



universität
wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Entwicklung von auf Aptameren basierenden
Analysenmethoden für Bisphenol A“

Verfasser

Georg Aichinger, Bakk.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 8.1.2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 863

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Masterstudium Biologische Chemie

Betreuerin / Betreuer:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Margit Cichna-Markl

Danksagung

Ich will mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich während meines Studiums und besonders während der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonders hervorheben will ich dabei meine Frau, die viel Geduld mit mir aufgebracht hat und mich in schwierigen Phasen immer wieder motiviert hat. Mein Dank gilt auch meinen Eltern, die mich während meines Studiums tatkräftig unterstützt haben.

Bei ao. Univ.-Prof. Dr. Margit Cichna-Markl bedanke ich mich für die tolle Betreuung meiner Diplomarbeit. Das Ausmaß an Zeit, die sie für jeden Einzelnen ihrer Studenten aufbringt, ist einzigartig und eine große Hilfe.

Ich bedanke mich auch bei allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, sowohl für den fachlichen Austausch als auch für die netten Pausen zwischendurch.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung: Bisphenol A	1
1.1	Erzeugung	2
1.2	Verwendung	2
1.2.1	Polymerherstellung	2
1.2.2	Sonstige Verwendung	3
1.3	Migrationsverhalten	3
1.4	Gesundheitliche Risiken	4
1.4.1	Akute Toxizität	4
1.4.2	Wirkung als Xenoöstrogen	4
1.4.3	Kanzerogenität	6
1.4.4	Auswirkungen auf Herz und Leber sowie Zusammenhang mit Diabetes	6
1.4.5	Effekte bei sehr niedrigen Dosen	7
1.5	Bisphenol A als Umweltgift	7
1.6	Gesetzeslage	7
1.7	BPA-Analytik	8
1.7.1	Probenvorbereitung	9
1.7.1.1	Flüssig-Fest und Flüssig-Flüssig Extraktion	10
1.7.1.2	Festphasenextraktion	10
1.7.1.3	Immunaффinitätschromatographie	10
1.7.2	Chromatographische Methoden	11
1.7.2.1	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie	11
1.7.2.2	Gaschromatographie	12
1.7.3	Immunoassay	12
1.7.3.1	Radioimmunoassay	13
1.7.3.2	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	13
1.7.4	Betrachtung der Verwendung von Antikörpern	13
1.7.5	Aptamere - eine Alternative zu Antikörpern?	14

2	Zielsetzung	16
3	Theoretischer Hintergrund: Aptamere	18
3.1	Nukleinsäuren	18
3.2	Aptamere - Definition und Entdeckung	19
3.3	SELEX - <i>in vitro</i> Selektion	20
3.3.1	Design der Bibliothek	21
3.3.2	Selektion der Nukleinsäuren	22
3.3.3	Separation und Elution	22
3.3.4	Amplifikation der Aptamere	23
3.3.5	Zyklen	23
3.3.6	SELEX-Modifikationen	24
3.4	Anwendungen von Aptameren	25
3.4.1	Einsatz als Katalysatoren	25
3.4.2	Einsatz in der Medizin	26
3.4.2.1	Anwendung als Marker für SPECT und PET	27
3.4.2.2	Therapeutische Anwendung	28
3.4.3	Anwendungen in der Analytik	29
3.4.3.1	Aptamer-Affinitätschromatographie	30
3.4.3.2	Enzyme-linked Aptamer Assay (ELAA)	33
3.4.3.3	Anwendung von Aptameren als Molecular Beacons	35
3.4.3.4	Aptamer-Affinitätssensoren	36
3.4.4	Protein-Funktionsanalyse sowie Entwicklung von Medikamenten	38
3.5	BPA-bindendes Aptamer	39
4	Ergebnisse und Diskussion	40
4.1	Überprüfung des Aptamers mittels Real-time PCR	40
4.2	Bestimmung von BPA mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion (HPLC-FL)	42
4.3	Aptamer-Affinitätschromatographie	43
4.3.1	Immobilisierung des BPA-Aptamers mittels der Sol-Gel Methode	43
4.3.1.1	Herstellung des Sol-Gels	43
4.3.1.2	Messung der Bindungskapazität in Batchversuchen	45
4.3.1.3	Messung der Bindungskapazität in Säulenversuchen	46

