

auszuwerten. Hierfür muss jedoch sichergestellt sein, dass der gebundene Antikörper nicht von der Oberfläche dissoziiert. Diese Vorbedingung ist hier erfüllt (Abbildung 49, Puffermessung): Keine Antikörperdissoziation kann während der Dissoziationsphase beobachtet werden. Demzufolge kann ein Signalbereich am Ende der Dissoziationsphase zur Auswertung herangezogen werden.

Erhebliche Probleme bei der Analyse und Quantifizierung von NSAIDs in Lebensmitteln sind auf unspezifische Wechselwirkungen der NSAIDs selbst mit Matrixproteinen oder -fetten zurückzuführen [Gentili 2012]. Diese in der Literatur beschriebenen Matrixeffekte beeinflussen jedoch die hier elementare Antigen-Antikörper Wechselwirkung nicht und haben demzufolge keinen Einfluss auf den Biosensor. Dies kann durch sehr gute Wiederfindungsraten bewiesen werden (Abbildung 58). Die effektive Analyt-Konzentration entspricht der tatsächlichen Analyt-Konzentration.

Die veränderten physiko-chemischen Eigenschaften der Probenmatrix beeinflussen den Biosensor und machen sich in einer anderen Signaldynamik bemerkbar. So ist beispielsweise der Arbeitsbereich der Kalibrierkurve in Milch deutlich breiter als in Puffer (Tabelle 35).

In Tabelle 33 sind mögliche Matrixeffekte, ihr Auftreten und die zu ihrer Vermeidung durchgeführten Maßnahmen zusammengefasst:

Tabelle 33: Zusammenfassung der möglichen Matrixeffekte, ihr Auftreten und die zu ihrer Vermeidung durchgeführten Maßnahmen.

Matrixeffekt	Einfluss auf die Messung	Matrixeffekt vorhanden	Durchgeführte Maßnahme zur Vermeidung
unspezifische Wechselwirkungen mit dem Analyt unspezifische Wechselwirkungen mit dem Antikörper	effektive Antigen- bzw. Antikörper-Konzentration \neq tatsächliche Antigen- bzw. Antikörper-Konzentration	nein	---
unspezifische Wechselwirkungen mit der Sensoroberfläche	Unspezifisches Signal effektive Antigen- bzw. Antikörper-Konzentration \neq tatsächliche Antigen- bzw. Antikörper-Konzentration	vernachlässigbar	Optimierte Oberflächenmodifikation
Änderung der physiko-chemischen Bedingungen in Lösung wie Streuquerschnitt, Brechungsindex, Ionenstärke oder pH-Wert	Andere Signaldynamik Überlagerung des tatsächlichen Signals	ja	Kalibrierung in Probenmatrix Angepasste Auswertestrategie

Dank einer optimalen Oberflächenmodifikation und einer angepassten Auswertestrategie konnten Matrixeffekte demzufolge fast vollständig verhindert oder umgangen werden. Nicht einmal geringe Probenvorbereitungsschritte wie beispielsweise eine Verdünnung mit Puffer sind erforderlich. Es ist möglich, direkt in unverdünnter Kuhmilch zu messen. Dies ist ein großer Vorteil gegenüber Standardmethoden, die zum Nachweis und zur Quantifizierung von Diclofenac in Kuhmilch umfassender Probenvorbereitungen bedürfen.

4.4.3 Kalibrierung und Validierung des Biosensors in Kuhmilch

Im Vergleich zu einem Messzyklus in Puffer mussten kleinere Anpassungen durchgeführt werden: Es wurde mehr Puffer und Regenerationslösung benötigt, um die Sensoroberfläche zu

Ergebnisse

spülen oder zu regenerieren. Zudem wurde der pH-Wert der Regenerationslösung auf 1,6 angepasst.

Die erhaltenen Bindungssignale sind regenerierbar, reproduzierbar (sehr gute Intra-Chip Reproduzierbarkeit) und konzentrationsabhängig (Abbildung 56). Mittels eines Bindungs-inhibitionsassays konnte die Spezifität des Bindungssignals bewiesen werden.

Der Biosensor wurde in pasteurisierter Milch (1,5 % Fett) anhand von Diclofenac-Konzentrationen im Bereich von 0,04 bis 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ kalibriert. Die erhaltene Kalibrierkurve sowie die Logistikkfunktion sind in Abbildung 57 zu sehen:

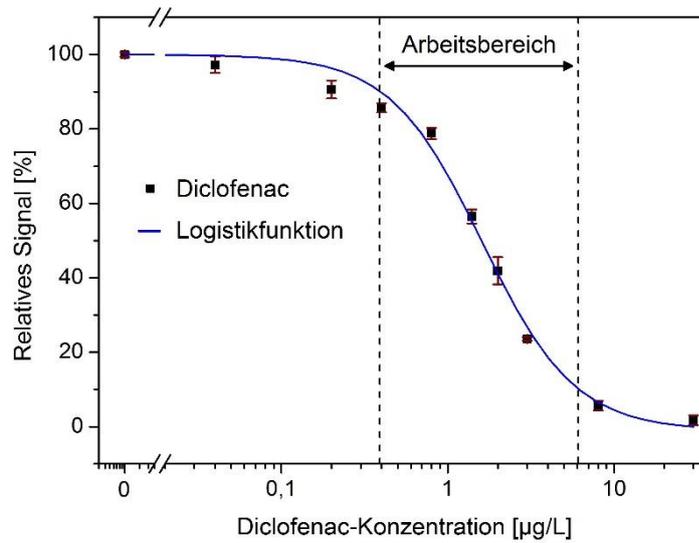


Abbildung 57: Kalibrierkurve und Logistikkfunktion der Kalibrierung von Diclofenac in pasteurisierter Milch (1,5 % Fett).

Die dazugehörigen Parameter der Logistikkfunktion, die Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie der Arbeitsbereich sind in Tabelle 34 zusammengefasst:

Tabelle 34: Parameter, Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie Arbeitsbereich der Diclofenac-Kalibrierung in pasteurisierter Milch (1,5 % Fett).

A_1 [%]	$100,0 \pm 2,21$
A_2 [%]	$-1,06 \pm 3,34$
x_0 [$\mu\text{g L}^{-1}$]	$1,62 \pm 0,12$
p	$1,57 \pm 0,16$
LOD [ng L^{-1}]	112,7
LOQ [ng L^{-1}]	246,9
Arbeitsbereich [$\mu\text{g L}^{-1}$]	0,438 – 6,218

Um die erhaltene Kalibrierkurve und die verwendete Logistikkfunktion zu validieren, wurden Wiederfindungsraten dreier verschiedenen Diclofenac-Konzentrationen ($0,56 \mu\text{g L}^{-1}$, $1,11 \mu\text{g L}^{-1}$ und $2,32 \mu\text{g L}^{-1}$) bestimmt. Diese lagen mit $107,1 \% \pm 2,2 \%$, $117,1 \% \pm 2,5 \%$ und $106,2 \% \pm 1,1 \%$ im geforderten Bereich zwischen 70-120 % (Abbildung 58).

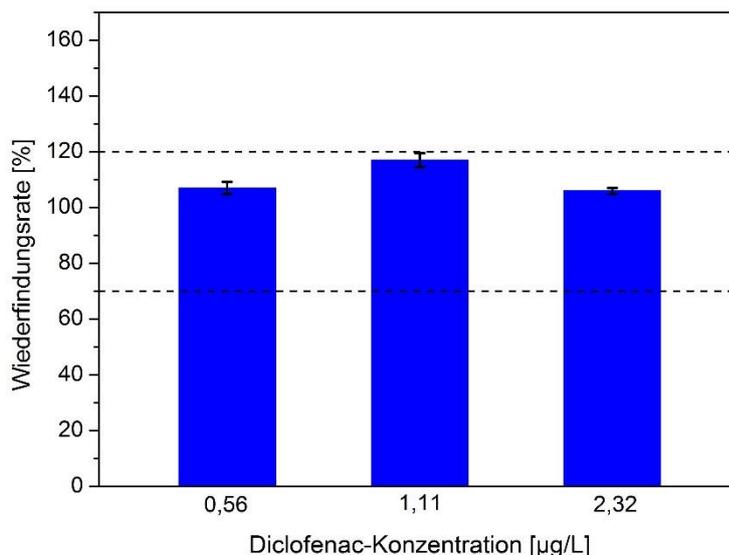


Abbildung 58: Wiederfindungsraten dreier Diclofenac-Konzentrationen ($0,56 \mu\text{g L}^{-1}$, $1,11 \mu\text{g L}^{-1}$ und $2,32 \mu\text{g L}^{-1}$) in pasteurisierter Milch (Fettgehalt: 1,5 %).

Vergleicht man die erhaltenen Kenngrößen für die Kalibrierungen in den Matrices Puffer und Milch (Tabelle 35), so wird der Einfluss der physiko-chemischen Wechselwirkungen auf die affine Bindung zwischen Antigen und Antikörper deutlich. Die Steigung der Kalibrierkurve in Milch ist deutlich geringer als in Puffer. Ein breiterer Arbeitsbereich wird erhalten. Erfreulicherweise werden trotz der komplexeren Probenmatrix niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen als in Puffer erreicht.

Tabelle 35: Kenngrößen der Diclofenac-Kalibrierung in Puffer und pasteurisierter Milch (1,5 % Fett).

Matrix	Puffer	Milch
A_1 (%)	$96,81 \pm 2,00$	$100,0 \pm 2,21$
A_2 (%)	$3,21 \pm 2,59$	$-1,06 \pm 3,34$
x_0 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$0,81 \pm 0,03$	$1,62 \pm 0,12$
p	$2,63 \pm 0,41$	$1,57 \pm 0,16$
LOD (ng L^{-1})	284,2	112,7
LOQ (ng L^{-1})	493,3	246,9
Arbeitsbereich ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,399 – 2,227	0,438 – 6,218

Vergleicht man den entwickelten Biosensor mit bereits existierenden Standardmethoden, ist die Messzeit mit ca. 40 Minuten zwar höher, jedoch bedarf der Biosensor im Gegensatz zu diesen keiner Probenvorbereitung. In der Literatur beschriebene Methoden benötigen zur Probenvorbereitung mindestens 50 Minuten, da im Regelfall mehrere Vorbereitungsschritte wie Extraktion mit beispielsweise Acetonitril/Methanol oder Festphasenextraktion erfolgen [Gallo 2008, Dowling 2009, Dowling 2010, Azzouz 2011, Dubreil-Chéneau 2011, Peng 2013].

Ergebnisse

Zudem ist die mit diesem Biosensor erhaltene Nachweisgrenze vergleichbar [Azzouz 2011, Gentili 2012, Jedziniak 2012] oder besser [Gallo 2008, Dowling 2009, Solangi 2009, Dowling 2010, Dubreil-Chéneau 2011, Peng 2013] als die dieser publizierten Standardmethoden und liegt mit $0,112 \mu\text{g L}^{-1}$ bzw. $0,108 \mu\text{g kg}^{-1}$ im Bereich der erlaubten Rückstandshöchstmenge von Diclofenac in Kuhmilch, welche $0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ beträgt. Der entwickelte Biosensor ist somit zum Nachweis von relevanten Konzentrationen in Kuhmilchproben sehr gut einsetzbar und wäre damit der erste optische Biosensor zum Nachweis von Diclofenac in Kuhmilch.

4.5 Quantifizierung von Diclofenac in der Probenmatrix Oberflächenwasser

Exemplarisch wurde in dieser Arbeit Flusswasser als Probenmatrix für den Nachweis und die Quantifizierung von Diclofenac in der Umwelt verwendet. Auch hier spielen auf Grund der vielen Bestandteile der Probenmatrix Matrixeffekte eine nicht zu vernachlässigende Rolle und müssen untersucht werden.

Um bei der Kalibrierung des Biosensors von diesen Matrixeffekten unabhängig zu sein, wurde die Kalibrierung in ultrafiltriertem entsalztem Wasser durchgeführt. Dies ermöglicht im Idealfall einen Transfer der Kalibrierkurve auf verschiedene Oberflächengewässer.

4.5.1 Kalibrierung und Validierung in ultrafiltriertem entsalztem Wasser

Da Antikörper empfindliche Biomoleküle darstellen, die in Wasser als Probenmatrix nach einiger Zeit denaturieren, wurden kleine Anpassungen der Messroutine durchgeführt, um annähernd physiologischen Bedingungen zu schaffen. Die Bindungssignale sind regenerierbar, reproduzierbar, spezifisch und konzentrationsabhängig (Daten nicht gezeigt).

Der Biosensor wurde in ultrafiltriertem entsalztem Wasser kalibriert. Die erhaltene Kalibrierkurve ist in Abbildung 59 dargestellt:

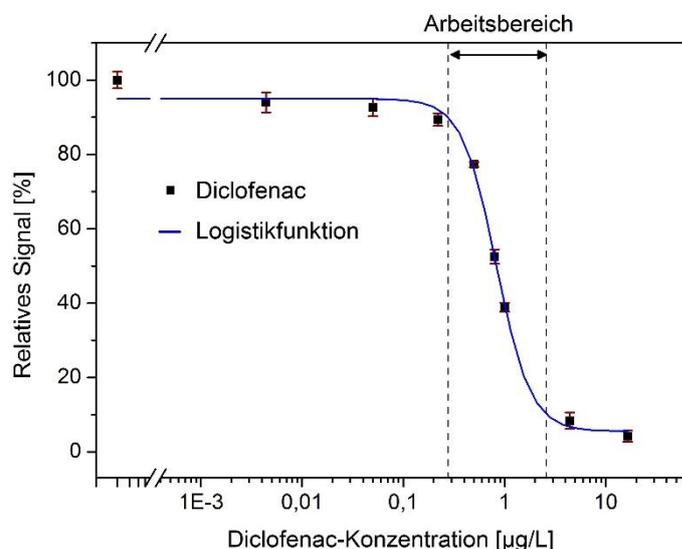


Abbildung 59: Kalibrierkurve, zugehörige Logistikkurve und Arbeitsbereich in ultrafiltriertem entsalztem Wasser.

Die Kennzahlen der Kalibrierung wie die Parameter der Logistikkurve, die Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie der Arbeitsbereich sind in Tabelle 37 zusammengefasst:

Ergebnisse

Tabelle 36: Parameter, Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie Arbeitsbereich der Diclofenac-Kalibrierung in ultrafiltriertem entsalztem Wasser.

A ₁ [%]	94,97 ± 1,63
A ₂ [%]	5,56 ± 2,27
x ₀ [µg L ⁻¹]	0,83 ± 0,04
p	2,58 ± 0,36
LOD [ng L ⁻¹]	218,3
LOQ [ng L ⁻¹]	452,8
Arbeitsbereich [µg L ⁻¹]	0,257 – 2,413

Die Parameter der Logistikkfunktion sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen entsprechen erwartungsgemäß den Kenngrößen, welche bei der Kalibrierung von Diclofenac in Puffer erhalten wurden (Tabelle 37).

Tabelle 37: Kenngrößen der Diclofenac-Kalibrierung in Puffer und ultrafiltriertem entsalztem Wasser.

Matrix	Puffer	Wasser
A ₁ (%)	96,81 ± 2,00	94,97 ± 1,63
A ₂ (%)	3,21 ± 2,59	5,56 ± 2,27
x ₀ (µg L ⁻¹)	0,81 ± 0,03	0,83 ± 0,04
p	2,63 ± 0,41	2,58 ± 0,36
LOD (ng L ⁻¹)	284,2	218,3
LOQ (ng L ⁻¹)	493,3	452,8
Arbeitsbereich (µg L ⁻¹)	0,399 – 2,227	0,257 – 2,413

Dieses Ergebnis bestätigt die erfolgreiche Anpassung der Messroutine bezüglich beispielsweise physiologischer Bedingungen in der Probe, welche essentiell für die Funktionalität des Antikörpers sind.

Um die erhaltene Kalibrierkurve und die verwendete Logistikkfunktion zu validieren, wurden Wiederfindungsraten bestimmt. Es wurden vier verschiedene Diclofenac-Konzentrationen (0,56 µg L⁻¹, 1,11 µg L⁻¹, 1,48 µg L⁻¹ und 1,86 µg L⁻¹) vermessen (Abbildung 60).

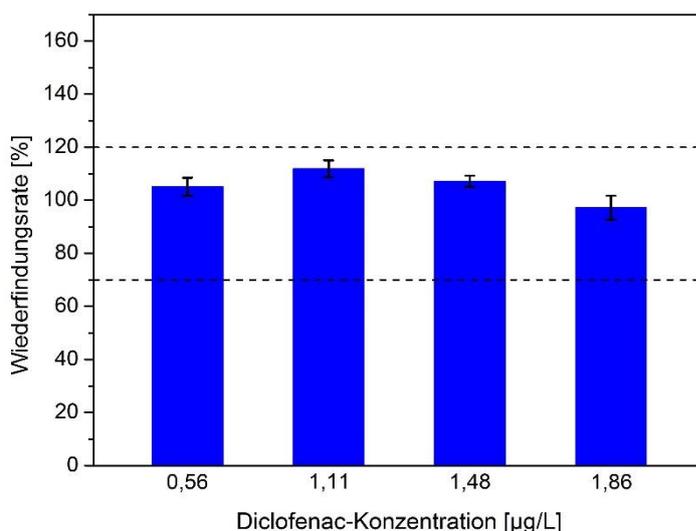


Abbildung 60: Wiederfindungsraten vierer Diclofenac-Konzentrationen in ultrafiltriertem entsalztem Wasser.

Es konnten sehr gute Wiederfindungsraten mit kleinen Standardabweichungen erhalten werden. Die für diese Messungen verwendeten Proben wurden zudem im Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung mittels LC-MS/MS vermessen. Ein Vergleich der erhaltenen Wiederfindungsraten mittels RfS und LC-MS/MS ist in Abbildung 61 zu sehen:

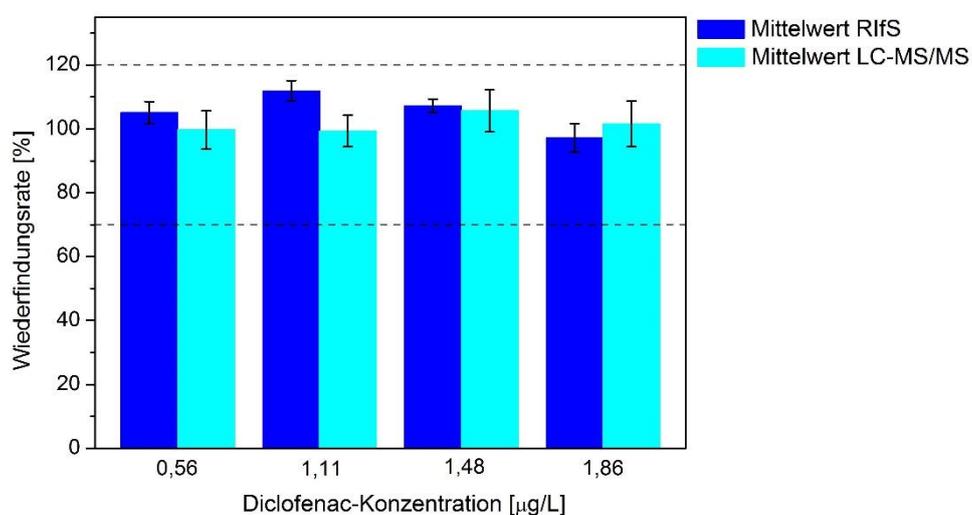


Abbildung 61: Wiederfindungsraten vierer Diclofenac-Konzentrationen in ultrafiltriertem entsalztem Wasser, gemessen mittels RfS bzw. LC-MS/MS.

Die Messungen sind sehr gut vergleichbar. Dies wird in Abbildung 62 noch einmal verdeutlicht dargestellt:

Ergebnisse

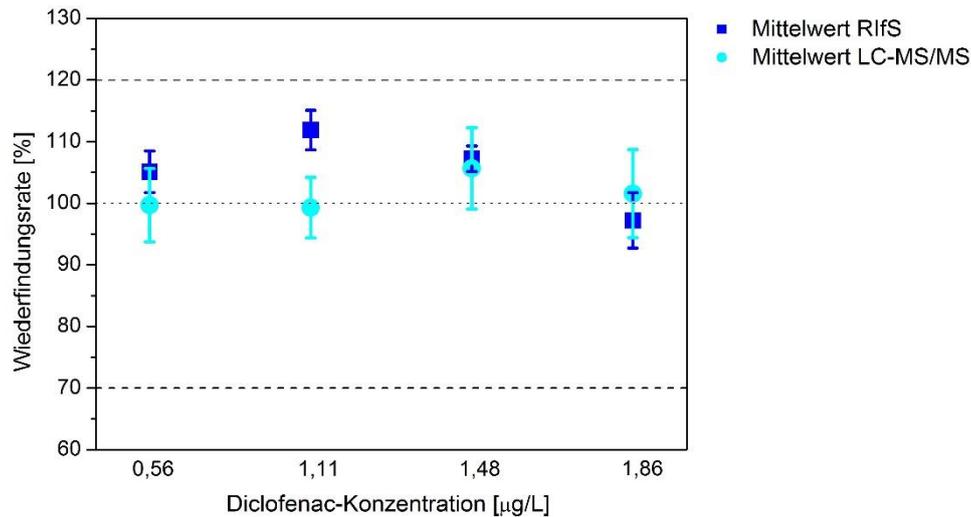


Abbildung 62: Vergleich der Wiederfindungsraten gemessen mittels RfS bzw. LC-MS/MS.

Sowohl durch die Wiederfindungsraten selbst, als auch durch die Vergleichsmessungen mit LC-MS/MS konnte der Biosensor in ultrafiltriertem Wasser erfolgreich validiert werden. Die gemessene Kalibrierkurve soll für die folgenden Messungen in verschiedenen Oberflächengewässern sowie für alle damit verbundenen Untersuchungen verwendet werden.

4.5.2 Untersuchung von Matrixeffekten am Beispiel von Huminsäuren

Oberflächenwasser enthält eine Vielzahl von gelösten und partikulär gebundenen Substanzen sowie ungelöste Stoffe, die sowohl einzeln als auch in Kombination Matrixeffekte verursachen können. In der Literatur beschriebene Immunoassays, welche sich mit der Detektion und Quantifizierung von Schadstoffen in Fließgewässern beschäftigen, weisen oftmals auf das hohe Interferenzpotential von Huminsäuren hin [Toscano 1998, Deng 2003, Brun 2005].

Huminsäuren sind hochmolekulare Verbindungen (2.000 - 300.000 Da), die neben anderen Huminstoffen während des Abbauprozesses von biologischem Material gebildet werden. Neben den Huminsäuren werden auch Fulvonsäuren und Humine als Huminstoffe bezeichnet. In Oberflächengewässern beträgt der Anteil der Huminstoffe am gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) bis zu 80 % [Burba 1994].

Da mit diesem Biosensor in Oberflächenwasser möglichst ohne Probenvorbereitung gemessen werden soll, muss bei der Entwicklung des Immunosensors verstärkt auf die Reduzierung oder Vermeidung von Matrixeffekten durch optimierte Assaybedingungen geachtet werden.