4.3.2	Kovalente Immobilisierung	47
4.3.2.1	Immobilisierung des unmodifizierten Aptamers . .	48
4.3.2.2	Immobilisierung des Phosphat-modifizierten Aptamers	50
4.4	Enzyme-linked Aptamer Assay (ELAA)	54
4.4.1	Indirekt-kompetitiver Assay	54
4.4.1.1	Herstellung des BSA-BPA Konjugats	54
4.4.1.2	Entwicklung des ELAA	55
4.4.2	Direkt-kompetitiver Assay	57
4.4.2.1	Herstellung des BPA-HRP Konjugats	58
4.4.2.2	Entwicklung des direkt-kompetitiven ELAA	58
4.4.2.3	Optimierungsversuche	61
4.4.2.4	Anwendung des ELAA auf Lebensmittel	67
4.4.2.5	Aptamerproblematik	74
4.5	Bindungsversuche mit Ultrafiltrationseinheiten	81
4.5.1	Bindungsversuch mit dem biotinylierten Aptamer	81
4.5.2	Bindungsversuche mit dem nicht-modifizierten Aptamer . . .	82
4.5.2.1	Inkubation in Filtrationseinheiten	82
4.5.2.2	Inkubation in Polypropylen-Röhrchen	83
4.5.2.3	Kurzzeiterhitzung des Aptamers	84
4.5.2.4	Bindungsversuche mit Avidin und Streptavidin . .	85
4.5.3	Schlussfolgerung	86
5	Experimenteller Teil	87
5.1	Verwendete Lösungen	87
5.2	Verwendete Chemikalien	90
5.3	Verwendete Geräte	91
5.4	Validierung des Aptamers mittels Real-time PCR	91
5.5	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenz-Detektion (HPLC-FL)	92
5.6	Immobilisierung des Aptamers	93
5.6.1	Immobilisierung mit der Sol-Gel Methode	93
5.6.1.1	Herstellung des Sol-Gel Materials	93
5.6.1.2	Ausblutungstest	94
5.6.1.3	Bestimmung der Bindungskapazität im Batchversuch	94

5.6.1.4	Bestimmung der Bindungskapazität in Säulen-	
	versuchen	95
5.6.2	Kovalente Immobilisierung	95
5.6.2.1	Herstellung der Säulen	95
5.6.2.2	Bindungstests	97
5.7	ELAA	98
5.7.1	Herstellung der Konjugate	98
5.7.1.1	BPA-Trägerprotein Konjugate	98
5.7.1.2	BPA-HRP Konjugat	98
5.7.2	Indirekt-kompetitiver Assay	99
5.7.2.1	„Coating“ der Mikrotiterplatte	99
5.7.2.2	Blocken der freien Bindungsstellen	99
5.7.2.3	Kompetitiver Schritt	99
5.7.2.4	Enzymreaktion und photometrische Messung . . .	99
5.7.3	Direkt-kompetitiver Assay	100
5.7.3.1	Avidinzugabe	100
5.7.3.2	Blocken der freien Bindungsstellen	100
5.7.3.3	Aptamerzugabe	100
5.7.3.4	Kompetitiver Schritt	101
5.7.3.5	Enzymreaktion und photometrische Messung . . .	103
5.8	Bindungsversuche in einer Ultrafiltrationseinheit	104
5.8.1	Mit dem biotinylierten Aptamer und dem unmodifizierten	
	Aptamer	104
5.8.2	In Polypropylen-Röhrchen	104
5.8.3	Mit hitzebehandeltem Aptamer, Avidin bzw. Streptavidin .	105
6	Zusammenfassung	106
7	Anhang	108
	Abstract (Deutsch)	I
	Abstract (English)	II
	Abbildungsverzeichnis	III
	Tabellenverzeichnis	VI
	Abkürzungsverzeichnis	VII
	Literaturverzeichnis	X
	Lebenslauf	XVII

1 Einleitung: Bisphenol A

Bisphenol A (BPA, Abbildung 1) ist ein Diphenylmethanderivat, das vor allem zur Erzeugung verschiedener Kunststoffe (z.B. Polycarbonat, Epoxidharze) verwendet wird. Aus diesen, auch als Verpackungsmaterialien eingesetzten Polymeren kann eine Migration in Lebensmittel stattfinden. Daher entwickelte sich in den letzten Jahren eine Diskussion darüber, ob und wie gesundheitsschädlich BPA, vor allem aufgrund seiner Eigenschaft als endokriner Disruptor, für den Menschen ist. Die Meinungen dazu gehen weit auseinander. Während eine Reihe von Studien, zum Teil aus dem Umfeld der kunststofferzeugenden Industrie, nahelegt, dass aufgrund der Schwäche der Disruptorwirkung und den niedrigen Konzentrationen in Lebensmittel keine Gefährdung besteht,^{1,2} existieren viele andere Studien, die die Exposition gegenüber BPA als hohes Gesundheitsrisiko einstufen. Aus diesem Grund hat die EU im Jahr 2011 den Einsatz von BPA bei der Erzeugung von Babyflaschen verboten.³