Die zu analysierenden Proben wurden mit 10 verschiedene Huminsäure-Konzentrationen versetzt: 0,05 mg L⁻¹, 0,1 mg L⁻¹, 0,2 mg L⁻¹, 0,5 mg L⁻¹, 0,7 mg L⁻¹, 1,0 mg L⁻¹, 1,5 mg L⁻¹, 2,0 mg L⁻¹, 3,0 mg L⁻¹ und 5,0 mg L⁻¹. Um den Einfluss der Huminsäuren auf die Sensoroberfläche, den Antikörper und die Detektionsmethode getrennt von dem Einfluss auf den nachzuweisenden Analyten, Diclofenac, untersuchen zu können, wurden die Proben zudem sowohl ohne als auch mit dem Zusatz von Diclofenac vermessen.

Entsprechend der normalen Messroutine wurden die Huminsäure-Proben ohne Diclofenac-Zusatz 30 min bei RT mit dem Antikörper inkubiert. In diesem Zeitraum können mögliche unspezifische Wechselwirkungen zwischen dem Antikörper und den Huminsäuren ausgebildet werden. Die Huminsäure-Proben mit Diclofenac-Zusatz wurden vor Inkubation mit dem Antikörper 24 h unter Rühren an RT im Dunkeln gelagert. Damit sollen Realbedingungen simuliert werden und gewährleistet werden, dass sich mögliche unspezifische Wechselwirkungen zwischen den Huminsäuren und dem Diclofenac ausbilden können.

Sowohl die Messungen ohne als auch mit Diclofenac-Zusatz zeigen mit steigender Huminsäure-Konzentration eine zunehmende Krümmung des Bindungssignals (Abbildung 63). Des Weiteren ist die Oberfläche im Verlauf eines normalen Messzyklus mit zunehmender Huminsäure-Konzentration nicht mehr vollständig regenerierbar und es müssen zusätzliche Regenerationscyclen durchgeführt werden, um die unspezifisch gebundenen Huminsäuren von der Oberfläche zu lösen.

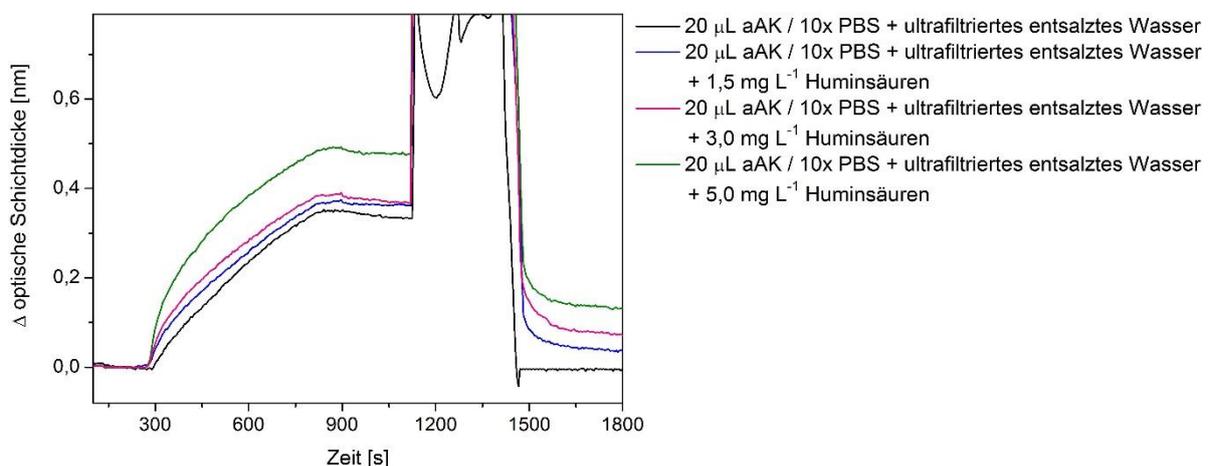


Abbildung 63: exemplarische Bindungskurven ohne Diclofenac-Zusatz mit steigenden Huminsäure-Konzentrationen; Huminsäure-Konzentrationen: $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, $3,0 \text{ mg L}^{-1}$, $5,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Folglich sind also Interferenzen auf Grund der geänderten physiko-chemischen Bedingungen sowie durch unspezifische Wechselwirkungen mit der Sensoroberfläche zu beobachten. Es treten keine unspezifischen Wechselwirkungen der Huminsäuren mit Diclofenac selbst oder dem Antikörper auf.

In Abbildung 64 sind erhaltene Messsignale im Vergleich dargestellt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden nicht alle, sondern nur einzelne Huminsäure-Konzentrationen aufgetragen.

Ergebnisse

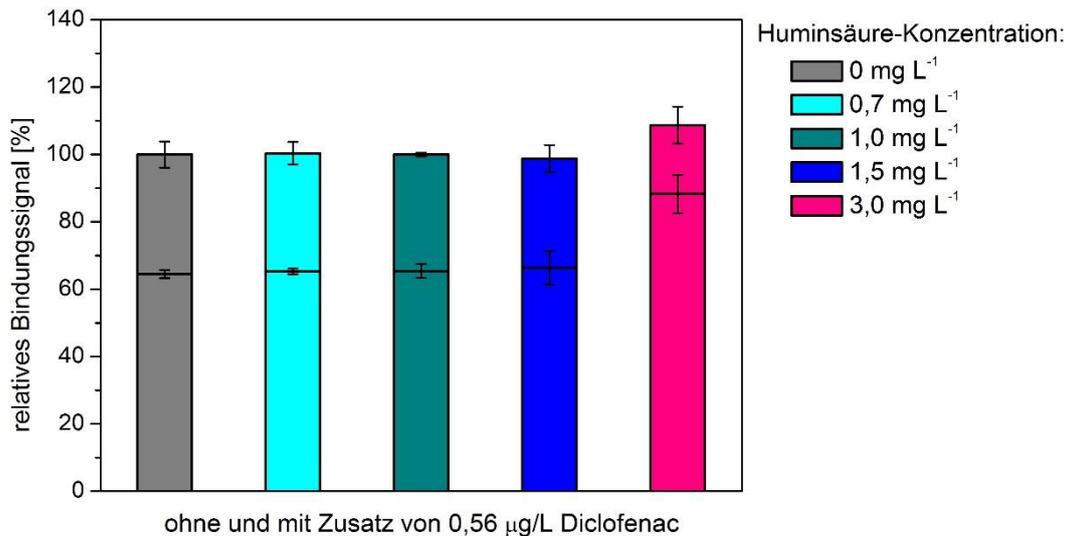


Abbildung 64: Messsignale ohne (jeweils höheres Signal) und mit Zusatz (jeweils niedrigeres Signal) von $0,56 \mu\text{g L}^{-1}$ Diclofenac bei verschiedenen Huminsäure-Konzentrationen in der Probe. Exemplarisch sind die Messsignale für Huminsäure-Konzentrationen von 0 mg L^{-1} , $0,7 \text{ mg L}^{-1}$, $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, und $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ aufgetragen. Alle Messsignale wurden auf das Bindungssignal der Probe ohne Huminsäure- oder Diclofenac-Zusatz normiert.

Bis zu einer Huminsäure-Konzentration von $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ sind die Signale trotz Krümmung auswertbar. Das spezifische Bindungssignal wird jedoch zunehmend durch Matrixeffekte überlagert. Dies wird auch anhand der erhaltenen Wiederfindungsraten (Abbildung 65) deutlich. Die Messsignale wurden hierbei auf die Kalibrierfunktion in ultrafiltriertem entsalztem Wasser bezogen.

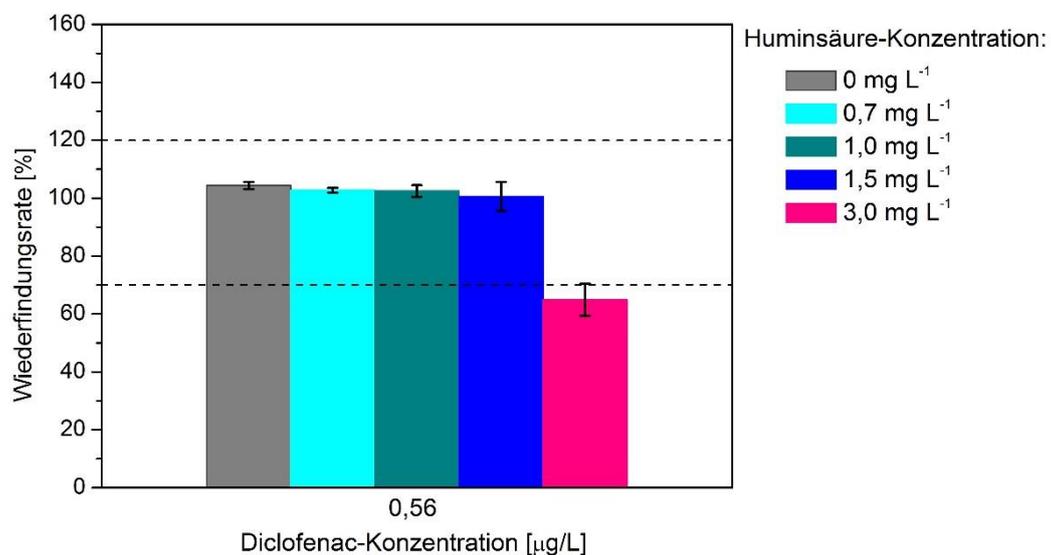


Abbildung 65: Wiederfindungsraten bei Zusatz von $0,56 \mu\text{g L}^{-1}$ Diclofenac. Exemplarisch sind die Messsignale für Huminsäure-Konzentrationen von 0 mg L^{-1} , $0,7 \text{ mg L}^{-1}$, $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, und $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ aufgetragen.

Der hier entwickelte Immunoassay toleriert somit Huminsäure-Konzentrationen bis zu einer Konzentration von $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ohne jegliche Probleme. Im Konzentrationsbereich zwischen $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ und $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ machen sich die Matrixeffekte im Messsignal zunehmend bemerkbar. Dennoch ist es möglich, Diclofenac-Wiederfindungsraten im geforderten Bereich zwischen 70 und 120 % zu erreichen. Der Biosensor kann dementsprechend bis zu einer Huminsäure-Konzentration von $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ eingesetzt werden. Dies ist ein sehr gutes Ergebnis und zeigt die erfolgreiche Entwicklung des Biosensors im Hinblick auf eine möglichst große Reduzierung von Matrixeffekten auf.

Der einzige andere in der Literatur publizierte optische Biosensor zum Nachweis und zur Detektion von Diclofenac in Oberflächengewässer ist fluoreszenz-basiert und sollte deutlich weniger anfällig für Matrixeffekte sein [Deng 2003]. Dennoch toleriert dieser Biosensor nur Huminsäure-Konzentrationen unter $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ und ist somit weit anfälliger für Matrixeffekte als der in dieser Arbeit entwickelte Biosensor. Spekulationen der Autoren Deng et al., dass die beobachteten starken Matrixeffekte möglicherweise auf eine Kombination aus unspezifischer Wechselwirkung sowohl mit Diclofenac als auch mit dem anti-Diclofenac Antikörper beruhen, können hier nicht bestätigt werden. In dieser Arbeit wurden bei Huminsäure-Konzentrationen unter $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ keine unspezifischen Wechselwirkungen von Huminsäuren mit Diclofenac oder dem Antikörper beobachtet. Die in dieser Arbeit beobachteten Matrixeffekte kamen bei deutlich höheren Huminsäure-Konzentrationen vor allem durch stark geänderte physiko-chemische Bedingungen (Brechungsindex, Absorptionskoeffizient usw.) und unspezifische Wechselwirkungen mit der Sensoroberfläche zustande.

4.5.3 Flusswasserproben

Um die Eignung des entwickelten Biosensors, Diclofenac qualitativ und quantitativ in Flusswasser detektieren zu können, zu evaluieren, wurden Wasserproben verschiedenen Flüssen entnommen (Abschnitt 3.9). Die Probenentnahmeorte wurden nach verschiedenen Kriterien ausgewählt. Entscheidend war hierbei jedoch vor allem, sowohl möglichst potentiell verschmutztes (Huminsäuren etc.) als auch möglichst reines Flusswasser als Probe zu erhalten. In Abbildung 66 sind verschiedene Probeentnahmeorte schematisch dargestellt:

Ergebnisse



Abbildung 66: Schematische Übersicht der Probenentnahmeorte Erzgrube (Nagold), Gompelscheuer (Große Enz) und Pforzheim (Enz).

Das Flusswasser der Nagold (Erzgrube, Seewald) und der Großen Enz (Gompelscheuer, Enzklösterle) wurde Quell-nah entnommen. Diese Flusswasserproben sollten annähernd frei von potentiell störenden Matrixbestandteilen wie Huminsäuren oder von Kontaminationen sein. Um das entnommene Flusswasser näher zu klassifizieren und die obigen Vermutungen zu bestätigen, wurden die Proben auf ihren Ammonium-, Nitrat-, Nitrit- und ihren Phosphat-Gehalt untersucht. Zudem wurden die Gesamthärte, der pH-Wert sowie der gelöste organische Kohlenstoff (dissolved organic carbon, DOC) bestimmt (Tabelle 38):

Tabelle 38: Parameter der Flusswasserproben.

Parameter	Nagold	Große Enz	Enz
Ammonium [ppm]	< 0,05	0,2	> 0,2
Nitrat [ppm]	0-10	0	0-10
Nitrat [ppm]	< 0,02	< 0,02	> 0,02
Phosphat [ppm]	0,5	0-0,5	0,5-1,2
Gesamthärte [°d]	1-2	0-1	5-6
pH	7,2	5,7	7,0
DOC [mg L ⁻¹]	0,4	0,8	2,5

Die erhaltenen Werte entsprechen den Vermutungen. Der DOC-Wert der Nagold- und der Große Enz-Flusswasserprobe ist sehr gering. Beide Proben sollten dementsprechend kaum Huminsäuren aufweisen.

Zusätzlich zu den Quell-nahen Probeentnahmeorten, wurde in Pforzheim, kurz nach Zusammenfluss der Nagold und der Enz, Enzwasser entnommen. Dieses enthält mit einem DOC-Gehalt von $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ bereits mehr gelöste organische Verbindungen. Dennoch ist dieser Wert für ein Oberflächengewässer überraschend gering. Aufgrund der vielen landwirtschaftlichen Nutzflächen, welche von Nagold und Enz durchflossen werden, bevor sie sich in Pforzheim vereinigen, und einiger kommunaler Abwasser, ist der Phosphat-Gehalt erwartungsgemäß höher wie im Quell-nahen Flusswasser der Großen Enz und der Nagold und auch die Gesamthärte entspricht nun einem Wert von 5-6 °d.

Des Weiteren wurde der Elbe im Stadtgebiet von Magdeburg Flusswasser entnommen.

4.5.4 Wiederfindungsraten in filtriertem und danach gespiktem Flusswasser

Um zu untersuchen, ob der entwickelte Biosensor in der Probenmatrix Flusswasser überhaupt einsetzbar ist, wurden zuerst steril filtrierte Proben der Nagold, der Großen Enz und der Enz vermessen. Der anti-Diclofenac Antikörper ist dank der leicht veränderten Messroutine, die bereits für Messungen in ultrafiltriertem entsalztem Wasser verwendet wurde (Abschnitt 4.5.1), während der Inkubationszeit auch in Flusswasser stabil und denaturiert nicht. Die Signalsteigungen entsprechen denen in ultrafiltriertem entsalztem Wasser.

In allen drei Flusswasserproben konnte kein bereits vorliegendes Diclofenac nachgewiesen werden (Nachweisgrenze: $218,3 \text{ ng L}^{-1}$).

Das entnommene Flusswasser der Nagold entspricht annähernd Quellwasser (Tabelle 38) und kommt somit ultrafiltriertem entsalztem Wasser am nächsten. Proben des steril filtrierten Nagold-Flusswassers wurde mit vier verschiedenen Diclofenac-Konzentrationen ($0,56 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $1,11 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $1,48 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ und $1,86 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) versetzt, 48 Stunden unter Lichtausschluss an 4°C gelagert und vermessen. Die erhaltenen Messsignale wurden auf die Logistikkurve der Kalibrierkurve, welche in ultrafiltriertem entsalztem Wasser aufgenommen wurde (Abschnitt 4.5.1), bezogen. Die Wiederfindungsraten sind in Abbildung 67 dargestellt:

Ergebnisse

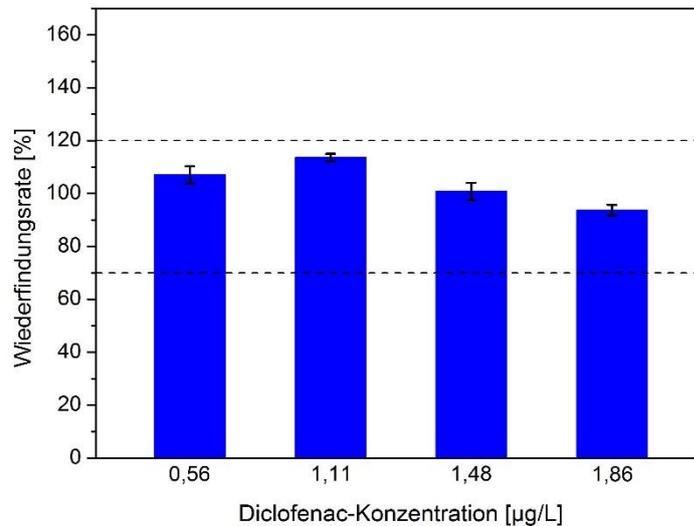


Abbildung 67: Wiederfindungsraten vierer Diclofenac-Konzentrationen in filtriertem und gespiktem Nagold-Flusswasser.

Es konnten sehr gute Wiederfindungsraten mit kleinen Standardabweichungen erhalten werden (Tabelle 39). Die Kalibrierkurve, welche in ultrafiltriertem entsalztem Wasser erhalten wurde, kann folglich sehr gut für Messungen in solch „matrixarmem“ Flusswasser herangezogen werden.

Tabelle 39: Wiederfindungsraten in filtriertem und gespiktem Nagold-Flusswasser, gemessen mittels RI/S.

gespikte Konz. [µg/L]	detekt. Konz. [µg/L]	WF [%]	SD [%]
0,56	0,60	107,1	3,2
1,11	1,26	113,6	1,4
1,48	1,49	100,7	3,3
1,86	1,74	93,7	2,0

Die gespikten Proben wurden zusätzlich im Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung mittels LC-MS/MS vermessen. Ein Vergleich der Wiederfindungsraten, die mittels RI/S bzw. LC-MS/MS erhalten wurden, ist in Abbildung 68 zu finden:

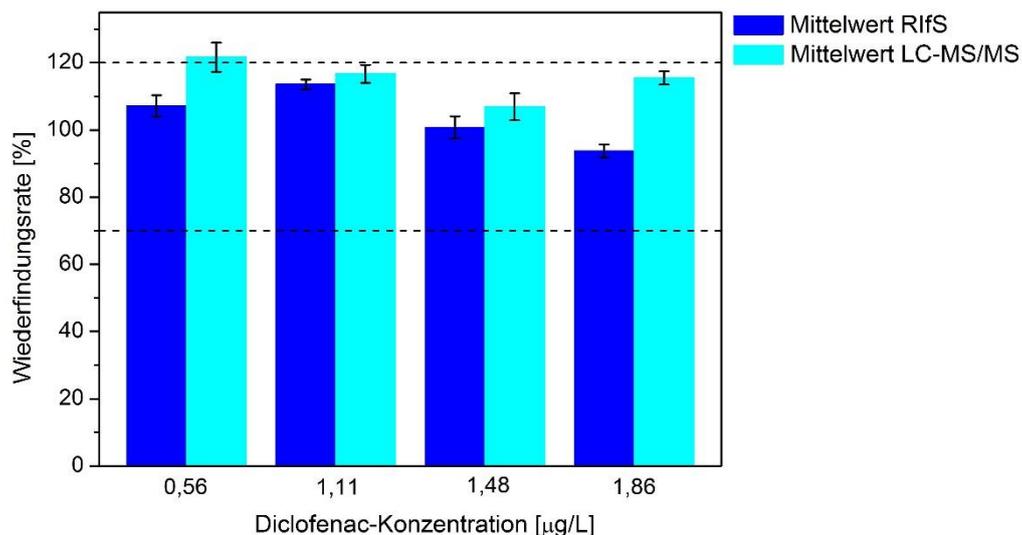


Abbildung 68: Vergleich der Wiederfindungsraten vierer Diclofenac-Konzentrationen in filtriertem und gespiktem Nagold-Flusswasser, gemessen mittels RfS bzw. LC-MS/MS.

Die Wiederfindungsraten, welche mittels LC-MS/MS bestimmt wurden, liegen zwar im geforderten Bereich zwischen 70 – 120 %, sind aber dennoch schlechter als die, die mit dem hier entwickelten Biosensor bestimmt wurden. Dies wird in Tabelle 40 noch einmal verdeutlicht:

Tabelle 40: Vergleich der Wiederfindungsraten in filtriertem und gespiktem Nagold-Flusswasser, gemessen mittels RfS bzw. LC-MS/MS.

	gespikte Konz. [µg/L]	detekt. Konz. [µg/L]	WF [%]	SD [%]
RfS	0,56	0,60	107,1	3,2
LC-MS/MS	0,56	0,68	121,6	4,3
RfS	1,11	1,26	113,6	1,4
LC-MS/MS	1,11	1,29	116,6	2,7
RfS	1,48	1,49	100,7	3,3
LC-MS/MS	1,48	1,58	106,8	4,0
RfS	1,86	1,74	93,7	2,0
LC-MS/MS	1,86	2,15	115,5	2,0

Der entwickelte Biosensor bietet somit eine echte Alternative zu bereits etablierten Standardmethoden.

Das Flusswasser der Großen Enz wurde wie das Nagold-Flusswasser Quell-nah entnommen und hat im Vergleich nur einen leicht höheren DOC (Tabelle 38). Demzufolge sollten Messungen in dieser Probenmatrix kein Problem für den hier entwickelten Biosensor darstellen. Steril filtrierte Proben des Große Enz-Flusswassers wurden mit drei verschiedenen Diclofenac-

Ergebnisse

Konzentrationen ($0,56 \mu\text{g L}^{-1}$, $1,11 \mu\text{g L}^{-1}$ und $1,48 \mu\text{g L}^{-1}$) versetzt, 48 Stunden unter Lichtausschluss bei 4°C gelagert und vermessen. Auch hier wurden die erhaltenen Messsignale auf die Logistikkurve der Kalibrierkurve, welche in ultrafiltriertem entsalztem Wasser aufgenommen wurde (Abschnitt 4.5.1), bezogen. Die erhaltenen Wiederfindungsraten sind in Abbildung 69 dargestellt:

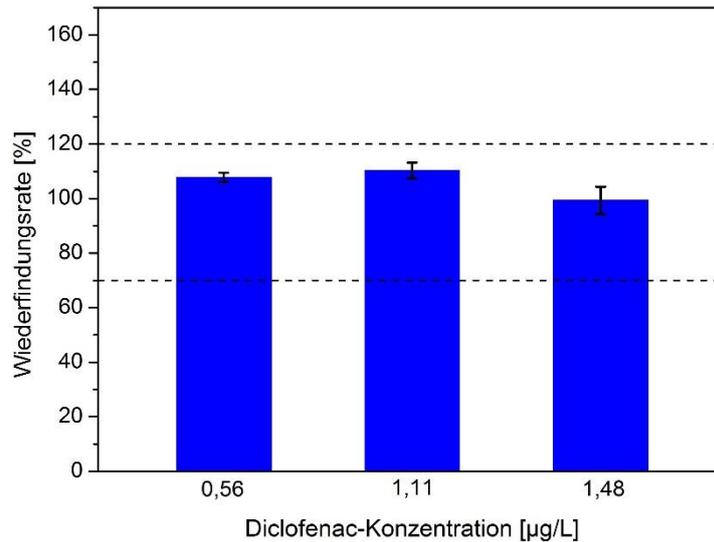


Abbildung 69: Wiederfindungsraten dreier Diclofenac-Konzentrationen in filtriertem und gespiktem Große Enz-Flusswasser.