Auf den folgenden Seiten will ich einen Überblick über die Erzeugung und Verwendung von BPA, gesundheitliche Risiken durch die Exposition gegenüber BPA, sowie über gesetzliche Bestimmungen bezüglich BPA geben. Außerdem werde ich auch einen kurzen Blick auf analytische Methoden werfen, die zur Bestimmung von Bisphenol A angewandt werden.

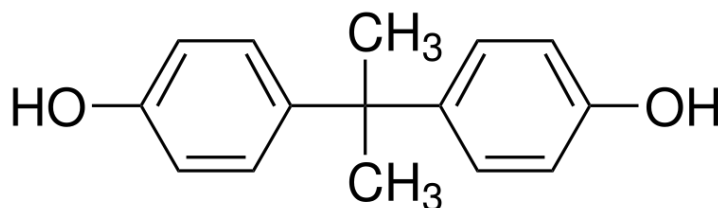


Abbildung 1: Strukturformel von Bisphenol A

1.1 Erzeugung

Die industrielle Synthese von BPA erfolgt durch Kondensation von Aceton mit zwei Phenol-Molekülen unter stark sauren Bedingungen (siehe Abbildung 2). Jährlich werden ca. vier Millionen Tonnen Bisphenol A hergestellt.⁴

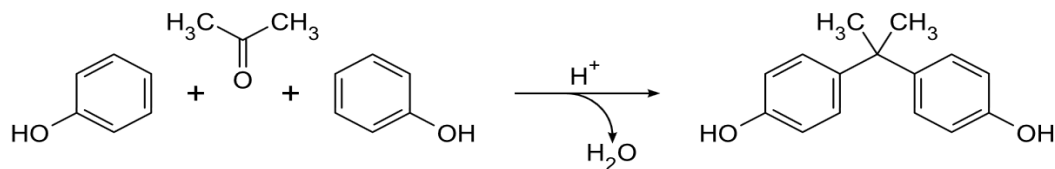


Abbildung 2: Synthese von Bisphenol A

1.2 Verwendung

1.2.1 Polymerherstellung

BPA wird als Edukt zur Synthese von Polycarbonaten (PC, siehe Abbildung 3) und Epoxidharzen (siehe Abbildung 4), sowie als Antioxidans in anderen Kunststoffen (z.B. flexiblem PVC) eingesetzt. Polycarbonate sind weit verbreitet und finden unter anderem Anwendung in CDs/DVDs, in der Elektrotechnik, bei diversen optischen Geräten und als Kunststoffgeschirr. Epoxidharze werden als Kleb- bzw. Verbundstoffe eingesetzt, aber auch als Schutzbeschichtung bei Konservendosen oder Getränkeflaschen.