Die detektierten Konzentrationen und die somit erhaltenen Wiederfindungsraten (Tabelle 41) entsprechen annähernd denen, die in Nagold-Flusswasser erhalten wurden (Tabelle 43).

Tabelle 41: Wiederfindungsraten in filtriertem und gespiktem Große Enz-Flusswasser, gemessen mittels RI/S.

gespikte Konz. [$\mu\text{g/L}$]	detekt. Konz. [$\mu\text{g/L}$]	WF [%]	SD [%]
0,56	0,60	107,7	1,7
1,11	1,22	110,3	2,9
1,48	1,47	99,3	4,8

Somit konnte nicht nur gezeigt werden, dass in beiden Flusswasserproben Messungen ohne Probleme durchgeführt werden konnten, sondern es war gleichzeitig möglich, die sehr gute Inter-Chip Reproduzierbarkeit sowie die sehr gute Reproduzierbarkeit der Biosensor-Vorbereitung unter Beweis zu stellen.

Die Flusswasserprobe der Enz enthält im Unterschied zu denen der Nagold und der Großen Enz schon deutlich mehr gelöste organische Verbindungen (Tabelle 38), die aber gemäß den Voruntersuchungen zu Matrixeffekten von Huminsäuren (Abschnitt 4.5.2), keine Probleme

bereiten sollten. Um dies zu beweisen, wurden Proben des steril filtrierten Enz-Flusswassers mit vier Diclofenac-Konzentrationen ($0,56 \mu\text{g L}^{-1}$, $1,11 \mu\text{g L}^{-1}$, $1,48 \mu\text{g L}^{-1}$ und $1,86 \mu\text{g L}^{-1}$) versetzt, 48 Stunden unter Lichtausschluss an 4°C gelagert und vermessen. Die erhaltenen Messsignale wurden ebenso wie die des Nagold- und des Großen Enz-Flusswassers auf die Logistikkurve der Kalibrierkurve, welche in ultrafiltriertem entsalztem Wasser aufgenommen wurde (Abschnitt 4.5.1), bezogen. Die Wiederfindungsraten sind in Tabelle 42 und Abbildung 70 dargestellt:

Tabelle 42: Wiederfindungsraten in filtriertem und gespiktem Enz-Flusswasser, gemessen mittels RfS.

gespikte Konz. [$\mu\text{g/L}$]	detekt. Konz. [$\mu\text{g/L}$]	WF [%]	SD [%]
0,56	0,58	104,4	2,5
1,11	1,16	104,8	2,0
1,48	1,60	108,5	2,7
1,86	1,75	94,3	3,1

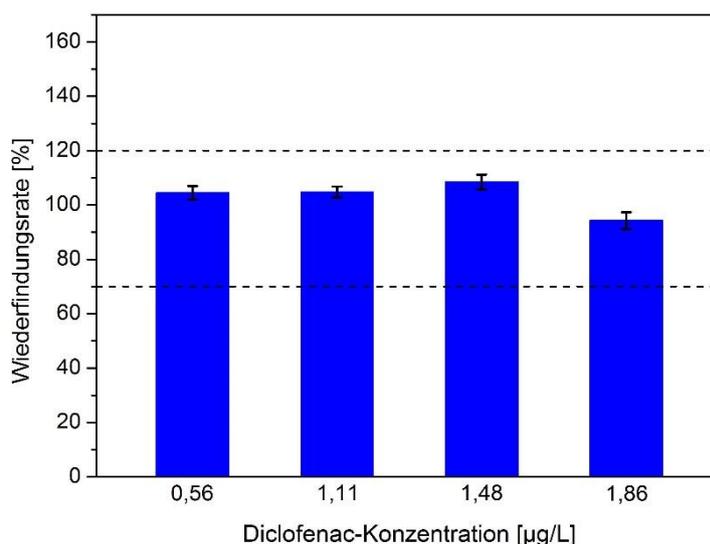


Abbildung 70: Wiederfindungsraten vierer Diclofenac-Konzentrationen in filtriertem und gespiktem Enz-Flusswasser.

Die gemessenen Wiederfindungsraten liegen in einem Bereich zwischen 94,3 % und 108,5 % und zeigen die sehr gute Einsetzbarkeit des Biosensors auch für „matrixreichere“ Flusswasserproben auf.

Ein Vergleich der erhaltenen Wiederfindungsraten in Nagold-, Große Enz- und Enz-Flusswasser ist in Abbildung 71 dargestellt:

Ergebnisse

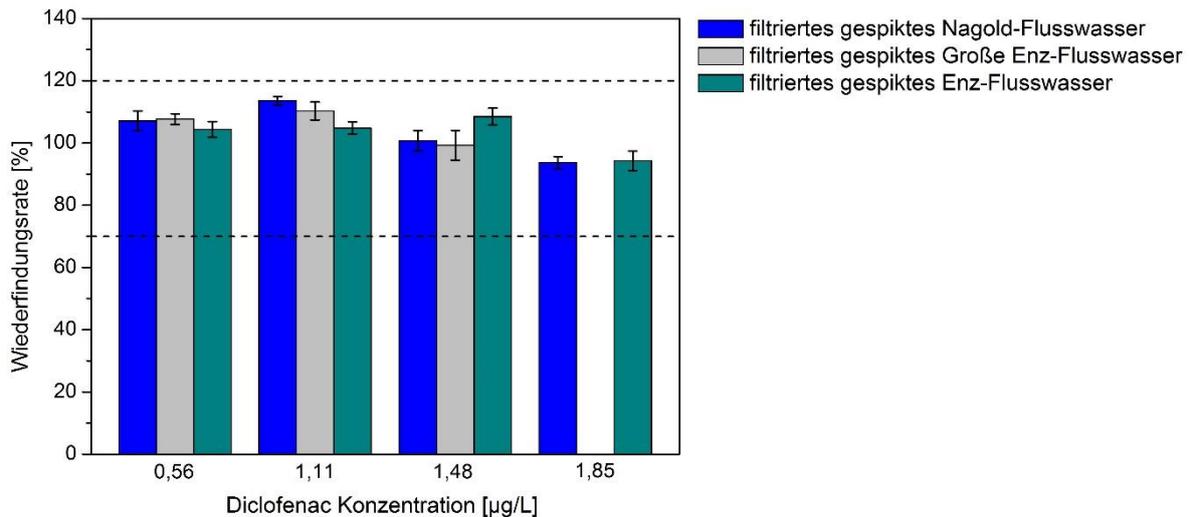


Abbildung 71: Vergleich der Wiederfindungsraten in filtriertem und gespiktem Nagold-, Große Enz- und Enz-Flusswasser.

In allen Flusswasserproben konnten sehr gute Wiederfindungsraten erhalten werden. In Tabelle 43 sind die erhaltenen Daten zusammenfassend aufgeführt:

Tabelle 43: Vergleich der Wiederfindungsraten in filtriertem und gespiktem Nagold-, Große Enz- und Enz-Flusswasser, gemessen mittels RfS.

	gespikte Konz. [µg/L]	detekt. Konz. [µg/L]	WF [%]	SD [%]
Nagold		0,60	107,1	3,2
Große Enz	0,56	0,60	107,7	1,7
Enz		0,58	104,4	2,5
Nagold		1,26	113,6	1,4
Große Enz	1,11	1,22	110,3	2,9
Enz		1,16	104,8	2,0
Nagold		1,49	100,7	3,3
Große Enz	1,48	1,47	99,3	4,8
Enz		1,60	108,5	2,7
Nagold		1,74	93,7	2,0
Große Enz	1,86	---	---	---
Enz		1,75	94,3	3,1

Durch die optimale Entwicklung des Biosensors mit starkem Fokus auf der Vermeidung von Matrixeffekten sind somit auch bei Messungen in „matrixreichem“ Flusswasser keinerlei Matrixeffekte beobachtbar.

Durch die erfolgreiche Anwendbarkeit der Logistikkurve der Kalibrierkurve, welche in ultrafiltriertem entsalztem Wasser aufgenommen wurde, kann eine Kalibrierung in unterschiedlichem Flusswasser vermieden und somit Kosten und Zeit gespart werden.

4.5.5 Untersuchung der Eignung verschiedener Filtermaterialien

Da in allen bisher untersuchten Flusswasser-Proben kein Diclofenac nachweisbar war, wurden diese nach Filtration mit Diclofenac versetzt.

Würde man nun Flusswasser-Proben untersuchen, die Diclofenac in nachweisbarer Konzentration enthielten, muss vorher sichergestellt werden, dass das zu verwendende Filtermaterial nicht mit Diclofenac unspezifisch wechselwirkt und somit die Messung beeinflusst. Um dies zu gewährleisten, wurden sowohl hydrophobe als auch hydrophile Spitzenvorsatzfilter auf ihre Eignung untersucht.

Als Beispiel für hydrophile Spitzenvorsatzfilter wurden Einmalfilter mit einer Cellulosemischester-Membran verwendet. Als Probenmatrix diente bereits steril filtrierte Nagold-Flusswasser. Die Flusswasserproben wurden mit drei Diclofenac-Konzentrationen versetzt ($0,56 \mu\text{g L}^{-1}$, $1,11 \mu\text{g L}^{-1}$, $1,48 \mu\text{g L}^{-1}$), 48 Stunden unter Lichtausschluss bei 4°C gelagert, durchmischt und jeweils in zwei Anteile geteilt. Der eine Anteil wurde jeweils mittels hydrophiler Spitzenvorsatzfilter vor der eigentlichen Messung filtriert, der andere Anteil jeweils unbehandelt vermessen. In Abbildung 72 sind die Wiederfindungsraten vergleichend dargestellt:

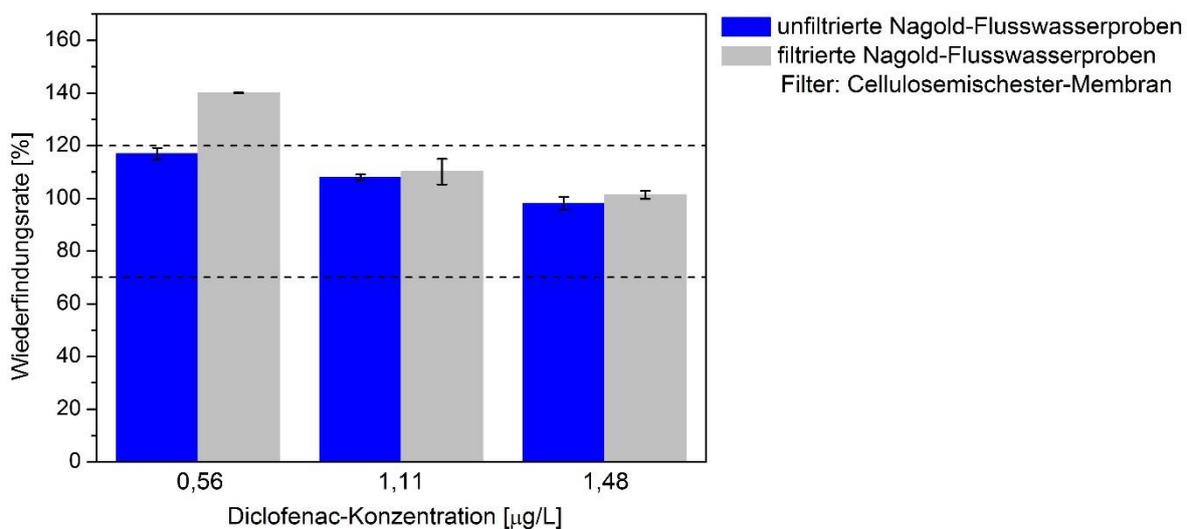


Abbildung 72: Vergleich der Wiederfindungsraten in gespiktem Nagold-Flusswasser. Die Proben wurden unfiltriert und filtriert vermessen. Der Filter beinhaltet eine Cellulosemischester-Membran.

Die Wiederfindungsraten der filtrierten und unfiltrierten Proben der Diclofenac-Konzentrationen $1,11 \mu\text{g L}^{-1}$ und $1,48 \mu\text{g L}^{-1}$ sind unter Berücksichtigung der Standardabweichungen im Rahmen der Messungenauigkeit annähernd identisch. Setzt man die Wiederfindungsraten in Relation zueinander, so entsprechen sie sich zu fast 100 % (Tabelle 44).

Ergebnisse

Tabelle 44: Wiederfindungsraten in gespiktem Nagold-Flusswasser. Die Proben wurden unfiltriert und filtriert vermessen. Die Filter beinhalteten eine Cellulosemischester-Membran. Die Wiederfindungsraten werden in Relation zueinander gesetzt. Hierzu werden die Wiederfindungsraten der unfiltrierten Proben jeweils gleich 100 % gesetzt und die Wiederfindungsraten der jeweiligen filtrierten Proben darauf bezogen.

	gespikte Konz. [µg/L]	WF [%]	SD [%]	Vergleich [%]
unfiltriert	0,56	116,9	2,2	
filtriert	0,56	140,1	0,1	119,8
unfiltriert	1,11	108,0	0,6	
filtriert	1,11	110,1	4,9	101,9
unfiltriert	1,48	98,1	2,4	
filtriert	1,48	101,3	1,5	103,2

Überraschend ist, dass die Wiederfindungsrate der filtrierten Probe der niedrigsten Diclofenac-Konzentration ($0,56 \mu\text{g L}^{-1}$) annähernd 20 % über der Wiederfindungsrate der unfiltrierten Probe liegt. Um einen Fehler bei der Probenvorbereitung auszuschließen, wurden an zwei weiteren Tagen Messungen durchgeführt. An jedem Tag wurden neue Proben angesetzt und die Probenvorbereitungsschritte entsprechend der oben beschriebenen Routine durchgeführt. Die erhaltenen Wiederfindungsraten sind in Abbildung 73 dargestellt:

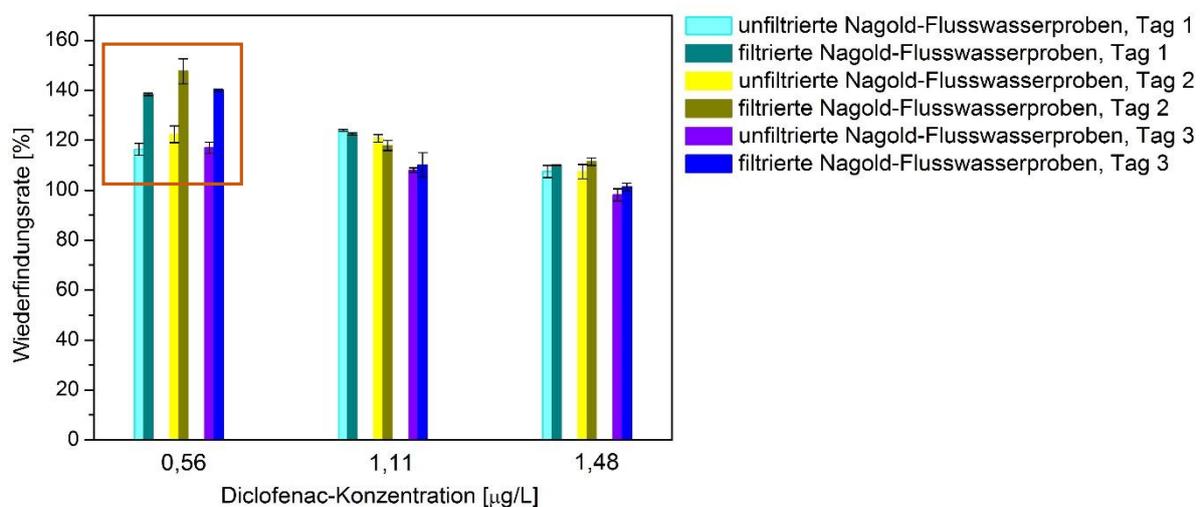


Abbildung 73: Vergleich der Wiederfindungsraten in gespiktem Nagold-Flusswasser. Die Proben wurden an drei verschiedenen Tagen angesetzt, die Probenvorbereitungsroutine durchgeführt und unfiltriert bzw. filtriert vermessen. Die Filter beinhalteten eine Cellulosemischester-Membran.

Auch bei den Wiederholungsmessungen wurde bei einer erwarteten Diclofenac-Konzentration von $0,56 \mu\text{g L}^{-1}$ ein deutlich höheres Signal in den Proben, welche mittels Cellulosemischester-Membran filtriert wurden, gemessen. Die Wiederfindungsrate lag zudem immer reproduzierbar circa 20 % über der in den unfiltrierten Proben gemessenen (Tabelle 45).

Tabelle 45: Wiederfindungsraten in gespiktem Nagold-Flusswasser. Die Proben wurden an drei Tagen angesetzt, die Probenvorbereitungsroutine durchgeführt und unfiltriert bzw. filtriert vermessen. Die Filter beinhalteten eine Cellulosemischester-Membran. Die Wiederfindungsraten werden in Relation zueinander gesetzt. Hierzu werden die Wiederfindungsraten der unfiltrierten Proben jeweils gleich 100 % gesetzt und die Wiederfindungsraten der jeweiligen filtrierten Proben darauf bezogen.

gespikte Konz. [µg/L]	Tag		WF [%]	SD [%]	Vergleich [%]
0,56	1	unfiltriert	116,4	2,4	118,9
		filtriert	138,3	0,2	
	2	unfiltriert	122,4	3,3	120,6
		filtriert	147,6	5,0	
	3	unfiltriert	116,9	2,2	119,8
		filtriert	140,1	0,1	
1,11	1	unfiltriert	124,1	0,2	98,7
		filtriert	122,4	0,5	
	2	unfiltriert	120,7	1,0	97,7
		filtriert	117,9	1,6	
	3	unfiltriert	108,0	0,6	101,9
		filtriert	110,1	4,9	
1,48	1	unfiltriert	107,5	2,4	102,3
		filtriert	109,9	0,3	
	2	unfiltriert	107,4	2,9	103,6
		filtriert	111,4	1,2	
	3	unfiltriert	98,1	2,4	103,2
		filtriert	101,3	1,5	

Eine wirkliche Erklärung für diesen Effekt konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden. Für die Diclofenac-Konzentrationen $1,11 \mu\text{g L}^{-1}$ und $1,48 \mu\text{g L}^{-1}$ ist der hier verwendete Filter jedoch sehr gut einsetzbar. Der Vergleich der Wiederfindungsraten zeigt eine sehr gut reproduzierbare Übereinstimmung.

Als Beispiel für hydrophobe Spitzenvorsatzfilter wurden Einmalfilter mit einer Polytetrafluorethylen-Membran verwendet. Als Probenmatrix diente wiederum bereits steril filtriertes Nagold-Flusswasser. Die Flusswasserproben wurden mit zwei Diclofenac-Konzentrationen versetzt ($0,56 \mu\text{g L}^{-1}$ und $1,11 \mu\text{g L}^{-1}$) und mit der oben beschriebenen Probenvorbereitungsroutine behandelt. In Abbildung 74 sind die erhaltenen Wiederfindungsraten vergleichend dargestellt:

Ergebnisse

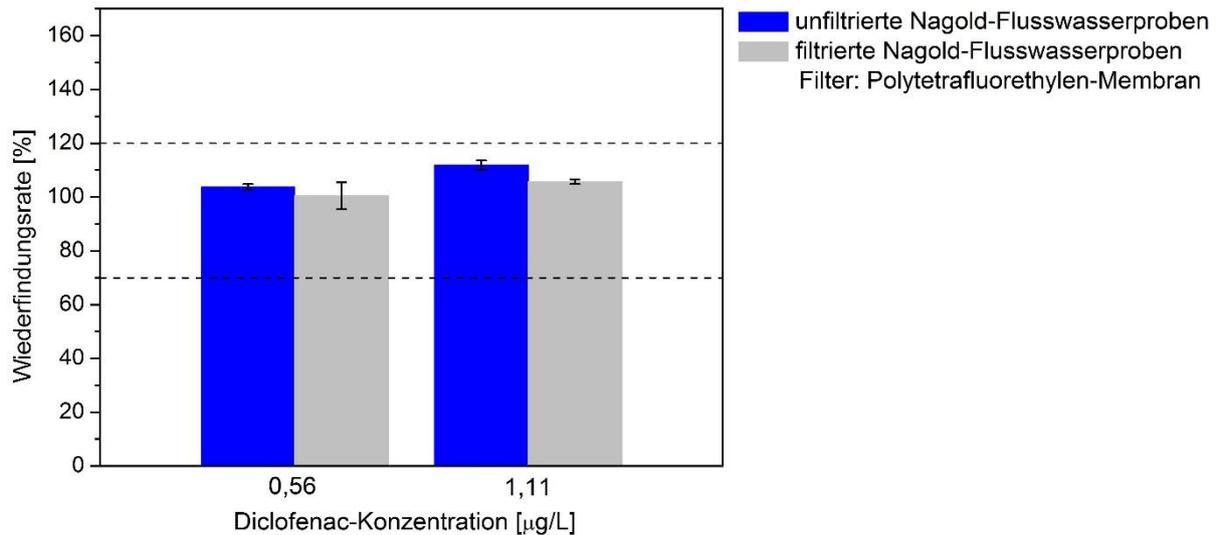


Abbildung 74: Vergleich der Wiederfindungsraten in gespiktem Nagold-Flusswasser. Ein Teil der Proben wurde vor der Messung filtriert. Die Filter beinhalteten eine Polytetrafluorethylen-Membran.

Die erhaltenen Wiederfindungsraten deuten möglicherweise auf eine geringe unspezifische Adsorption des Diclofenacs an die hydrophobe Filtermembran hin (Tabelle 46). Diese ist aber so geringfügig, dass sie ohne weiteres vernachlässigt werden kann.

Tabelle 46: Wiederfindungsraten in gespiktem Nagold-Flusswasser. Die Proben wurden unfiltriert und filtriert vermessen. Die Filter beinhalteten eine Polytetrafluorethylen-Membran. Die Wiederfindungsraten werden jeweils in Relation zueinander gesetzt. Hierzu werden die Wiederfindungsraten der unfiltrierten Proben jeweils gleich 100 % gesetzt und die Wiederfindungsraten der filtrierten Proben darauf bezogen.

	gespikte Konz. [µg/L]	WF [%]	SD [%]	Vergleich [%]
unfiltriert	0,56	103,7	1,1	
filtriert	0,56	100,4	5,0	96,8
unfiltriert	1,11	111,8	1,8	
filtriert	1,11	105,7	0,9	94,6

Der hier untersuchte Spitzenvorsatzfilter mit einer Polytetrafluorethylen-Membran ist somit sehr gut zur Flusswasserprobenvorbereitung einsetzbar.

4.5.6 Wiederfindungsraten in unfiltriertem gespiktem Flusswasser

Um den entwickelten Biosensor von etablierten Standardmethoden abzugrenzen, ist eine Vermeidung von Probenvorbereitungsschritten wünschenswert. Anhand von Nagold- und Enz-Flusswasserproben wurde untersucht, ob Messungen direkt in unfiltriertem Flusswasser nicht nur möglich, sondern auch aussagekräftig und reproduzierbar sind.

Erste Untersuchungen wurden auf Grund der sehr guten Wasserqualität in Nagold-Flusswasser durchgeführt. Nagold-Flusswasserproben wurden hierfür mit drei Diclofenac-Konzentrationen ($0,56 \mu\text{g L}^{-1}$, $1,11 \mu\text{g L}^{-1}$ und $1,48 \mu\text{g L}^{-1}$) versetzt, 48 Stunden unter Lichtausschluss an 4°C gelagert und vermessen. Die Wiederfindungsraten sind in Tabelle 47 und Abbildung 75 dargestellt:

Tabelle 47: Wiederfindungsraten in unfiltriertem gespiktem Nagold-Flusswasser, gemessen mittels RfS.

gespikte Konz. [$\mu\text{g/L}$]	detekt. Konz. [$\mu\text{g/L}$]	WF [%]	SD [%]
0,56	0,59	105,3	1,4
1,11	1,19	106,9	3,4
1,48	1,63	110,2	3,9

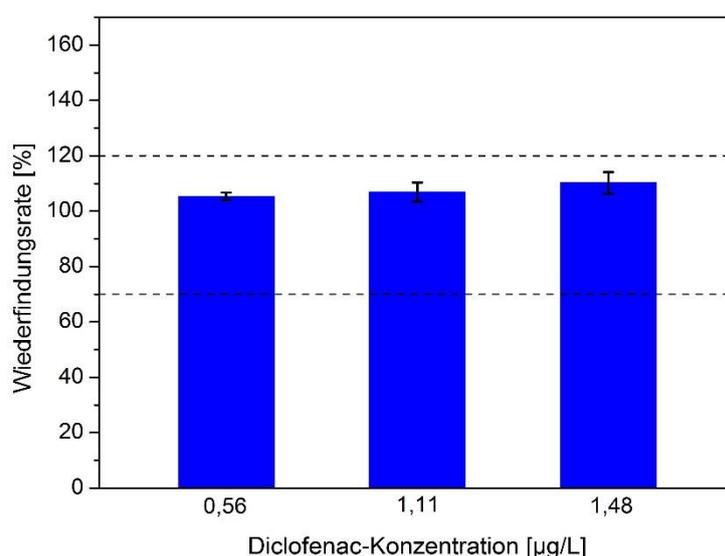


Abbildung 75: Wiederfindungsraten verschiedener Diclofenac-Konzentrationen in unfiltriertem gespiktem Nagold-Flusswasser.

Die erhaltenen Wiederfindungsraten liegen sehr gut im geforderten Bereich zwischen 70 – 120 %. Demzufolge kann auch hier zur Auswertung der Daten die Logistikkurve, welche in ultrafiltriertem entsalztem Wasser aufgenommen wurde, herangezogen werden.

Die Flusswasserprobe der Enz war im Vergleich zu der Flusswasserprobe der Nagold deutlich belasteter mit Matrixbestandteilen und enthielt auch einige sichtbare kleinere Schwebstoffe. Auch hier wurde untersucht, ob Messungen in dieser Matrix ohne jegliche Probenvorbereitung wie Verdünnung oder Filtration erfolgreich durchführbar sind. Die erhaltenen Wiederfindungsraten sind in Tabelle 48 und Abbildung 76 dargestellt:

Ergebnisse

Tabelle 48: Wiederfindungsraten in unfiltriertem gespiktem Enz-Flusswasser, gemessen mittels RIFS.

gespikte Konz. [µg/L]	detekt. Konz. [µg/L]	WF [%]	SD [%]
0,56	0,62	110,6	2,7
1,11	1,28	115,6	1,2
1,48	1,49	100,7	2,3

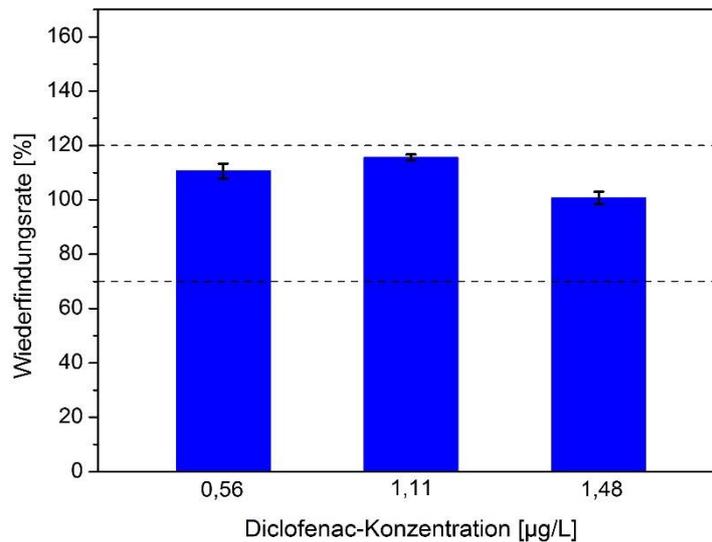


Abbildung 76: Wiederfindungsraten verschiedener Diclofenac-Konzentrationen in unfiltriertem gespiktem Enz-Flusswasser.

Auch in dieser komplexeren Matrix sind reproduzierbare quantitative Messungen erfolgreich durchführbar.

Mittels des in dieser Arbeit entwickelten Biosensors ist es somit möglich, ohne jegliche Probenvorbereitung direkt in Flusswasser Diclofenac quantitativ zu bestimmen - ein großer Vorteil gegenüber Standardmethoden wie der LC-MS oder der GC-MS. Zudem bietet dies die Möglichkeit Vor-Ort Messungen durchführen zu können – ohne Probenvorbereitung und ohne vorherige explizite Kalibrierung mit der jeweiligen Flussmatrix.

4.5.7 Untersuchungen des Elbe-Flusswassers

Im Stadtgebiet von Magdeburg wurde eine Flusswasserprobe der Elbe entnommen und auf Diclofenac untersucht. Die Steigung des Bindungssignals in der Matrix Elbe-Flusswasser ist deutlich geringer als in destilliertem entsalztem Wasser (Abbildung 77). Dieser Effekt wurde weder bei der Nagold- oder der Großen Enz- noch bei der Enz-Flusswasserprobe beobachtet.

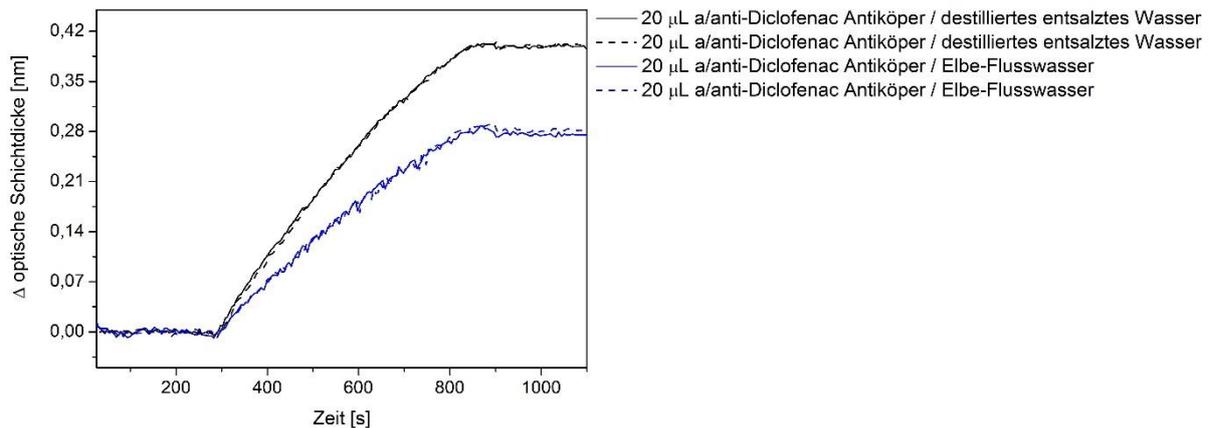


Abbildung 77: RfS-Bindungssignal von 20 μL *a*/anti-Diclofenac Antikörper-Lösung in destilliertem entsalztem Wasser (schwarze Kurven, Zweifachmessung) sowie in Elbe-Flusswasserproben (blaue Kurven, Zweifachmessung). Im Schaubild sind nur die ersten drei Phasen der aufgenommenen RfS-Messungen dargestellt.

Für das in Elbe-Flusswasser zu beobachtende geringere Bindungssignal gibt es verschiedene mögliche Erklärungen. Es wäre denkbar, dass der Antikörper in der Elbe-Flusswassermatrix während der 30 Minuten Inkubationszeit zum Teil denaturiert oder dass Matrixbestandteile unspezifisch an die Antikörper adsorbieren und somit eine spezifische Bindung des Antikörpers an die Sensoroberfläche verhindern. In beiden Fällen entspräche die gemessene nicht mehr der eingesetzten Antikörper-Konzentration, und ein geringeres Bindungssignal wäre die Folge. Wahrscheinlicher erscheint es jedoch, dass Diclofenac bereits in nachweisbarem Umfang in der Elbe-Flusswasserprobe vorhanden ist. Dafür spricht auch, dass bei Mehrfachmessungen über mehrere Tage und mit verschiedenen Transducern reproduzierbar immer der gleiche Signalunterschied im Vergleich zu destilliertem entsalztem Wasser erhalten wurde. Das erhaltene Bindungssignal in Elbe-Flusswasser würde unter Annahme des obigen Sachverhalts auf eine Diclofenac-Konzentration von $0,64 \mu\text{g L}^{-1}$ schließen lassen.

Das Elbe-Flusswasser wurde zusätzlich mit drei Diclofenac-Konzentrationen ($0,56 \mu\text{g L}^{-1}$, $1,11 \mu\text{g L}^{-1}$ und $1,48 \mu\text{g L}^{-1}$) versetzt, 48 Stunden unter Lichtausschluss bei 4°C gelagert und vermessen. Auch in diesem Fall diente zur Auswertung der Daten die Logistikkfunktion, welche bei der Kalibrierung in ultrafiltriertem entsalztem Wasser erhalten wurde. Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten wurden die eingesetzten Konzentrationen mit der augenscheinlich schon im Elbe-Flusswasser vorliegenden Diclofenac-Konzentration addiert. Die Wiederfindungsraten sind in Tabelle 49 dargestellt:

Ergebnisse

Tabelle 49: Wiederfindungsraten in filtriertem gespiktem Elbe-Flusswasser, gemessen mittels RfS. Die gespikten Konzentrationen wurden mit der augenscheinlich schon im Elbe-Flusswasser vorliegenden Diclofenac-Konzentration ($0,64 \mu\text{g L}^{-1}$) addiert.

gespikte Konz. [$\mu\text{g/L}$]	vorlieg. Konz. [$\mu\text{g/L}$]	detekt. Konz. [$\mu\text{g/L}$]	WF [%]	SD [%]
0,56	1,20	1,19	99,0	2,8
1,11	1,75	2,11	120,4	2,2
1,48	2,12	2,58	121,9	2,3

Die Wiederfindungsrate entspricht bei einer gespikten Diclofenac-Konzentration von $0,56 \mu\text{g L}^{-1}$ nahezu 100 %. Zwar liegen die Wiederfindungsraten der höher konzentrierten Proben mit 120,4 % und 121,9 % und unter Berücksichtigung der jeweiligen Standardabweichungen grob im Rahmen der geforderten 70 % - 120 %, fallen aber dennoch deutlich schlechter aus, als in den Proben der anderen untersuchten Gewässer.

Um zu überprüfen, ob Diclofenac bereits im Elbe-Flusswasser vorhanden ist, wurden vergleichende Messungen derselben Proben im Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung durchgeführt. Mittels LC-MS/MS konnte kein bereits vorhandenes Diclofenac im Elbe-Flusswasser nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis spricht nicht für Diclofenac, sondern für das Vorhandensein eines Metaboliten von Diclofenac in den Elbe-Flusswasserproben. Dieser wäre, falls das Epitop des Metaboliten mit dem Paratop des Antikörpers in Wechselwirkung treten kann, mit dem hier entwickelten Immunoassay detektierbar. Es bestünde eine Kreuzreaktivität. Dies würde auch die hohen Wiederfindungsraten bei hohen gespikten Konzentrationen erklären, da das gemessene Signal durch unterschiedliche Signaldynamiken des Diclofenacs und des Diclofenac-Metabolits zustande käme. Um zu untersuchen, ob Metabolite des Diclofenacs mit dem hier entwickelten Biosensor nachweisbar sind, wurden verschiedene Metabolite untersucht. Die Ergebnisse sind in Abschnitt 4.6 dargestellt.

4.6 Metabolite des Diclofenacs

Metabolite des Diclofenacs entstehen im Körper durch Biotransformation. Diese chemische Modifizierung findet bei Arzneistoffen meistens in der Leber statt und dient dem Zweck, lipophile in hydrophile Verbindungen zu überführen. Diese können dann über die Niere oder die Galle ausgeschieden werden. Die Biotransformation kann in mehrere Phasen untergliedert werden. Als Phase-I Reaktionen bei der Metabolisierung bezeichnet man oxidative, reduktive, eliminierende (z.B. decarboxylierende) und hydrolytische Reaktionen. Bei den Phase-II Reaktionen handelt es sich in der Regel um Konjugationsreaktionen [Steinhilber 2010]. Hierbei werden die Arzneistoffe bzw. die durch Phase-I Reaktionen modifizierten Arzneistoffe über ihre funktionellen Gruppen mit wasserlöslichen körpereigenen Molekülen konjugiert. Als funktionelle Gruppen eignen sich hierbei vor allem Amino-, Hydroxy- oder Sulfhydrylgruppen. Die Phase-I und -II der Metabolisierung von Arzneistoffen ist in Abbildung 78 schematisch zusammengefasst:

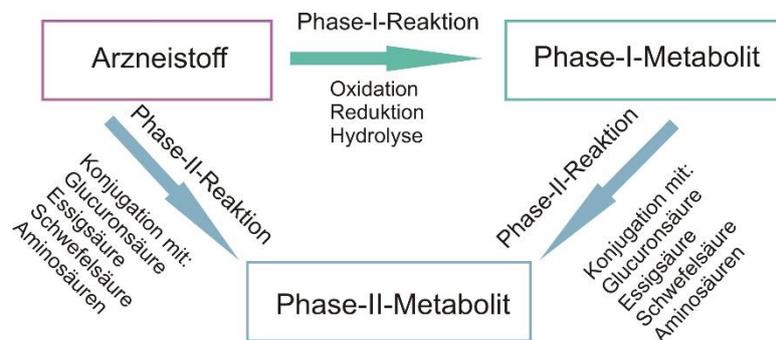


Abbildung 78: Phase-I und Phase-II der Metabolisierung von Arzneimitteln [nach Steinhilber 2010].

Diclofenac wird sehr schnell und fast vollständig metabolisiert. Als Phase-I-Reaktionen treten dabei vor allem Hydroxylierungsreaktionen auf, die durch Enzyme der Cytochrom-P450-Familie wie beispielsweise CYP2C9 bzw. CYP3A4 katalysiert werden [Steinhilber 2010]. Ca. 50 % des aufgenommenen Diclofenacs wird als 4'-Hydroxy-Diclofenac bzw. als das Glucuronid-Metabolit des 4'-Hydroxy-Diclofenacs im menschlichen Urin und der Gallenflüssigkeit ausgeschieden [Kumar 2002]. Andere Phase-I-Metabolite, die in geringen Mengen gebildet werden, sind beispielsweise 5-Hydroxy-, 4'-5-Dihydroxy- oder 3'-Hydroxy-Diclofenac [van Leeuwen 2011]. Als Phase-II-Reaktion ist vor allem die Glucuronidierung zu nennen. Dabei wird sowohl das Diclofenac selbst, als auch ein Teil der Phase-I-Metaboliten glucuronidiert. So werden beispielsweise ca. 10 - 20 % des eingenommenen Diclofenacs als Acylglucuronid aus dem menschlichen Körper ausgeschieden [Stierlin 1979]. Mit Ausnahme von 4'-Hydroxy-Diclofenac sind alle Metabolite inaktiv [Steinhilber 2010].

Innerhalb dieser Arbeit wurde die Kreuzreaktivität des Immunoassays bezüglich der Hauptmetabolite des Diclofenacs (Abbildung 79) untersucht.

Ergebnisse

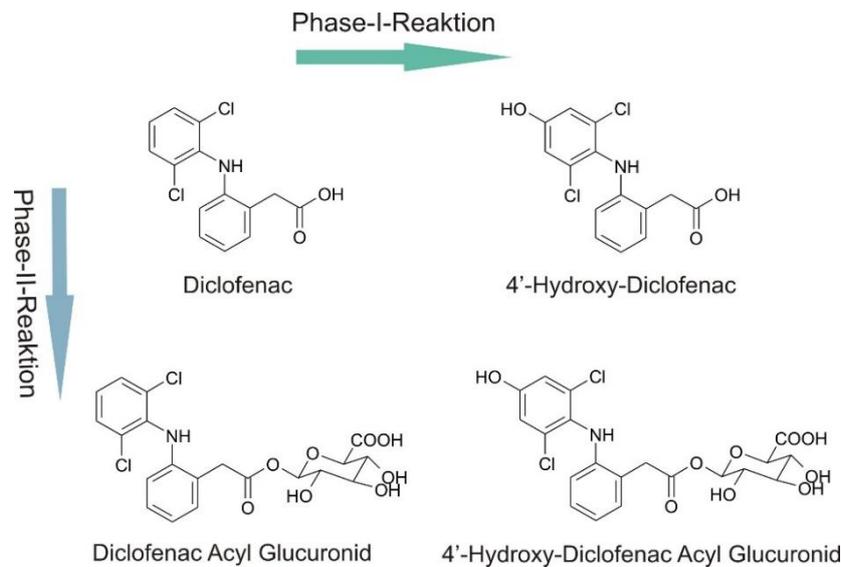


Abbildung 79: Hauptmetabolite des Diclofenacs. Die Glucuronsäure kann an die Carboxylgruppe, wie in der Abbildung gezeigt, aber auch an die Hydroxylgruppe des 4'-Hydroxy-Diclofenacs gebunden sein.

Die im Rahmen dieser Arbeit vermessenen Glucuronide des Diclofenacs wurden freundlicherweise von Roland Maul zur Verfügung gestellt. Hierfür wurde Diclofenac in-vitro mittels Rattenlebermikrosomen Phase-II-Reaktionsbedingungen ausgesetzt. In Abbildung 80 sind die erhaltenen relativen Signale, welche aus repräsentativen RfS-Bindungskurven erhalten wurden, dargestellt:

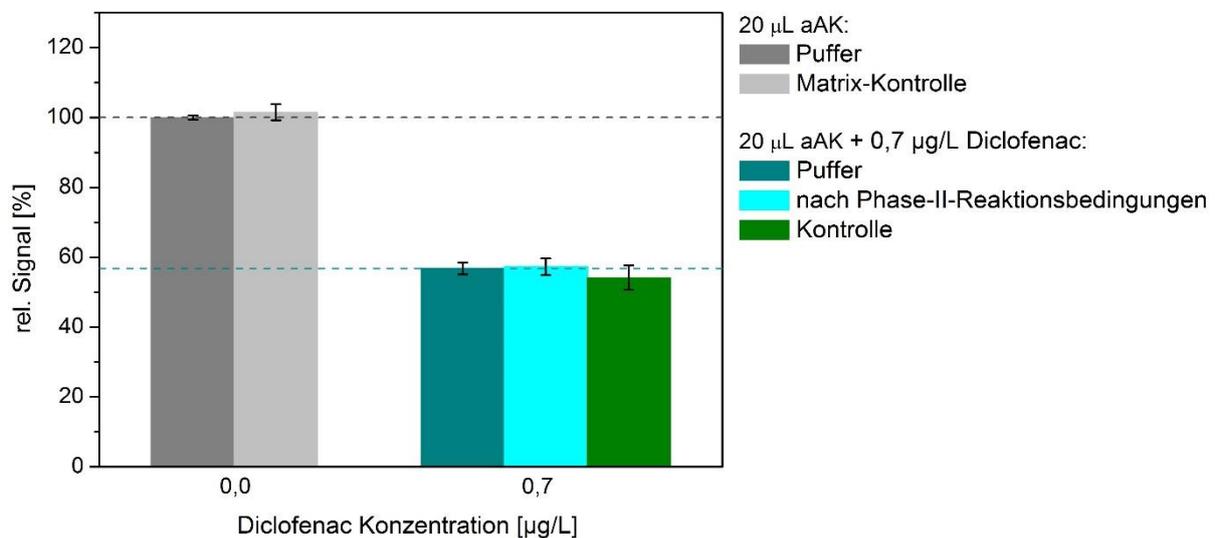


Abbildung 80: Relatives Signal [%] des Diclofenac Acylglucuronids (cyan) im Vergleich zu Messungen ohne (dunkelgrau) und mit Diclofenac (dunkel-cyan). Zudem wurden die relativen Signale der Matrix-Kontrolle (hellgrau) sowie der Kontrolle (grün) aufgetragen.

Zum Vergleich und als Referenzwerte wurden standardmäßig Messungen in Puffer ohne (dunkelgrau) und mit Diclofenac (dunkel-cyan) durchgeführt.

Um mögliche Matrixeffekte durch Matrixbestandteile der Phase-II-Reaktion oder durch die danach erfolgte Aufarbeitung auszuschließen, wurden Messungen einer sogenannten „Matrix-

Kontrolllösung“ durchgeführt. Diese Lösung wurde simultan zu der Diclofenac-Lösung Phase-II-Reaktionsbedingungen ausgesetzt und danach entsprechend aufgearbeitet. Sie enthielt aber zu keiner Zeit Diclofenac. Das erhaltene relative Signal entspricht dem der Referenzmessung ohne Diclofenac. Demzufolge sind keine Matrixeffekte beobachtbar. Die erhaltenen Bindungssignale sollten also sehr gut mit standardmäßig durchgeführten Messungen in Puffer und den daraus resultierenden Bindungssignalen vergleichbar sein.

Um die Aussagekraft und Vergleichbarkeit der Messungen zudem sicherzustellen, wurde eine weitere Kontrolle durchgeführt. Hierbei wurde eine Diclofenac-Lösung zwar Phase-II-Reaktionsbedingungen unterworfen, jedoch ohne Zusatz eines zwingend erforderlichen Coenzym. Eine Metabolisierung des Diclofenacs kann unter diesen Umständen nicht stattfinden. Bei dieser Kontroll-Lösung sollte somit kein Diclofenac metabolisiert sein. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen entspricht das relative Signal der Kontroll-Lösung trotz der intensiven Probenvorbereitung und -aufarbeitung während und nach der Phase-II Metabolisierung annähernd dem der Referenzlösung. Durch die Reaktionsdurchführung und die Aufarbeitung bedingte Probeverluste sind demzufolge minimal.

Das relative Signal der Diclofenac-Lösung, welche einer Phase-II Metabolisierung unterworfen wurde, entspricht dem der Referenz- sowie der Kontrollmessung. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das zu einem gewissen Anteil in der Lösung gebildete Diclofenac Acylglucuronid die gleiche Affinität zur verwendeten Erkennungsstruktur aufweist. Dies scheint nicht weiter verwunderlich, da das Epitop des Diclofenacs von der Metabolisierung nicht betroffen ist (Abbildung 81). Die Glucuronsäure wird über die Carboxylgruppe an das Diclofenac gekoppelt und stört die affine Bindung an den Antikörper nicht.

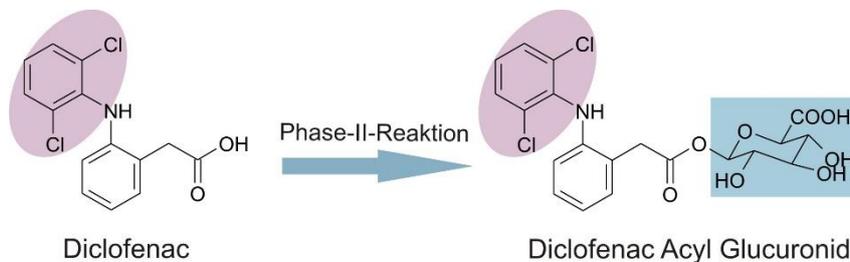


Abbildung 81: Phase-II Metabolisierung des Diclofenacs zum Diclofenac Acylglucuronid. Das Epitop wird hierbei nicht chemisch modifiziert (lila eingefärbt).

Auch der Hauptmetabolit des Diclofenacs, 4'-Hydroxy-Diclofenac, sowie das dazugehörige Glucuronid wurden untersucht. 4'-Hydroxy-Diclofenac ist kommerziell erhältlich und wurde analog der oben beschriebenen Routine zur Herstellung des entsprechenden Glucuronids herangezogen. Die erhaltenen relativen Signale der Bindungskurven sind in Abbildung 82 dargestellt:

Ergebnisse

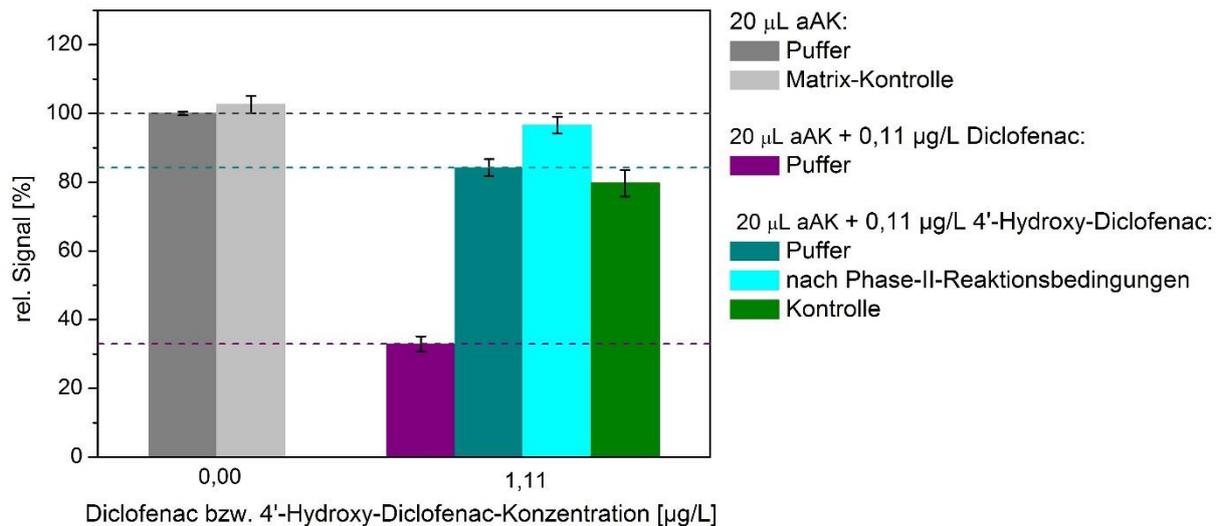


Abbildung 82: Relative Signale der Bindungskurven mit 4'-Hydroxy-Diclofenac (dunkel-cyan) und nach Phase-II Metabolisierung des 4'-Hydroxy-Diclofenacs (cyan). Zudem wurden Referenzmessungen ohne (dunkelgrau) und mit Diclofenac (lila) in Puffer aufgenommen und Messungen zur Kontrolle des Einflusses der Matrix (hellgrau) und der Ausbeuteverluste während der Probenhandhabung der Phase-II Metabolisierung (grün) durchgeführt.

Analog zu den obigen Ergebnissen (Abbildung 80) ist auch hier das relative Signal (hellgrau), welches aus den Messungen zur Kontrolle des Einflusses der Matrix erhalten wurde, im Vergleich zu den Messungen ohne Diclofenac bzw. ohne 4'-Hydroxy-Diclofenac (dunkelgrau) leicht erhöht. Dieser Effekt kann aber unter Berücksichtigung des Einflusses der Standardabweichungen vernachlässigt werden.

Im Vergleich zum relativen Signal der Diclofenac-Messung (lila) ist das der 4'-Hydroxy-Diclofenac Messung (dunkel-cyan) deutlich höher. Demzufolge werden während der Inkubationszeit im Vergleich weniger Antikörper-Paratope inhibiert, und es stehen während der eigentlichen RfS-Messung deutlich mehr Antikörper-Bindungsstellen zur spezifischen Wechselwirkung mit der Sensoroberfläche zur Verfügung. Ein höheres Bindungssignal wird erhalten. Da das Epitop des Diclofenacs durch die hier erfolgte chemische Modifizierung (Phase-I Metabolisierung) verändert wurde (Abbildung 83), war die experimentell bestätigte signifikant schlechtere affine Wechselwirkung zu erwarten.

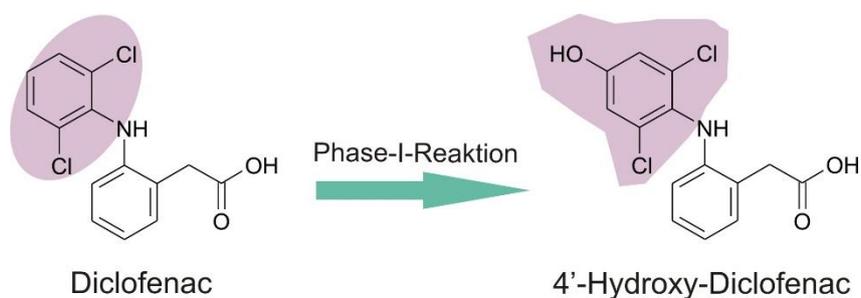


Abbildung 83: Phase-I Hauptmetabolit des Diclofenacs. Das Epitop wird bei der Phase-I Metabolisierung chemisch modifiziert (lila eingefärbt).

Vor Auswertung des relativen Signals der 4'-Hydroxy-Diclofenac-Lösung nach Phase-II-Metabolisierung muss zuerst das relative Signal der Kontroll-Messung (grün) in Augenschein genommen werden. Analog zur Kontroll-Messung bei der Diclofenac Umsetzung (Abbildung 80) ist auch hier das Signal der Kontroll-Lösung im Vergleich zur Standardpuffermessung geringfügig erniedrigt. Diese Abweichung kann vernachlässigt werden.

Das relative Signal der 4'-Hydroxy-Diclofenac-Lösung nach Phase-II Metabolisierung (cyan) ist im Vergleich zur Kontroll-Messung deutlich erhöht. Der Antikörper scheint mit den Phase-II Metaboliten des 4'-Hydroxy-Diclofenacs noch schlechter in Wechselwirkung treten zu können als mit 4'-Hydroxy-Diclofenac selbst. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Glucuronsäure vor allem durch die Hydroxylgruppe und nicht durch die Carboxylgruppe an das 4'-Hydroxy-Diclofenac gebunden wurde (Abbildung 84).

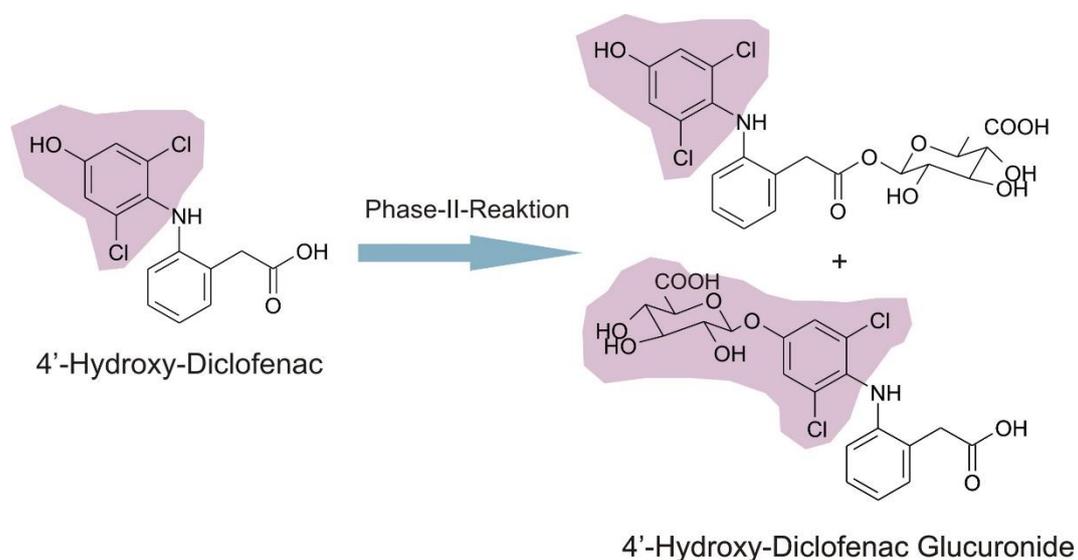


Abbildung 84: Phase-II Metabolite des 4'-Hydroxy-Diclofenacs. Das Epitop (lila eingefärbt) wird bei der Phase-II Metabolisierung zum Teil chemisch modifiziert.

Mit Hilfe des entwickelten Biosensors lassen sich demzufolge auch Metabolite des Diclofenacs detektieren. Je nach chemischer Modifizierung des Epitops werden hierbei erwartungsgemäß verschieden starke Kreuzreaktivitäten beobachtet.

Für 4'-Hydroxy-Diclofenac wurde eine Kalibrierkurve aufgenommen. Hierfür wurde der in dieser Arbeit hergestellte, klassenspezifisch aufgereinigte Antikörper verwendet. Die Kalibrierkurve sowie die zugehörige Logistikkfunktion sind in Abbildung 85 dargestellt:

Ergebnisse

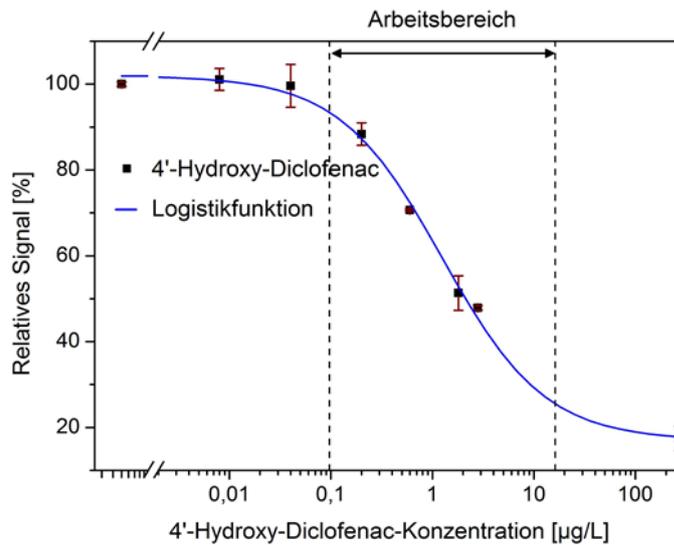


Abbildung 85: Kalibrierkurve des 4'-Hydroxy-Diclofenacs in ultrafiltriertem entsalztem Wasser.

Aufgrund der moderaten Steigung der Kalibrierkurve im Vergleich zu der, die für Diclofenac als Analyt erhalten wurde (Tabelle 50), ist der erhaltene Arbeitsbereich deutlich breiter und liegt zwischen 97 ng L^{-1} und $16,208 \text{ µg L}^{-1}$.

Tabelle 50: Kenngrößen der Diclofenac sowie der 4'-Hydroxy-Diclofenac Kalibrierung in ultrafiltriertem entsalztem Wasser. Die Kenngrößen der Diclofenac Kalibrierung wurden aus Abbildung 87 erhalten.

	Diclofenac	4'-Hydroxy-Diclofenac
A_1 (%)	$96,26 \pm 1,07$	$101,92 \pm 1,61$
A_2 (%)	$10,93 \pm 1,39$	$17,00 \pm 2,46$
x_0 (µg L^{-1})	$0,48 \pm 0,02$	$1,25 \pm 0,14$
p	$1,78 \pm 0,12$	$0,85 \pm 0,08$
LOD (ng L^{-1})	64,3	11,9
LOQ (ng L^{-1})	131,1	50,7
Arbeitsbereich (µg L^{-1})	0,138 – 1,638	0,097 – 16,208

Dank der sehr niedrigen Nachweisgrenze von $11,9 \text{ ng L}^{-1}$ und Bestimmungsgrenze von $50,7 \text{ ng L}^{-1}$ kann im unteren ng-Bereich qualitativ und quantitativ gemessen werden.

Eine Validierung der Kalibrierkurve und der verwendeten Logistikfunktion konnte erfolgreich durchgeführt werden (Abbildung 86).

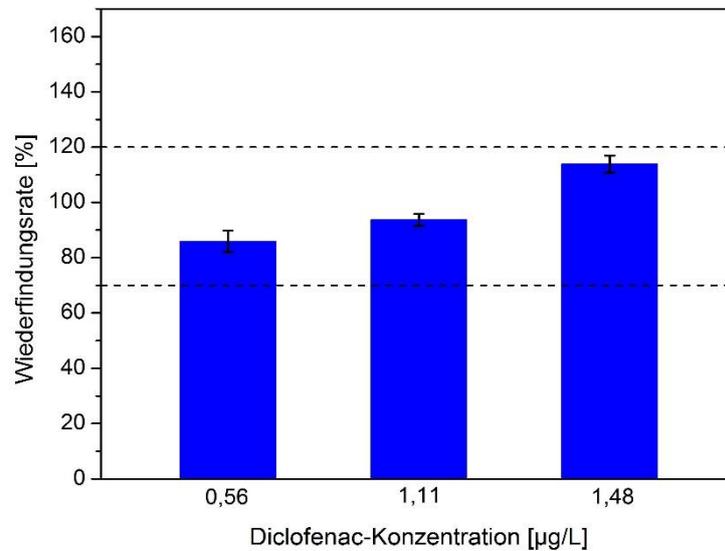


Abbildung 86: Wiederfindungsraten verschiedener 4'-Hydroxy-Diclofenac-Konzentrationen in unfiltriertem gespiktem Wasser.

Die Kreuzreaktivität des anti-Diclofenac Antikörpers bezüglich 4'-Hydroxy-Diclofenac beträgt 38 %. 4'-Hydroxy-Diclofenac als Hauptmetabolit des Diclofenacs kann folglich - ebenso wie das Glucuronid des Diclofenacs selbst - nachgewiesen werden. Vor Einsatz des Biosensors in Realmatrices mit vorliegendem Diclofenac sowie 4'-Hdyroxy-Diclofenac müsste jedoch noch abschließend untersucht werden, wie sich Mischungen beider auf die resultierenden Kalibrierfunktionen und auf erhaltene Wiederfindungsraten auswirken.

4.7 Vergleich der anti-Diclofenac Antikörper

Um den in dieser Arbeit hergestellten Antikörper mit dem kommerziell erhältlichen zu vergleichen, wurde eine Kalibrierkurve des in dieser Arbeit hergestellten Antiköpers in ultrafiltriertem entsalztem Wasser aufgenommen (Abbildung 87). Die Messroutine entsprach der in Abschnitt 4.5.1 beschriebenen.

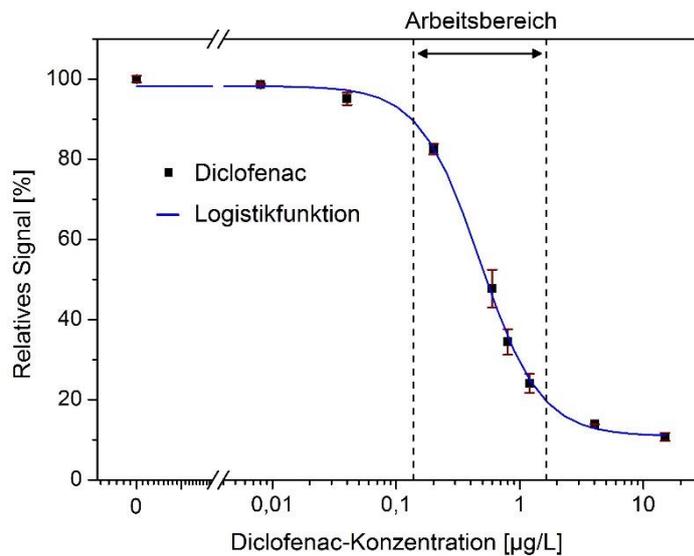


Abbildung 87: Kalibrierkurve, zugehörige Logistikkurve und Arbeitsbereich in ultrafiltriertem entsalztem Wasser. Als Erkennungsstruktur wurde der in dieser Arbeit hergestellte Antikörper verwendet.

Die Kalibrierkurve wurde durch die Aufnahme von Wiederfindungsraten validiert (Abbildung 88).

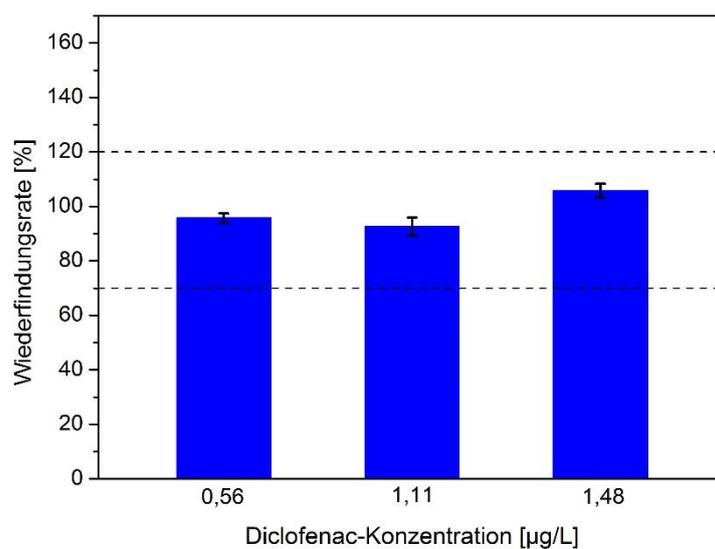


Abbildung 88: Wiederfindungsraten in ultrafiltriertem entsalztem Wasser. Als Erkennungsstruktur wurde der in dieser Arbeit hergestellte anti-Diclofenac Antikörper verwendet.

Die Kennzahlen der Kalibrierung wie die Parameter der Logistikfunktion, die Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie der Arbeitsbereich sind in Tabelle 51 im Vergleich zu den Kennzahlen der Kalibrierung mit dem kommerziell erhältlichen Antikörper (Tabelle 36, Abbildung 59) aufgeführt:

Tabelle 51: Vergleich der Kenngrößen der Diclofenac-Kalibrierung in ultrafiltriertem entsalztem Wasser. Als Erkennungsstruktur wurde in einem Fall der kommerziell erhältliche, im anderen Fall der in dieser Arbeit hergestellte Antikörper verwendet.

Antikörper	kom. erhältlich	hergestellt
A ₁ (%)	94,97 ± 1,63	98,26 ± 1,07
A ₂ (%)	5,56 ± 2,27	10,93 ± 1,39
x ₀ (µg L ⁻¹)	0,83 ± 0,04	0,48 ± 0,02
p	2,58 ± 0,36	1,78 ± 0,12
LOD (ng L ⁻¹)	218,3	64,3
LOQ (ng L ⁻¹)	452,8	131,1
Arbeitsbereich (µg L ⁻¹)	0,257 – 2,413	0,138 – 1,68

Mittels des in dieser Arbeit hergestellten anti-Diclofenac Antikörpers als Erkennungsstruktur konnten deutlich niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (64,3 ng L⁻¹, 131,1 ng L⁻¹) erhalten werden. Zudem ist der Arbeitsbereich zu kleineren Diclofenac-Konzentrationen verschoben.

Da es zunehmend erforderlich ist, möglichst niedrige Diclofenac-Konzentrationen in Realmatrices wie Fließgewässern nachzuweisen, sollte bei allen zukünftigen Messungen der in dieser Arbeit hergestellte Antikörper als Erkennungsstruktur des Biosensors verwendet werden.

4.8 Transfer des Biosensors auf Gold-Transducer

Im Rahmen des Projekts „Hybride GRIN-Resonatoren und plasmonisch strukturierte GRIN-Linsen als kompakte Sensoren zur Spektro-Mikroskopie von Einzelpartikeln“ der Baden-Württemberg Stiftung soll nanostrukturiertes Gold als Transducer-Material zum Einsatz kommen, da durch die auftretenden plasmonischen Effekte eine signifikante Steigerung der Sensitivität zu erwarten ist. Hierfür muss gewährleistet werden, dass auf Gold als Transducer-Material der Aufbau einer sensitiven Schicht durch eine geeignete Oberflächenmodifikation ohne Probleme durchführbar ist. Ebenso wie bei Glas als Transducer-Material müssen alle gewünschten Anforderungen wie Selektivität, Robustheit, Stabilität und Mehrfachverwendbarkeit berücksichtigt und erfüllt werden.

In dieser Arbeit wurde exemplarisch untersucht, ob eine auf Gold angepasste Oberflächenflächenmodifikation des Diclofenac-Immunoassays oben beschriebene Anforderungen erfüllt. Die Oberflächenmodifikation der Gold-Transducer wurde wie in Abschnitt 3.6.2 beschrieben durchgeführt. In Abbildung 89 ist der schematische Aufbau der sensitiven Schicht dargestellt:

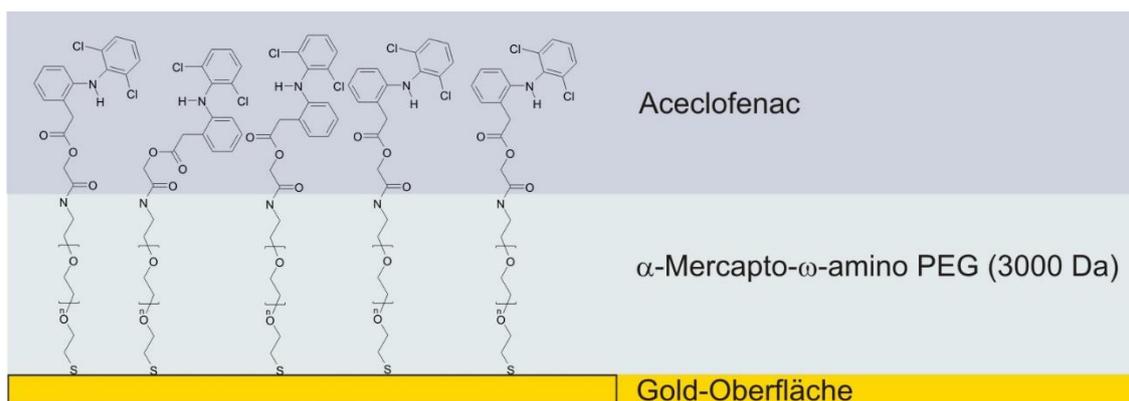


Abbildung 89: Schematischer Aufbau der sensitiven Schicht auf Gold als Transducer-Material.

4.8.1 Kontrolle des Schichtaufbaus

Zur Kontrolle des Aufbaus der sensitiven Schicht nach jedem Modifizierungsschritt sowie zur Charakterisierung der einzelnen Schichten wurde deren Benetzbarkeit mit Wasser durch Kontaktwinkelmessungen untersucht. Die erhaltenen Werte sind in Abbildung 90 für zwei Transducer exemplarisch dargestellt:

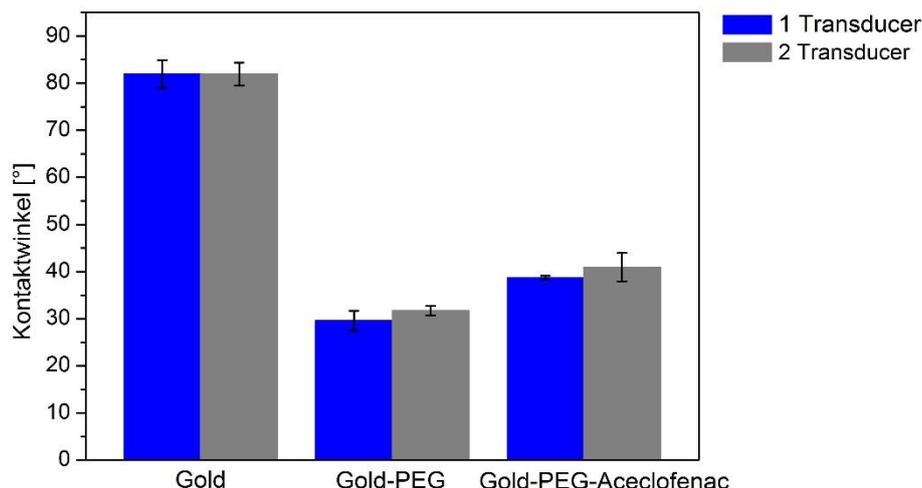


Abbildung 90: Benetzbarkeit der Gold-Transducer mit Wasser nach Modifizierung mit Thiol-PEG sowie Thiol-PEG und Aceclofenac. Da die Oberflächenbeschichtung sehr homogen ist, wurden die erhaltenen Kontaktwinkel-Werte nicht noch in rechte und linke Winkel differenziert.

Die erhaltenen Kontaktwinkel nach jedem Modifizierungsschritt sprechen für eine erfolgreiche Immobilisierung sowohl von Thiol-PEG als auch von Aceclofenac. Nach Immobilisierung von Thiol-PEG ändert sich der Kontaktwinkel von $81,9^\circ \pm 5,1^\circ$ auf $30,5^\circ \pm 4,2^\circ$. Dies entspricht dem Literaturwert für Poly(ethylenglycol), welches eine Aminogruppe auf der nicht immobilisierten Seite aufweist, wie es auch hier der Fall ist [Piehler 2000, Schweizer 2012]. Nach Immobilisierung von Aceclofenac ist der Kontaktwinkel leicht erhöht und liegt bei $39,7^\circ \pm 3,1^\circ$.

Die erhaltenen Werte für die Benetzbarkeit der einzelnen Schichten mit Wasser konnten sehr reproduzierbar auf mehreren Transducern erhalten werden und auch Messungen, welche mittels spektraler Ellipsometrie nach den einzelnen Oberflächenmodifikationsschritten durchgeführt wurden (Daten nicht gezeigt), sprechen für eine reproduzierbare Oberflächenmodifikation trotz komplexer Durchführung auf Grund von Inertgas-Bedingungen.

4.8.2 Kontrolle der Funktionalität und Stabilität der sensitiven Schicht

Um die Funktionalität und die Stabilität der sensitiven Schicht zu überprüfen, wurden Messungen mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie durchgeführt. Da eine spektrale Auswertung nicht möglich war, wurde die Intensitätsänderung einer einzelnen Wellenlänge während der Messung verfolgt [Piehler 1997, Markovic 2008]. Zwar sind generell in der Änderung der Reflektivität jeder Wellenlänge Informationen über die Änderung der optischen Schichtdicke der sensitiven Schicht enthalten, dennoch ist nicht jede Wellenlänge zur Auswertung geeignet. Unabdingbar zur quantitativen Auswertung ist ein linearer Zusammenhang zwischen der optischen Schichtdicke und der Reflektivität im relevanten Messbereich. Darüber hinaus ist eine hohe Signalintensität und ein geringes Rauschen sowie eine möglichst große Änderung des Signals vorteilhaft. In Abbildung 91 sind die bei einer RIFS-

Ergebnisse

Messung erhaltenen relativen Interferenzspektren dargestellt. Diese wurden auf das erste Spektrum normiert, um die relative Änderung der Interferenzspektren während der RfS-Messung zu verdeutlichen.

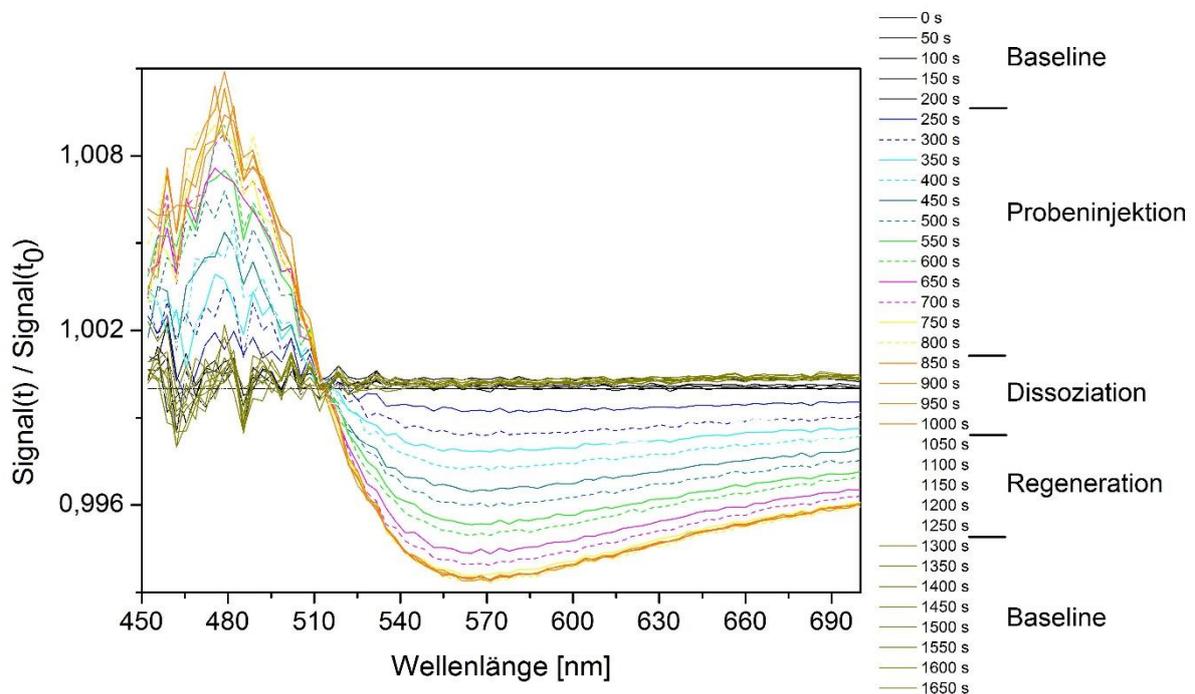


Abbildung 91: Während einer RfS-Messung erhaltene Interferenzspektren, normiert auf das erste Spektrum. Zur besseren Differenzierung wurden die Spektren analog der Phasen einer RfS-Messung mit einem Farbcode versehen. Die Interferenzspektren, welche während der ersten Phase aufgenommen wurden, sind in schwarz, die der dritten Phase in orange und die der fünften Phase in dunkelgelb dargestellt. Die Interferenzspektren der vierten Phase, der Regeneration, sind weiß und deshalb nicht im Schaubild zu sehen. Die Interferenzspektren, welche während der zweiten Phase (der Probeninjektion) erhalten wurden, sind durch einem Farbverlauf markiert um die Änderung des Messsignals zu verdeutlichen.

Das starke Rauschen bis zu einer Wellenlänge von 530 nm ist durch die sehr geringe Signalintensität auf Grund des Lampenspektrums bedingt. Zusätzlich verstärkt wurde dieser Effekt durch eine Reduzierung der angelegten Lampenspannung. Dies war auf Grund der sehr hohen Reflektivität der Goldschicht von Nöten.

Wertet man nun die RfS-Messung anhand der Steigung des Signals während eines bestimmten Bereichs der Probeninjektion bei verschiedenen Wellenlängen aus, so erhält man das in Abbildung 92 dargestellte Ergebnis:

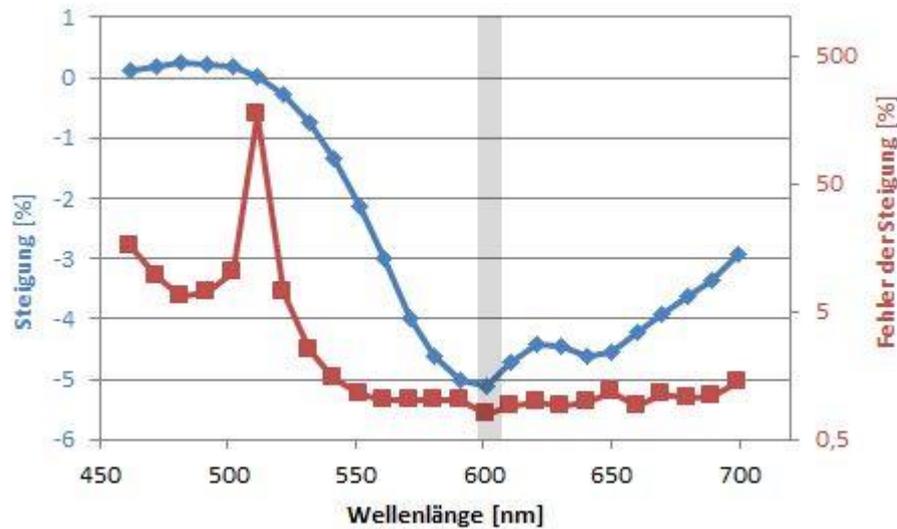


Abbildung 92: Steigung des Bindungssignals während eines definierten Bereichs der Probeninjektion, ausgewertet für verschiedene Wellenlängen. Zudem ist der erhaltene Fehler der Steigung aufgetragen.

Obwohl eine sehr große Änderung des Signals bei einer Wellenlänge von 480 nm zu beobachten ist (Abbildung 91), eignet sich diese nicht zur Auswertung. Aufgrund der sehr geringen Signalintensität und des daraus resultierenden starken Rauschens sind die Fehler bei der Auswertung des Bindungssignals exorbitant hoch (Abbildung 92).

Zur Auswertung der RIfS-Messungen wurde die Wellenlänge 610 nm herangezogen. Die Steigung während des Bindungsvorgangs ist maximal und der Fehler der Steigung minimal, zudem ist eine hohe Signalintensität vorhanden.

Um zu überprüfen, ob bei einer Wellenlänge ein linearer Zusammenhang zwischen Reflektivität und optischer Schichtdicke im erforderlichen Bereich ihrer Änderungen gegeben ist, werden Simulationsrechnungen durchgeführt [Markovic 2008]. Diese lieferten in diesem Fall jedoch keine plausiblen Ergebnisse. Bereits die Simulation der Änderung der Reflektivität entsprach nicht den experimentellen Ergebnissen. Es ist zu vermuten, dass die für die Simulationsrechnung eingesetzten Parameter nicht für Goldschichten mit Dicken im unteren Nanometer-Bereich verwendet werden können.

Der lineare Zusammenhang zwischen Reflektivität und optischer Schichtdicke bei der gewählten Wellenlänge von 610 nm wurde aus diesem Grund durch Messungen verschiedener Antikörper-Konzentrationen (Abbildung 94) bestätigt. Zur Auswertung der RIfS-Messungen ist die Wellenlänge 610 nm folglich sehr gut verwendbar.

Die Oberfläche ist unter den gewählten Assaybedingungen stabil und regenerierbar. Es sind sehr gut reproduzierbare Messungen auf einem Transducer durchführbar (Abbildung 93).

Ergebnisse

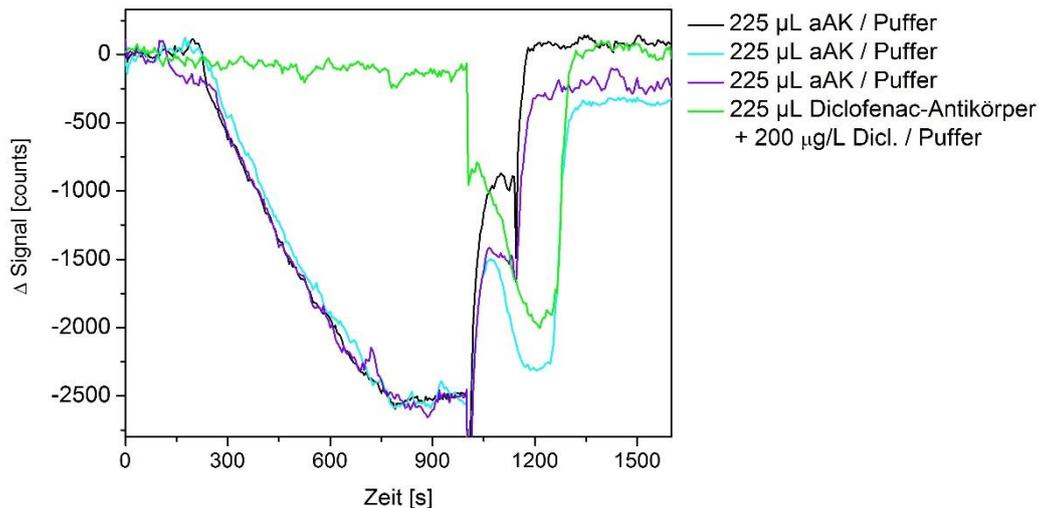


Abbildung 93: Dreifachmessung auf einem Gold-Transducer. Zur Auswertung wurde die Wellenlänge 610 nm herangezogen. Der zudem durchgeführte Bindungsinhibitionstest ist in grün dargestellt.

Die Spezifität des Bindungssignals wurde mittels eines Bindungsinhibitionstest bewiesen. Um zu untersuchen, ob konzentrationsabhängige Messungen möglich und bei der Wellenlänge 610 nm sinnvoll auswertbar sind, wurden verschiedene anti-Diclofenac Antikörper Konzentrationen vermessen und die Steigung des Bindungssignals während eines definierten Bereichs der Probeninjektionsphase ausgewertet (Abbildung 94):

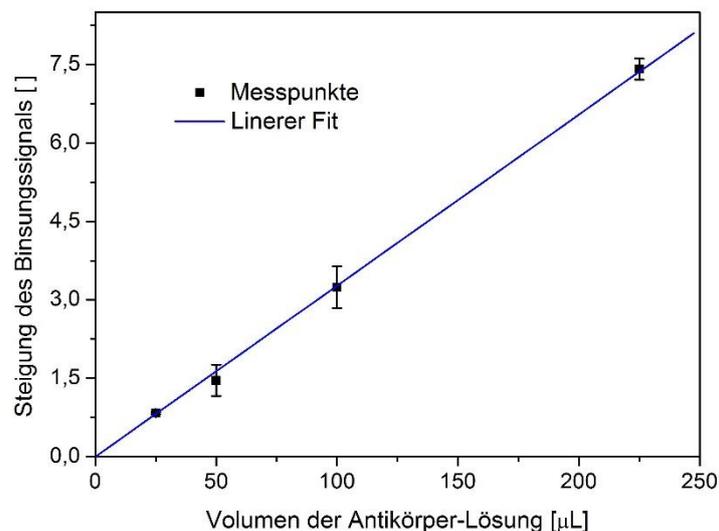


Abbildung 94: Zusammenhang zwischen der eingesetzten anti-Diclofenac Antikörper Konzentration, hier in Volumen angegeben, und der Steigung des Bindungssignals während eines definierten Bereichs der Probeninjektionsphase.

Es konnte ein linearer Zusammenhang erhalten werden. Konzentrationsabhängige Messungen können bei Auswertung der Wellenlänge 610 nm ohne Probleme durchgeführt werden.

Es konnte somit bewiesen werden, dass die auf Gold immobilisierte sensitive Schicht alle gewünschten Anforderungen wie Selektivität, Robustheit, Stabilität und Mehrfachverwendbarkeit sehr gut erfüllt. Diese Ergebnisse sollten auf nanostrukturiertes Gold übertragbar sein.

Ergebnisse

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Nachweis und der Quantifizierung von Diclofenac in relevanten Matrices.

Diclofenac, ein nichtsteroidales Antirheumatikum, wird auf Grund seiner häufigen Anwendung in der Human- und Veterinärmedizin zunehmend in der Umwelt oder in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs gefunden. Zu Monitoring-Zwecken sowie zur Kontrolle der Einhaltung rechtlicher Vorgaben bezüglich erlaubter Konzentrationen, wie beispielsweise in der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie oder der Verordnung (EU) Nr. 37/2010 festgelegt, bedarf es effizienter analytischer Methoden. Im Idealfall sollten diese selektive und sensitive Vor-Ort Messungen kostengünstig ermöglichen. Eine Anwendbarkeit in verschiedenen komplexen Matrices wäre zudem von großen Vorteil.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein optischer Biosensor zu diesem Zweck entwickelt, optimiert und etabliert. Als Nachweismethode diente hierbei die markierungsfreie zeitaufgelöste Reflektometrische Interferenzspektroskopie.

Als Realmatrices wurden Kuhmilch und Flusswasser verwendet. Im Fokus dieser Arbeit standen neben der Identifizierung, Reduzierung und Vermeidung von Matrixeffekten vor allem das Erreichen möglichst geringer Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, um im Bereich relevanter Diclofenac-Konzentrationen eine echte Alternative zu bisherigen Standardmethoden zu bieten. Des Weiteren sollte durch eine Vermeidung jeglicher Probenvorbereitungsschritte eine Abgrenzung zu Standardmethoden geschaffen und eine Entwicklung zu einer Vor-Ort-Messmethode ermöglicht werden.

Zum Nachweis des Diclofenacs wurde als Erkennungsstruktur polyklonaler anti-Diclofenac Antikörper verwendet. Da die Erkennungsstruktur das Schlüsselreagenz jedes Immunoassays bezüglich Selektivität und Sensitivität darstellt, wurde ein polyklonaler anti-Diclofenac Antikörper selbst hergestellt (Abschnitt 4.1). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des selbst hergestellten Antikörpers zu einer deutlich höheren Sensitivität und niedrigeren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen führte (Abschnitt 4.7).

Polyklonale Antikörper sind heterogen. Demzufolge unterscheiden sich verschiedene Antikörperchargen ein und desselben Tieres. Durch die Herstellung eines eigenen Antikörpers und der damit verbundenen Verwendung einer einzigen Charge kann eine Einheitlichkeit der Antikörper-Lösungen sichergestellt werden. Dies ist auf lange Sicht kosten- und zeitsparend, da auf eine stetige Neukalibrierungen des Sensors verzichtet werden kann. Zudem können auch komplexere Aufreinigungen des Antikörpers, welche größere Mengen des Serums bedürfen, durchgeführt werden. Vor allem im Hinblick auf einen möglichen zukünftigen Transfer des Immunoassays auf nicht markierungsfreie Methoden wie der Totalen Internen Reflexionsfluoreszenz ist dies entscheidend. Diese benötigt den Antikörper zwar hochrein und ist zudem arbeits- und kostenintensiver, liegt aber gleichzeitig mit ihrer Nachweisgrenze 1-2 Größenordnungen unter der markierungsfreier Methoden. In Zeiten, in denen ein hochsensitiver

Zusammenfassung und Ausblick

Nachweis von Schadstoffen in der Umwelt und in Lebensmitteln immer wichtiger wird, stellt dies einen großen Vorteil dar.

Diclofenac, ein Hapten, ist nicht in der Lage, eine Immunantwort auszulösen. Es muss an ein Trägerprotein gekoppelt werden (Abschnitt 4.1.1). Als Trägerprotein wurde Rinderserumalbumin verwendet. Dieses ist im Vergleich zu anderen Trägerproteinen nicht so denaturierungsanfällig, gut wasserlöslich und bietet zudem einige wirtschaftliche Vorteile. Als Kopplungsmethode wurde die Methode der gemischten Anhydride verwendet. Durch Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen wurde ein großes Hapten/Trägerprotein-Verhältnis erreicht und mittels MALDI/TOF-MS Analyse bestätigt. Neben Diclofenac wurde zudem Aceclofenac an BSA gekoppelt. Aceclofenac ist der Glukolsäureester des Diclofenacs und beinhaltet somit einen kleinen zusätzlichen Linker, der sterische Hinderungen des Trägerproteins während der Immunantwort verhindern und somit das Hapten besser zugänglich machen soll. Als Immunogen wurde eine 1:1 Mischung der Diclofenac- bzw. Aceclofenac-BSA-Konjugate verwendet und zwei Kaninchen injiziert.

Zur Kontrolle der Antikörperbildung (Abschnitt 4.1.2) wurde den Kaninchen in regelmäßigen zeitlichen Abständen Blut entnommen und das Serum auf das Vorhandensein von anti-Diclofenac Antikörpern untersucht. Als Assayformat wurde hierbei ein indirekter ELISA verwendet. Sowohl Diclofenac bzw. Aceclofenac selbst als auch Protein- oder Peptid-Diclofenac/Aceclofenac-Konjugate würden prinzipiell als Coatingmaterial der verwendeten ELISA-Wells (MaxiSorpTM-Oberflächen) in Frage kommen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Diclofenac bzw. Aceclofenac als Coatingmaterial nicht geeignet ist. Es ist anzunehmen, dass hierbei zwei Effekte eine Rolle spielen. Zum einen ist auf Grund der ungerichteten Physisorption das Epitop des Antigens mit großer Wahrscheinlichkeit nicht mehr frei zugänglich. Zum anderen bedingt die geringe Größe des Antigens einen zu kleinen Abstand des Antigens und des Antikörpers von der Oberfläche. Es können keine Antigen-Antikörper Wechselwirkungen ausgebildet werden. Peptid-Antigen-Konjugate haben sich im Rahmen dieser Arbeit als ideale Coatingmaterialien herausgestellt. Durch Festphasenpeptidsynthese sind sie nicht nur einfach zu synthetisieren, sondern auch in ihrer Größe und ihren chemischen Eigenschaften durch Wahl einer geeigneten Aminosäuresequenz steuerbar. Ihre Aufreinigung und Synthesekontrolle erfolgte über RP-HPLC sowie MALDI-TOF MS Analyse (Abschnitt 4.1.2.1). Neben Aminosäuresequenzen von 2-3 Aminosäuren mit geladenen, insbesondere mit negativ geladenen Seitenketten war besonders ein Aminosäure-Poly(ethylenglycol)-Antigen-Konjugat als Coatingsubstanz geeignet. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Poly(ethylenglycol) als Bestandteil des Konjugats unspezifische Wechselwirkungen von Assay- und Matrixbestandteilen vollständig zu verhindern vermag.

Nur eines der beiden Kaninchen zeigte eine Immunantwort auf Diclofenac (Abschnitt 4.1.2.2). 150 Tage nach Immunisierung konnte anti-Diclofenac Antikörper im ELISA nachgewiesen werden. Nach einem weiteren Boost wurde das Tier 210 Tage nach der ersten Immunogen Injektion ausgeblutet.

Diclofenac wurde im Rahmen dieser Arbeit in verschiedenen komplexen Realmatrices nachgewiesen und quantifiziert. Diese Realmatrices bestehen aus einer Vielzahl von Inhaltsstoffen bzw. Bestandteilen, welche potentiell Matrixeffekte verursachen können. Um eine Überlagerung dieser Matrixeffekte mit Matrixeffekten der Matrices der Immunoassay-Bestandteile wie des Antikörper-Antiserums zu verhindern, muss der Antikörper aufgereinigt werden (Abschnitt 4.2). Es gibt verschiedene Aufreinigungsmethoden, die unterschiedlich selektiv, effektiv und schnell sind und sich zudem unterschiedliche Eigenschaften des Antikörpers für die Aufreinigung zunutze machen. Als eine Art „Klassen“-spezifische Aufreinigung bietet sich die untersuchte Melon Gel IgG Spin Aufreinigung an. Im Gegensatz zu herkömmlichen Methoden wie der Protein-A Säule adsorbieren hierbei nicht die Immunglobuline G an der Festphase, sondern andere Serumproteine. Die Immunglobuline müssen folglich nicht potentiell denaturierenden Elutionsbedingungen ausgesetzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Aufreinigung sehr gut geeignet ist, störende Matrixbestandteile abzutrennen und Matrixeffekt-freie Messungen zu ermöglichen (Abschnitt 4.2.1). Für die Detektionsmethode RfS ist diese Aufreinigung völlig ausreichend, auch wenn die anti-Diclofenac Antikörper nicht von anderen Immunglobulinen der Klasse G abgetrennt werden. Für Nachweismethoden, bei denen der spezifische Antikörper einer Markierung bedarf, wäre diese Aufreinigungsmethode nicht geeignet. Hier müsste der Antikörper hochrein vorliegen, wie es nach einer Affinitätschromatographie der Fall ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb auch eine Affinitätschromatographie zur hochreinen Aufreinigung von anti-Diclofenac Antikörper entwickelt und optimiert (Abschnitt 4.2.2).

Sowohl Diclofenac- β Ala-SEDK als auch Diclofenac-PEG(9)-K wurden erfolgreich als Erkennungsstruktur an CNBr-aktivierte Sepharose immobilisiert (Abschnitt 4.2.2.1). Wie bereits beim indirekten ELISA gilt auch hier, dass Poly(ethylenglycol) als Bestandteil des Konjugats unspezifische Wechselwirkungen von Matrixbestandteilen reduziert. Das PEG enthaltende Konjugat wäre somit am geeignetsten. Leider ist das geschützte PEG(9) sehr kostenintensiv und die Ausbeute des K-PEG(9)-Diclofenac Konjugats gering. Zudem zeigte sich, dass es nur schwer in Kopplungspuffer löslich war. Aus diesem Grund wurde zusätzlich Diclofenac- β Ala-SEDK als Erkennungsstruktur verwendet. Dieses ist einfach und kostengünstig herstellbar und ist lang genug, um eine Antigen-Antikörper Wechselwirkung zu ermöglichen. Unspezifische Wechselwirkungen werden jedoch nicht so effektiv reduziert wie bei K-PEG(9)-Diclofenac.

Der kritischste Schritt einer Affinitätsaufreinigung ist die Elution des spezifischen Antikörpers von der Affinitätssäule. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Elutionsmittel auf ihre Eignung untersucht (Abschnitt 4.2.2.2). Weder explizit saure oder alkalische Bedingungen noch Änderungen der Ionenstärke brachten den gewünschten Erfolg. Entweder waren sie nicht fähig, die Antigen-Antikörper Wechselwirkung zu lösen, oder denaturierten den Antikörper während der Elution. Auch die Anwendung verschiedener chaotroper Reagenzien als Elutionsmittel brachte nicht das gewünschte Ergebnis. Erst eine Mischung aus Propionsäure und Acetonitril in geringen Volumenkonzentrationen konnte quantitativ funktionalen Antikörper von der Säule eluieren. Bei allen Affinitätsaufreinigungen wurde die Funktionalität

Zusammenfassung und Ausblick

der eluierten anti-Diclofenac Antikörpers mittels indirektem ELISA bestimmt. Der Proteingehalt der eluierten Lösung wurde mittels UV-VIS Spektroskopie, die Reinheit mittels SDS-PAGE, In-Gel-Verdau und MALDI TOF MS Analyse untersucht (Abschnitt 4.2.2.3). Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, hochreinen anti-Diclofenac Antikörper zu erhalten. Jedoch ist die Affinitätschromatographie zeitaufwendiger als eine Klassen-spezifische Aufreinigung und sollte nur, wenn wirklich nötig, durchgeführt werden.

Der Immunoassay wurde in Puffer entwickelt, optimiert und etabliert (Abschnitt 4.3). Hierbei wurden Assayformat, Oberflächenmodifikation und Assayparameter so gewählt, dass eine hohe Sensitivität, Selektivität, Stabilität und Reproduzierbarkeit des Biosensors gewährleistet werden konnte (Abschnitt 4.3.1). Als Assayformat bot der Bindungsinhibitionstest, durch eine während des Bindungsvorgangs stattfindende große Änderung der optischen Schichtdicke, optimale Signal zu Rausch Verhältnisse und ermöglichte zudem durch die Immobilisierung eines kleinen organischen Moleküls als Erkennungsstruktur auf der modifizierten Glasoberfläche eine stabile regenerierbare Sensoroberfläche. Durch die Wahl eines geeigneten Regenerationsmittels, welches die Sensoroberfläche nicht beschädigt, konnten sehr gut Intra-Chip Reproduzierbarkeiten erhalten werden (Abschnitt 4.3.2, 4.3.3). Der Biosensor wurde in Puffer kalibriert und anhand von Wiederfindungsraten validiert. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen lagen im unteren bis mittleren ng L^{-1} Bereich ($\text{LOD} = 284,2 \text{ ng L}^{-1}$, $\text{LOQ} = 493,3 \text{ ng L}^{-1}$; Abschnitt 4.3.4). Des Weiteren konnten sehr gute Inter-Chip-Reproduzierbarkeiten, eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Antikörper-Aufreinigung sowie der Assaybedingungen demonstriert werden.

Kuhmilch ist auf Grund seiner Vielzahl an Inhaltsstoffen eine sehr komplexe Matrix. Da die Reflektometrische Interferenzspektroskopie eine markierungsfreie Detektionsmethode darstellt und zudem möglichst niedrige Analyt-Konzentrationen nachgewiesen werden sollen, spielen Matrixeffekte eine bedeutende Rolle. Um den entwickelten Biosensor von Standardmethoden abzugrenzen und Vor-Ort Messungen zu ermöglichen, sollen aber keine Probenvorbereitungsschritte zur Vermeidung von Matrixeffekte durchgeführt werden. Stattdessen soll durch einen optimierten Immunoassay und durch eine effiziente Mess- und Auswertestrategie eine Reduzierung und Vermeidung von Matrixeffekten gewährleistet werden.

Die in Abschnitt 4.4 dargestellten Ergebnisse zeigen auf, dass dies in dem hier entwickelten Biosensor vollständig zum Erfolg führte.

Vor einer Vermeidung und Reduzierung von Matrixeffekten steht eine Identifizierung eben dieser. Um Matrix-spezifische Matrixeffekte von Assay-spezifischen Matrixeffekten zu differenzieren, wurden erste Messungen in pasteurisierter Vollmilch (3,5 % Fett) unter Zuhilfenahme des Modellsystems Testosteron/anti-Testosteron Antikörper durchgeführt (Abschnitt 4.4.1). Als Matrix-spezifische Matrixeffekte wurden die Tyndall-Streuung sowie eine Matrix-bedingte Änderung des Brechungsindex identifiziert. Diese überlagern das spezifische Bindungssignal während der Probeninjektionsphase und machen eine Auswertung in diesem Messbereich unmöglich. Durch Optimierung der Auswertestrategie konnten diese

Matrixeffekte vollständig umgangen werden. Dies wurde durch eine sehr gute Kalibrierung sowie niedrige Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von Testosteron in der Matrix Kuhmilch bestätigt.

Potentielle Assay-spezifische Matrixeffekte sind unspezifische Wechselwirkungen der Matrixbestandteile mit Sensoroberfläche, Antigen oder Antikörper. Dank einer optimierten Oberflächenmodifikation wurde nur eine vernachlässigbar kleine unspezifische Wechselwirkung der Matrixbestandteile mit der Sensoroberfläche beobachtet (Abschnitt 4.4.2). Eine Wechselwirkung der Matrixbestandteile mit Antigen oder Antikörper konnte durch das Erreichen sehr guter Wiederfindungsraten ausgeschlossen werden. Die tatsächlich eingesetzten Konzentrationen entsprachen den experimentell gefundenen Konzentrationen. Dies ist ein großer Vorteil gegenüber Standardmethoden, bei welchen oftmals von einer großen Wechselwirkung zwischen Matrixproteinen und –fetten und NSAIDs gesprochen wird.

Dank optimierter Assaybedingungen sowie einer effizienten Mess- und Auswertestrategie wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass eine Reduzierung und Vermeidung von Matrixeffekten ohne Zuhilfenahme von Probevorbereitungsschritten möglich ist. Es konnte direkt in Kuhmilch gemessen werden.

Der Biosensor wurde in Kuhmilch kalibriert und validiert (Abschnitt 4.4.3). Die veränderten physiko-chemischen Eigenschaften der Probenmatrix machten sich in einer veränderten Signaldynamik im Vergleich zu Puffer als Probenmatrix bemerkbar. Eine deutlich geringere Steigung der Kalibrierkurve und folglich ein signifikant größerer Arbeitsbereich wurden erhalten. Die erreichte Nachweisgrenze von $112,7 \text{ ng L}^{-1}$ ist vergleichbar oder besser als die publizierter Standardmethoden und liegt im Bereich der erlaubten Rückstandshöchstmenge von Diclofenac in Kuhmilch. Der entwickelte Biosensor ist somit zum Nachweis von relevanten Diclofenac-Konzentrationen in Kuhmilch sehr gut geeignet und ist damit auch der erste publizierte einsetzbare optische Biosensor für diese Aufgabenstellung.

Flusswasser (Abschnitt 4.5) bietet dem Antikörper während der Inkubationsphase und der Messung keine physiologischen Bedingungen. Zudem befindet sich unter anderem eine Vielzahl gelöster und partikulär gebundener Substanzen in dieser Matrix. Um die Messroutine bezüglich physiologischer Bedingungen anzupassen, aber zugleich von Matrixeffekten unabhängig zu sein, wurden erste Messungen in ultrafiltriertem entsalztem Wasser durchgeführt. Die Kenngrößen der Kalibrierung entsprechen den in Puffer erhaltenen und belegen die erfolgreiche Anpassung der Messroutine im Hinblick auf die für den Antikörper benötigten physiologischen Bedingungen (Abschnitt 4.5.1). Die Kalibrierung konnte hierbei nicht nur durch sehr gute Wiederfindungsraten, sondern auch durch Vergleichsmessungen mit einer etablierten Standardmethode, die vom Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung durchgeführt wurden, bewiesen werden.

Huminsäuren bieten mit das größte Interferenzpotential. Aus diesem Grund wurden Matrixeffekte dieser exemplarisch auf den hier entwickelten Immunosensor untersucht (Abschnitt 4.5.2). Der Biosensor toleriert Huminsäure-Konzentration bis zu $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ und somit deutlich höhere Huminsäure-Konzentrationen als publizierte nicht-markierungsfreie und

Zusammenfassung und Ausblick

eigentlich robustere Immunosensoren. Dieses Ergebnis belegt die gute Optimierung des Immunoassays. Da im Rahmen dieser Arbeit Matrixeffekte differenziert betrachtet wurden, konnte eine genaue Identifizierung dieser erfolgen. Die mit steigender Huminsäure-Konzentration zu beobachtenden Interferenzen waren auf die zunehmend geänderten physiko-chemischen Wechselwirkungen sowie unspezifischen Wechselwirkungen mit der Sensoroberfläche zurückzuführen.

Flusswasser wurde verschiedenen Flüssen entnommen. Hierbei wurde darauf geachtet, die Probenentnahmeorte so zu wählen, dass verschiedene Matrixbelastungen vorhanden waren (Abschnitt 4.5.3). In den Nagold-, Große Enz- sowie Enz-Flusswasserproben konnte sowohl in filtrierten und gespikten Proben (Abschnitt 4.5.4) als auch in völlig unbehandelten gespikten Proben (Abschnitt 4.5.6) sehr gute Wiederfindungsraten erzielt werden. Falls doch Filter von Nöten sein sollten, wurden verschiedene, sich in ihrer Hydrophilie unterscheidende, Filtermaterialien auf ihre Eignung untersucht (Abschnitt 4.5.5). Es konnte gezeigt werden, dass vor allem hydrophobe Filter sehr gut geeignet sind.

Für den Vergleich der gespikten mit der experimentell bestimmten Konzentrationen wurde die Logistikkurve der Kalibrierkurve, welche in ultrafiltriertem entsalztem Wasser aufgenommen wurde, verwendet. Die erhaltenen sehr guten Wiederfindungsraten bestätigen eindrucksvoll den Erfolg dieser Vorgehensweise. Es ist somit nicht von Nöten, für jedes einzelne zu untersuchende Flusswasser eine Kalibrierkurve aufzunehmen. Dies und die erfolgreiche Vermeidung jeglicher Probenvorbereitungsschritte machen potentiell Vor-Ort Messen möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zusätzlich untersucht, ob Hauptmetabolite des Diclofenacs mit dem hier entwickelten Biosensor nachweisbar sind (Abschnitt 4.6). Diese Fragestellung wurde aufgeworfen, da in einer untersuchten Elbe-Flusswasserprobe zwar mittels des Biosensors aber nicht laut LC-MS/MS Vergleichsmessungen Diclofenac gefunden wurde (Abschnitt 4.5.7). Eine mögliche Erklärung wären Metabolite des Diclofenacs, die eine Kreuzreaktivität mit der verwendeten Erkennungsstruktur, dem polyklonalen anti-Diclofenac Antikörper, aufzeigen.

Je nach Art und Ausmaß der chemischen Modifizierung des Epitops kann der Diclofenac-Metabolit mit dem anti-Diclofenac Antikörper in Wechselwirkung treten. Es konnte gezeigt werden, dass das Acylglucuronid des Diclofenacs eine 100%ige und das 4'-Hydroxy-Diclofenac eine 38%ige Kreuzreaktivität aufweisen. Das Acylglucuronid des 4'-Hydroxy-Diclofenac wird hingegen kaum noch erkannt. Sind demzufolge Metabolite des Diclofenacs neben Diclofenac in einer Realmatrix vorhanden, wird anhand des Biosensors ein Summenparameter detektiert. Dies grenzt den Biosensor auch von vorhandenen Standardmethoden ab. In weiteren Arbeiten sollte dies vertieft untersucht werden.

Nanostrukturiertes Gold soll im Projekt „Hybride GRIN-Resonatoren und plasmonisch strukturierte GRIN-Linsen als kompakte Sensoren zur Spektro-Mikroskopie von Einzelpartikeln“ der Baden-Württemberg Stiftung als Transducer-Material zum Einsatz kommen, da durch die auftretenden plasmonischen Effekte eine signifikante Steigerung der

Sensitivität zu erwarten ist. Anhand des hier entwickelten Biosensors wurde untersucht, ob eine erfolgreiche Oberflächenmodifikation durchgeführt werden kann (Abschnitt 4.8). Die Funktionalität und Stabilität der sensitiven Schicht konnte erfolgreich bewiesen werden (Abschnitt 4.8.1, Abschnitt 4.8.2). Zur Auswertung wurde hierfür die Änderung der Reflektivität einer Wellenlänge verwendet. Für diesen Schichtaufbau ist die Wellenlänge 610 nm auf Grund des guten Signal zu Rausch Verhältnisses, der großen Signaländerung sowie des vorhandenen linearen Zusammenhangs zwischen Reflektivität und Änderung der optischen Schichtdicke im relevanten Messbereich am geeignetsten. Der Biosensor war dank einiger Adaptionen sehr gut auf Gold als Transducermaterial übertragbar.

In weiteren Arbeiten sollten Peptid-Diclofenac Konjugate hergestellt und zur Oberflächenmodifikation verwendet werden. Durch eine geeignete Wahl der Aminosäuresequenz könnte das Konjugat direkt auf Gold immobilisiert werden. Dies wäre zeit- und kostensparend, da nur ein statt zwei Oberflächenmodifikationsschritte durchgeführt werden müsste. Zudem könnte das Diclofenac deutlich näher als bisher an der Oberfläche immobilisiert werden. Gerade bei der Dunkelfeldmikroskopie, die im Rahmen des Projekts zum Einsatz kommen soll, ist es von Vorteil, die Antigen-Antikörper Wechselwirkung möglichst nahe an der Oberfläche zu detektieren.

Zusammenfassung und Ausblick

6 Literatur

- [Amine 2006] Amine A, Mohammadi H, Bourais I, Palleschi G, *Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring*, Biosens Bioelectron 21, 1405-1423, 2006
- [Angal 1990] Angal S, Dean PDG, *Purification by exploitation of activity*, In: Harris ELV, Angal S (eds.), *Protein purification methods*, Oxford University Press, Oxford, 1990
- [Atkins 1996] Atkins PW, *Physikalische Chemie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1996
- [Auldish 1998] Auldish MJ, Walsh BJ, Thomson NA, *Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand*, J Dairy Res 65, 401-411, 1998
- [Arroyo 2011] Arroyo D, Ortiz MC, Sarabia LA, *Optimization of the derivatization reaction and the solid-phase microextraction conditions using a D-optimal design and three-way calibration in the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by gas chromatography-mass spectrometry*, J of Chromatogr A 1218, 4487-4497, 2011
- [Azzouz 2011] Azzouz A, Jurado-Sánchez B, Souhail B, Ballesteros E, *Simultaneous determination of 20 pharmacologically active substances in cow's milk, goat's milk, and human breast milk by gas chromatography-mass spectrometry*, J Agr Food Chem 59, 5125-5132, 2011
- [Batista-Viera 2011] Batista-Viera F, Janson J-C, Carlsson J, *Affinity Chromatography*, In: Janson J-C (ed.), *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications*, Wiley, New Jersey, 2011
- [Benoiton 2006] Benoiton NL, *Chemistry of peptide synthesis*, CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, 2006
- [Bergmann 2011] Bergmann A, Fohrmann R, Weber F-A, *Zusammenstellung von Monitoraten zu Umweltkonzentrationen von Arzneimitteln*, Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau, 2011
- [Bermudez 1975] Bermudez JA, Coronado V, Mijares A, Leon C, Velazquez A, Noble P, Mateos JL, *Stereochemical approach to increase the specificity of steroid antibodies*, J Steroid Biochem 6, 283-290, 1975
- [Blobaum 2007] Blobaum AL, Marnett LJ, *Structural and Functional Basis of Cyclooxygenase Inhibition*, J Med Chem 50(7), 1425-1441, 2007

Literatur

- [Booth 1999] Booth NH, *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Iowa State University Press, Ames, 297, 1999
- [Branden 1999] Branden C, Tooze J, *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, New York, 1999
- [Brecht 1992] Brecht A, Gauglitz G, Nahm W, *Interferometric measurements used in chemical and biochemical sensors*, *Analisis* 20(3), 135-140, 1992
- [Brecht 1993] Brecht A, *Interferenzspektroskopische Untersuchungen von Affinitätsreaktionen*, Dissertation, Eberhard Karls Universität Tübingen, 1993
- [Brun 2005] Brun E et al., *Evaluation of a novel malathion immunoassay for groundwater and surface water analysis*, *Environ Sci Technol* 39, 2786-2794, 2005
- [Buchberger 2007] Buchberger WW, *Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge*, *Anal Chim Acta* 593, 129-139, 2007
- [Burba 1994] Burba P, Rocha JC, Klockow D, *Labile complexes of trace metals in aquatic humic substances: Investigations by means of an ion exchange-based flow procedure*, *Fresenius J Anal Chem* 349, 800-807, 1994
- [Campanella 2009] Campanella L, Di Persio G, Pintore M, Tonnina D, Caretto N, Martini E, Lelo D, *Determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in milk and fresh cheese based on the inhibition of cyclooxygenase*, *Food Technol Biotechnol* 47(2),172-177, 2009
- [Christensen 1997] Christensen LLH, *Theoretical Analysis of Protein Concentration Determination Using Biosensor Technology under Conditions of Partial Mass Transport*, *Anal Biochem* 249, 153-164, 1997
- [Conaghan 2012] Conaghan, PG, *A turbulent decade for NSAIDs: update on current concepts of classification, epidemiology, comparative efficacy, and toxicity*, *Rheumatol Int* 32, 1491-1502, 2012
- [Copley 1996] Copley CG, Law B, Jenner WN, *Immunology and the production of reagent antibody*, in: Law B, *Immunoassay: A practical guide*, Taylor & Francis, London, 1996
- [Corcoran 2010] Corcoran J, Winter MJ, Tyler CR, *Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish*, *Crit Rev Toxicol* 40(4), 287-404, 2010

- [Cussler 1997] Cussler EL, *Diffusion: mass transfer in fluid systems*, Cambridge University Press, 1997
- [Dannhardt 2001] Dannhardt G, Kiefer W, *Cyclooxygenase inhibitors – current status and future prospects*, Eur J Med Chem 36, 109-126, 2001
- [Demtröder 1995] Demtröder W, *Experimentalphysik 2: Elektrizität und Optik*, Springer Verlag, Berlin, 1995
- [Deng 2003] Deng A, Zhu Q-Z, Frey S, Sengl M, Buchberger W, Niessner R, Knopp D, *Residue analysis of the pharmaceutical diclofenac in different water types using ELISA and GC-MS*, Environ Sci Technol 37, 3420-3429, 2003
- [Dowling 2008] Dowling G, Gallo P, Fabbrocino S, Serpe L, Regan L, *Determination of ibuprofen, ketoprofen, diclofenac and phenylbutazone in bovine milk by gas chromatography-tandem mass spectrometry*, Food Addit Contam: Part A 25(12), 1497-1508, 2008
- [Dowling 2009] Dowling G, Gallo P, Malone E, Regan L, *Rapid confirmatory analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by rapid resolution liquid chromatography tandem mass spectrometry*, J Chromatogr A 1216, 8117-8131, 2009
- [Dowling 2010] Dowling G, Malone E, Harbison T, Martin S, *Analytical strategy for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma and improved analytical strategy for the determination of authorized and non-authorized non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk by LC-MS/MS*, Food Addit Contam 27(7), 962-982, 2010
- [Dubreil-Chéneau 2011] Dubreil-Chéneau E, Pirotais Y, Bessiral M, Roudaut B, Verdon E, *Development and validation of a confirmatory method for the determination of 12 nonsteroidal anti-inflammatory drugs in milk using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, J Chromatogr A 1218, 6292-6301, 2011
- [Dudley 1985] Dudley RA, Edwards P, Ekins RP, Finney DJ, McKenzie IG, Raab GM, Rodbard D, Rodgers RP, *Guidelines for immunoassay data processing*, Clin Chem 31(8), 1264-1271, 1985
- [Engels 2012] Engels JW, Lottspeich F, *Bioanalytik*, Springer Spektrum, Heidelberg, 2012
- [Esser 2007] Esser P, Andersen T, Rowell V, In: Rauch P, Raem AM (eds), *Immunoassays*, Elsevier, München, 2007

Literatur

- [Fatta-Kassinou 2011] Fatta-Kassinou D, Meric S, Nikolaou A, *Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research*, Anal Bioanal Chem 399, 251-275, 2011
- [Gallo 2008] Gallo P, Fabbrocino S, Vinci F, Fiori M, Danese V, Serpe L, *Confirmatory identification of sixteen non-steroidal anti-inflammatory drug residues in raw milk by liquid chromatography coupled with ion trap mass spectrometry*, Rapid Commun Mass Sp 22, 841-854, 2008
- [Gauglitz 1993] Gauglitz G, Brecht A, Kraus G, Nahm W, *Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-) layers*, Sens Actuators B, 11(1-3), 21, 1993
- [Gauglitz 1996] Gauglitz G, *Opto-chemical and opto-immuno sensors*, in Baltes H, Göpel W, Hesse J, *Sensors Update*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1996
- [Gentili 2012] Gentili A, Caretti F, Bellante S, Rocca LM, Curini R, Venditti A, *Development and validation of two multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry methods based on a versatile extraction procedure for isolating non-steroidal anti-inflammatory drugs from bovine milk and muscle tissue*, Anal Bioanal Chem 404, 1375-1388, 2012
- [Gerthsen 1989] Gerthsen C, Kneser HO, Vogel H, *Physik*, Springer Verlag, Berlin, 1971
- [Glantz 2012] Glantz M, Lindmark Månsson H, Stålhammer H, Paulsson M, *Effect of polymorphisms in the leptin, leptin receptor and acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) genes and genetic polymorphism of milk proteins on bovine milk composition*, J Dairy Res 79, 110-118, 2012
- [Goodman 1990] Goodman x, Gilman A, Rall TW, Nies AS, Palmer T, *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Peragmon Press, New York, 1990
- [Göpel 1994] Göpel W, Ziegler C, *Struktur der Materie: Grundlagen, Mikroskopie und Spektroskopie*, B. G. Taubner Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1994
- [Gruber 2007] Gruber R, In: Rauch P, Raem AM (eds), *Immunoassays*, Elsevier, München, 2007

- [Harlow 1988] Harlow E, Lane D, *Antibodies a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988
- [Hecht 1989] Hecht E, *Optik*, Addison-Wesley, Bonn, 1989.
- [Heinrich 2014] Heinrich PC, Müller M, Graeve L, *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, Springer-Verlag, Berlin, 2014
- [Hilbig 2011] Hilbig U, *Detektion des β_2 GP-I Antikörpers zur Diagnostik des Antiphospholipidsyndroms mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie*, Diplomarbeit, Eberhard Karls Universität Tübingen, 2011
- [Holtzhauer 1996] Holtzhauer M, *Chromatographie*, In: Holtzhauer M (ed.), *Methoden in der Proteinanalytik*, Springer-Verlag, Heidelberg, 1996
- [IMS Health 2008] IMS Health, IMS MIDAS Quantum based on selected markets, Q4, 2008
- [Inczedy 1998] Inczedy J, *Compendium of analytical nomenclature*, 3rd edn. Blackwell, 1998
- [Jakubke 1996] Jakubke HD, *Peptide*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1996
- [Jedziniak 2012] Jedziniak P, Szprengier-Juszekiewicz T, Pietruk K, Śledzińska E, Żmudzki J, *Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, Anal Bioanal Chem 403, 2955-2963, 2012
- [Johnson 2001] Johnson AG, *Immunologie auf 70 Seiten*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2001
- [Jones 1992] Jones KA, *Optoelektronik*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1992.
- [Juroš 1993] Juroš S, Pučar, Z, Pokrić, B, *Quantitative and qualitative characterisation of virus envelope proteins and specific polyclonal antibodies*, J Biochem Biophys Methods 27, 65-75, 1993
- [Kraus 1993] Kraus G, *Reflektometrisch-interferometrische Bestimmung organischer Verbindungen*, Dissertation, Eberhard Karls Universität Tübingen, 1993
- [Kolpin 2002] Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurmann EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT, *Pharmaceuticals, hormones, and other*

Literatur

- organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance*, Environ Sci Technol 36, 1202-1211, 2002
- [Kools 2008] Kools SAE, Moltmann JF, Knacker T, *Estimating the use of veterinary medicines in the European Union*, Regul Toxicol Pharm 50, 59-65, 2008
- [Kozłowska-Tylingo 2010] Kozłowska-Tylingo K, Namiesnik J, Gorecki T, *Determination of Estrogenic Endocrine Disruptors in Environmental Samples: A Review of Chromatographic Methods*, Crit Rev Anal Chem 40(3), 194-201, 2010
- [Köhler 1975] Köhler KG, Milstein C, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*, Nature 256, 495-497
- [Ku 1975] Ku EC, Wasvary JM, Cash WD, *Diclofenac sodium (GP 45840, Voltaren), a potent inhibitor of prostaglandin synthetase*, Biochem Pharmacol 24, 641-643, 1975
- [Kudlak 2011] Kudlak B, Namiesnik J, *Application of immunological techniques (from vaccination to final measurements) in determination of pharmaceutical residues in environmental samples*, Curr Anal Chem 7(2), 157-175, 2011
- [Kumar 2002] Kumar S, Samuel K, Subramanian R, Braun MP, Stearns RA, Chiu S-HL, Evans DC, Baillie TA, *Extrapolation of Diclofenac Clearance from in Vitro Microsomal Metabolism Data: Role of Acyl Glucuronidation and Sequential Oxidative Metabolism of the Acyl Glucuronide*, J Pharmacol Exp Ther, 303(3), 969-978, 2002
- [Kümmerer 2010] Kümmerer K, *Pharmaceuticals in the Environment*, Annu Rev Environ Resour 35, 57-75, 2010
- [Laemmli 1970] Laemmli UK, *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*, Nature 227, 680-685, 1970
- [Laine 2001] Laine L, *Approaches to nonsteroidal anti-inflammatory drug use in the high-risk patient*, Gastroenterology 120, 594-606, 2001
- [La Rocca 2006] La Rocca C, Mantovani A, *From environment to food: the case of PCB*, Ann Ist Super Sanita 42(4), 410-416, 2006
- [Law 1995] Law B, *Immunoassay a Practical Guide, Kapitel: Immunogen Preparation and Purification*, Taylor and Francis, 1995

- [van Leeuwen 2011] Van Leeuwen JS, Vredenburg G, Dragovic S, Tjong TFJ, Vos JC, Vermeulen NPE, *Metabolism related toxicity of diclofenac in yeast as model system*, Tox Lett 200, 162-168, 2011
- [Lockwood 2003] Lockwood PW, Johnson JC, Katz TL, *Clinical efficacy of flunixin, carprofen and ketoprofen as adjuncts to the antibacterial treatment of bovine respiratory disease*, Vet Rec 152, 392-394, 2003
- [Markovic 2008] Markovic G, *Einsatz von Nanopartikeln und optimierten Schichtsystemen für die Signalverstärkung in reflektometrischen Schichtsystemen*, Dissertation, Eberhard Karls Universität Tübingen, 2008
- [Milkani 2011] Milkani E, Lambert CR, McGimpsey WG, *Direct detection of acetylcholinesterase inhibitor binding with an enzyme-based surface plasmon resonance sensor*, Anal Biochem 408, 212-219, 2011
- [Moehrle 2005] Moehrle BP, Kumpf M, Gauglitz G, *Determination of affinity constants of locked nucleic acid (LNA) and DNA duplex formation using label free sensor technology*, Analyst (Cambridge, United Kingdom) 130(12), 1634-1638, 2005
- [Moore 2007] Moore N, *Diclofenac Potassium 12,5mg Tablets for Mild to Moderate Pain and Fever: A review of Its Pharmacology, Clinical Efficacy and Safety*, Clin Drug Invest 27(3), 163-195, 2007
- [Morozova 2005] Morozova VS, Levashova AI, Eremin SA, *Determination of pesticides by enzyme immunoassay*, Anal Chem 60(3), 202-217, 2005
- [Murphy 1991] Murphy RM, Yarmush ML, Colton CK, *Determining Molecular Weight Distributions of Antigen-Antibody Complexes by Quasi-Elastic Light Scattering*, Biopolymers 31, 1289-1295, 1991
- [Murphy 2001] Murphy K, *Methods in Molecular Biology: Protein structure, stability, and folding*, Volume 168, Humana Press, New Jersey, 2001
- [Nelson 2009] Nelson DL, Cox MM, *Lehninger Biochemie*, 4. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, 2009
- [Niswender 1975] Niswender GD, In: Cameron EHD, Hillier SG, Griffiths K (eds), *Steroid Immunoassay: Proceedings of the Fifth Tenovus Workshop*, Alpha Omega Publishing Ltd., Cardiff, 1975

Literatur

- [Oubiña 1997] Oubiña A, Gascón J, Barceló D, *Multianalyte effect in the determination of cross-reactivities of pesticide immunoassays in water matrices*, Anal Chim Acta 347, 121-130, 1997
- [Patel 2004] Patel BK, Hanna-Brown M, Hadley MR, Hutt AJ, *Enantiomeric resolution of 2-arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs by capillary electrophoresis: methods and applications*, Electrophoresis 25(16), 2625-2656, 2004
- [Peng 2013] Peng T, Zhu AL, Zhou YN, Hu T, Yue ZF, Chen DD, Wang GM, Kang J, Fan CL, Chen Y, Jiang HY, *Development of a simple method for simultaneous determination of nine subclasses of non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk and dairy products by ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry*, J of Chromatogr B 933, 15-23, 2013
- [Petrovic 2004] Petrovic M, Eljarrat E, López de Alda M, Barceló D, *Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data*, Anal Bioanal Chem 378, 549-562, 2004
- [Petrovic 2010] Petrovic N, Murray M, *Using N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) to Assay Cyclooxygenase Activity In Vitro*, In: Armstrong D (ed.), *Advanced Protocols in Oxidative Stress II, Methods in Molecular Biology*, 594, 129-140, 2010
- [Pezzutto 2007] Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester GR, *Taschenatlas der Immunologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2007
- [Piehler 1997] Piehler J, *Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern*, Dissertation, Eberhard Karls Universität Tübingen, 1997
- [Piehler (2) 1997] Piehler J, Brecht A, Gauglitz G, Zerlin M, Maul C, Thiericke R, Grabley S, *Label-free monitoring of DNA-ligand interactions*, Anal Biochem 249, 94-102, 1997
- [Piehler 2000] Piehler J, Brecht A, Valiokas R, Liedberg B, Gauglitz G, *A high-density poly(ethyleneglycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces*, Biosens Bioelectron 15, 473-481, 2000
- [Privalov 1974] Privalov PL, Khechinashvili NN, *A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: A calorimetric study*, J Mol Biol 86, 665-684, 1974

- [Proll 2004] Proll G, Kumpf M, Mehlmann M, Tschmelak J, Griffith H, Abuknesha R, Gauglitz G, *Monitoring an antibody affinity chromatography with a label-free optical biosensor technique*, J Immunol Methods 292, 35-42, 2004
- [Rau 2011] Rau S, *Nachweis von Testosteron in Milch als Modellsystem für die Lebensmittelanalytik mittels optischer Sensoren*, Diplomarbeit, Eberhard Karls Universität Tübingen, 2011
- [Rau 2012] Rau S, Gauglitz G, *Reflectometric interference spectroscopy (RIfS) as a new tool to measure in the complex matrix milk at low analyte concentration*, Anal Bioanal Chem 402, 529-536, 2012
- [Rehm 2006] Rehm H, *Der Experimentator Proteinbiochemie/ Proteomics*, Elsevier, München, 2006
- [Richtlinie 2013/39/EU] Richtlinie 2013/39/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. August 2013 zur Änderung der Richtlinien 2000/60/EG und 2008/105/EG in Bezug auf prioritäre Stoffe im Bereich der Wasserpolitik, 2013
- [Roberts 2001] Roberts L, Morrow J, Hardman J, Limbird LE, *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, 2001
- [Robinson 1975] Robinson JD, Morris BA, Pfall EM, Aherne GW, Marks V, In: Pasternak CA (ed.) *Radioimmunoassay in Clinical Biochemistry*, Heyden, 1975
- [Rodriguez-Mozaz 2006] Rodriguez-Mozaz S, Lopez de Alda MJ, Barceló D, *Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring*, Anal Bioanal Chem 386, 1025-1041, 2006
- [Savage 1993] Savage HJ, Elliot CJ, Freeman CM, Finney JL, *Lost hydrogen-bonds and buried surface-area: Rationalizing stability in globular proteins*, J Chem Soc Faraday Trans 89, 2609-2617, 1993
- [Schütt 2009] Schütt C, Bröker B, *Grundwissen Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009
- [Schwaiger 2004] Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, Wintermayr H, Negele RD, *Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout*, Aquat Toxicol 68, 141-150, 2004
- [Schweizer 2012] Schweizer N, *Charakterisierung von Poly(ethylenglycol)-Derivaten für den Einsatz in der markierungsfreien optischen*

Literatur

- Biosensorik*, Dissertation, Eberhard Karls Universität Tübingen, 2012
- [Sciex 2012] AB SCIEX, *BSA calibration standard kit for AB SCIEX MALDI-TOF instruments*, protocol, 2012
- [Sharma 2013] Sharma H, Mutharasan R, *Review of biosensors for foodborne pathogens and toxins*, *Sensor Actuat B-Chem* 183, 535-549, 2013
- [Shin 2012] Shin H-S, Oh J-A, *Simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in river water by gas chromatography-mass spectrometry*, *J Sep Sci* 35, 541-547, 2012
- [Sigma 2013] Sigma-Aldrich, *Product specification of ProteoMassTM Albumin MALDI-MS Standard*, CAS 9048-46-8, 2013
- [Smith 2008] Smith GW, Davis JL, Tell LA, Webb AI, Riviere JE, *Extra-label use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in cattle*, *J. Am Vet Med Assoc* 232, 697-701, 2008
- [Simmons 2004] Simmons DL, Botting RM, Hla T, *Cyclooxygenase Isoenzymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition*, *Pharmacol Rev* 56, 387-437, 2004
- [Solangi 2009] Solangi AR, Memon SQ, Mallah A, Khuhawar MY, Bhangar MI, *Quantitative separation of oxytocin, norfloxacin and diclofenac sodium in milk samples using capillary electrophoresis*, *Biomed Chromatogr* 23, 1007-1013, 2009
- [Steinhilber 2010] Steinhilber D, Schubert-Zsilavec M, Roth HJ, *Medizinische Chemie, Targets, Arzneistoffe, Chemische Biologie*, Deutscher Apotheken Verlag, Stuttgart, 2010
- [Stierlin 1979] Stierlin H, Faigle JW, *Biotransformation of diclofenac sodium (Voltaren) in animals and man. II. Quantitative determination of the unchanged drug and principal phenolic metabolites in urine and bile*, *Xenobiotica* 9, 611-621, 1979
- [Stryer 1990] Stryer L, *Biochemie, Kapitel: Molekulare Immunologie*, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, Heidelberg, 1990
- [Sundlof 1995] Sundlof SF, Kaneene JB, Miller RA, *National survey on veterinarian-initiated drug use in lactating dairy cows*, *J Am Vet Med Assoc* 207(3), 347-352, 1995
- [Swan 2006] Swan GE et al., *Toxicity of diclofenac to Gyps vultures*, *Biol Lett* 2, 279-282, 2006

- [Taverna 2002] Taverna DM, Goldstein RA, *Why are proteins marginally stable?*, Proteins 46, 105-109, 2002
- [Taylor 1991] Taylor RF, Marenchic IG, Spencer RH, *Antibody- and receptor-based biosensors for detection and process control*, Anal Chim Acta 249(1), 67-70, 1991
- [Teng 2013] Teng Q, Ekman DR, Huang W, Collette TW, *Impacts of 17 α -ethynylestradiol exposure on metabolite profiles of zebrafish (*Danio rerio*) liver cells*, Aquat Toxicol 130-131, 184-191, 2013
- [Ternes 1998] Ternes TA, *Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers*, Water Research 32(11), 3245-3260, 1998
- [Thermo 2010] Thermo Scientific Pierce, *Antibody Production and Purification Technical Handbook*, Thermo Scientific, 2010
- [Toscano 1998] Toscano I, Gascón J, Marco M-P, Rocha JC, Barceló D, *Atrazine interaction with tropical humic substances by Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, Analisis 26, 130-134, 1998
- [Trauger 2002] Trauger SA, Webb W, Siuzdak G, *Peptide and protein analysis with mass spectrometry*, Spectroscopy 16, 15-28, 2002
- [Tschmelak 2006] Tschmelak J, Kumpf M, Käppel N, Proll G, Gauglitz G, *Total internal reflectance fluorescence (TIRF) biosensor for environmental monitoring of testosterone with commercially available immunochemistry: Antibody characterization, assay development and real sample measurements*, Talanta 69, 343-350, 2006
- [Turrio-Baldassarri 1993] Turrio-Baldassarri L, di Domenico A, Fulgenzi AR, Iacovella N, La Rocca C, *Differences in polychlorobiphenyl (PCB) contamination patterns in various environmental matrices*, Sci Total Environ 134(2), 1439-1451, 1993
- [Vane 1998] Vane JR, Botting RM, *Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*, Am J Med 104, 2S-8S, 1998
- [Vergeynst 2014] Vergeynst L, Van Langenhove H, Joos P, Demeestere K, *Suspect screening and target quantification of multi-class pharmaceuticals in surface water based on large-volume injection liquid chromatography and time-of-flight mass spectrometry*, Anal Bioanal Chem 406, 2533-2547, 2014
- [Verordnung (EU) Nr. 37/2010] Verordnung (EU) Nr. 37/2010 der Kommission vom 22.12.2009 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung

Literatur

- hinsichtlich der Rückstandshöchstmenge in Lebensmitteln tierischen Ursprungs
- [Vidal 2013] Vidal JC, Bonel L, Ezquerra A, Hernández S, Bertolín JR, Cubel C, Castillo JR, *Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: A review*, Biosens Bioelectron 49, 146-158, 2013
- [Voet 2008] Voet D, Voet JG, Pratt CW, *Principles of Biochemistry*, WILEY, 2008
- [Wengatz 1992] Wengatz I, Schmid RD, *Determination of the hapten density of Immuno-conjugates by matrix-assisted UV laser desorption/ionization mass spectrometry*, Analytical Letters 25(11), 1983-1997, 1992
- [Wiegel 2004] Wiegel S, Aulinger A, Brockmeyer R, Harms H, Löffler J, Reincke H, Schmidt R, Stachel B, von Tümpling W, Wank A, *Pharmaceuticals in the River Elbe and its tributaries*, Chemosphere 57, 107-126, 2004
- [Wollenberger 2003] Wollenberger U, Renneberg R, Bier FF, Scheller FW, *Analytische Biochemie, Kapitel: Antikörper in der Analytischen Biochemie*, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, 2003
- [Zhou 2014] Zhou W, Huang PJ, Ding J, Liu J, *Aptamer-based biosensors for biomedical diagnostics*, Analyst 139(1), 2627-2640, 2014

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A ₁	obere Asymptote
A ₂	untere Asymptote
ABTS	Diammoniumsalz der 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ACN	Acetonitril
Ag	Antigen
AgAk	Antigen-Antikörper-Komplex (Immunkomplex)
aAK	aufgereinigter Antikörper
AK	Antikörper
Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
β-Ala	β-Alanin
b	Breite des Flusskanals
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
c	Konzentration
C	konstante Domäne
CDR	complementary determining region
CNBr	Bromcyan
COX	Cyclooxygenase
D	Diffusionskoeffizient
Da	Dalton
DA-PEG	Diamino-Poly(ethylenglycol)
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DMF	N,N-Dimethylformamid
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Anhang

EU	Europäische Union
F	Fließgeschwindigkeit
Fab	Fragment of antigen binding
Fc	constant fragment
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
GdnHCl	Guanidinhydrochlorid
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GOPTS	(3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilan
h	Höhe des Flusskanals
H	schwere Kette eines Antikörpers
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
k_a	Assoziationsratenkonstante
k_d	Dissoziationsratenkonstante
K_{aff}	Affinitätskonstante
K_d	Dissoziationskonstante
KLH	Schlitzschnecken-Hämocyanin (keyhole limpet hemocyanin)
Ig	Immunglobulin
J_D	Diffusionsfluss
l	Länge des Flusskanals
L	leichte Kette eines Antikörpers
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie- Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (bzw. Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie)
Leu	Leucin
LOD	Nachweisgrenze (limit of detection)
LOQ	Bestimmungsgrenze (limit of quantification)
Lys	Lysin
M	Molare Masse
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry

MWCO	Ausschlussgrenze nach Molekulargewicht (Molar Weight Cut Off)
n	Brechungsindex
NMM	N-Methylmorpholin
NSAID	Nichtsteroidales Antirheumatikum (nonsteroidal anti-inflammatory drug)
OtBu	O-tert-Butyl
OVA	Ovalbumin
p	Steigung der Logistikkfunktion am Testmittelpunkt
P	Polarisation
P _o	Orientierungspolarisation
P _v	Verschiebungspolarisation
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PE	Polyethylen
pH	Stärke des Wasserstoffs (potentia hydrogenii)
PP	Polypropylen
R	Bezeichnung für die Seitenkette der α -Aminosäuren
R	Reflexion
R ₀	hydrodynamische Radius
RIfS	Reflektometrische Interferenzspektroskopie
RP-HPLC	Reversed phase - high performance liquid chromatography
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser	Serin
T	Transmission
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborat
TCP	Tritylchlorid-Polystyrol
tBu	tert-Butyl

Anhang

UV-VIS	Ultraviolett-visible
V	Volumen
WW	Wechselwirkung
x	Analytkonzentration
x_0	Analytkonzentration am Testmittelpunkt
ΔG^0	Änderung der freien Standardenthalpie
δ	Dicke der Diffusionsschicht
ε	elektrische Feldkonstante
ε_0	elektrische Feldkonstante im Vakuum
ε_r	Dielektrizitätskonstante
μ	magnetische Permeabilität
μ_0	magnetische Permeabilität im Vakuum

7.2 Akademische Lehrer

Prof. Dr. Klaus Albert, Prof. Dr. Thomas Chassé, Prof. Dr. Dines Christen, Prof. Dr. Günter Gauglitz, Prof. Dr. Jörg Ihringer, Prof. Dr. Walter Jäger, Prof. Dr. Norbert Kuhn, PD Dr. Hans-Georg Mack, Prof. Dr. Hermann A. Mayer, Prof. Dr. Martin E. Maier, Prof. Dr. Alfred J. Meixner, Prof. Dr. Hans-Jürgen Meyer, Prof. Dr. Ulrich Nagel, Prof. Dr. Christian Ochsenfeld, PD Dr. Heiko Peisert, PD Dr. Helmut Pommer, Prof. Dr. Volker Schurig, Prof. Dr. Michael Schwarz, Prof. Dr. Eberhard Schweda, Prof. Dr. Bernd Speiser, Prof. Dr. Vlada B. Urlacher, Prof. Dr. Udo Weimar, Prof. Dr. Lars Wesemann, Dr. Dorothee Wistuba, Prof. Dr. Klaus-Peter Zeller, Prof. Dr. Thomas Ziegler