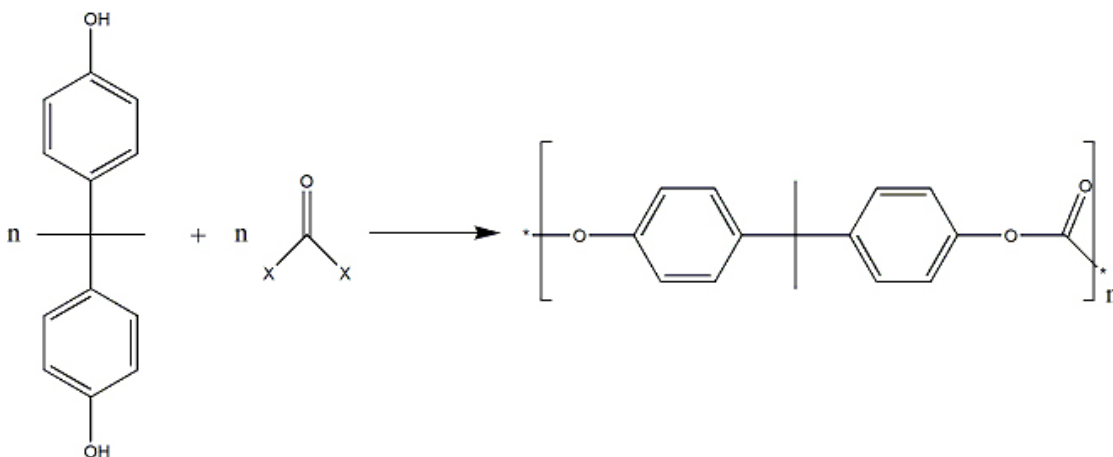


Abbildung 3: Synthese von Polycarbonat aus Bisphenol A

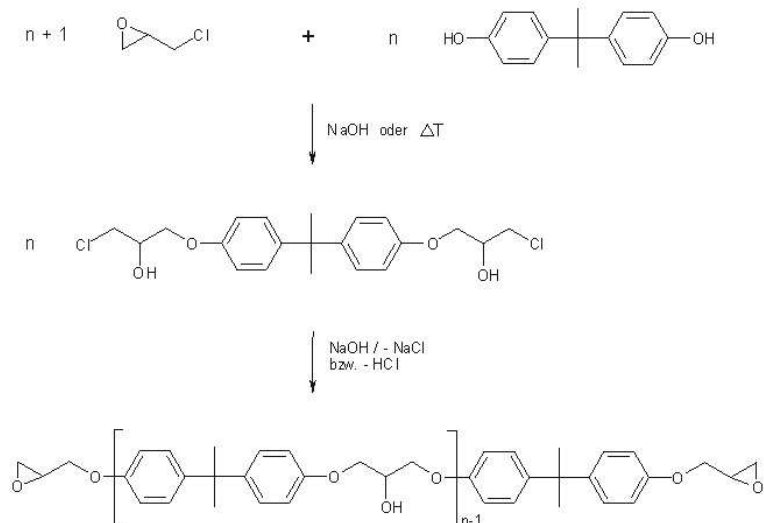


Abbildung 4: Synthese von Epoxidharz aus Bisphenol A [aus: <http://www.chemgapedia.de>]

1.2.2 Sonstige Verwendung

Bisphenol A wird bzw. wurde außerdem verwendet:

- als Edukt zur Herstellung von Tetrabrombisphenol A (ein Flammschutzmittel und Fungizid)⁵
- als Farbreaktanzmittel in kohlefreien Durchschlagpapieren bzw. in Thermopapier⁴
- bis in die 1930er Jahre als Ersatzöstrogen für Frauen und als wachstumsförderndes Mittel in der Rinder- und Geflügelzucht⁴

1.3 Migrationsverhalten

Bei der Herstellung von Polymeren aus BPA wird dieses nicht vollständig verbraucht und verbleibt als freies BPA im Kunststoff. Kommt dieser in Kontakt mit Lebensmitteln, kann es zur Migration des freien BPA in die Lebensmittelmatrix kommen. Diese „klassische“ Migration führt in der Regel zu Konzentrationen, die weit unter den gesetzlichen Grenzwerten liegen.⁶

Allerdings kann es auch zur Hydrolyse des Kunststoffs unter Freisetzung von Bisphenol A kommen, was inzwischen als Hauptgrund der BPA-Migration betrachtet wird. So können unter geeigneten Reaktionsbedingungen (z.B. alkalischem Milieu, Hitze) auch größere Mengen an BPA migrieren.⁷ Einen verstärkenden Einfluss auf

das Migrationsverhalten haben außerdem die Lagerzeit und das Alter des Kunststoffes.^{8,9} In der Regel kommt es unter Normalbedingungen nicht zur Überschreitung der gesetzlichen Grenzwerte für BPA. Diese werden meist nur bei falscher Verwendung der BPA-hältigen Kunststoffe erreicht, wie z.B. durch „falsches“ Einordnen in die Spülmaschine (alkalisches Milieu, Hitze, Aufkonzentration durch Eintrocknen) oder Erhitzen von Epoxidharz-beschichteten Konserven.

1.4 Gesundheitliche Risiken

1.4.1 Akute Toxizität

BPA hat nur eine geringe akute Toxizität, bei Menschen liegen die LD₅₀-Werte zwischen 4 und 12 g/kg Körpergewicht.

1.4.2 Wirkung als Xenoöstrogen

Die östrogene Wirkung von Bisphenol A ist seit den 1930ern bekannt, und beruht auf der Struktur-Ähnlichkeit mit dem Östrogen 17 β -Östradiol (Abbildung 5). So bindet BPA an Östrogen-Rezeptoren, (engl. estrogen receptors, ER) und wirkt somit als endokriner Disruptor, d.h. störend auf das menschliche Hormonsystem.

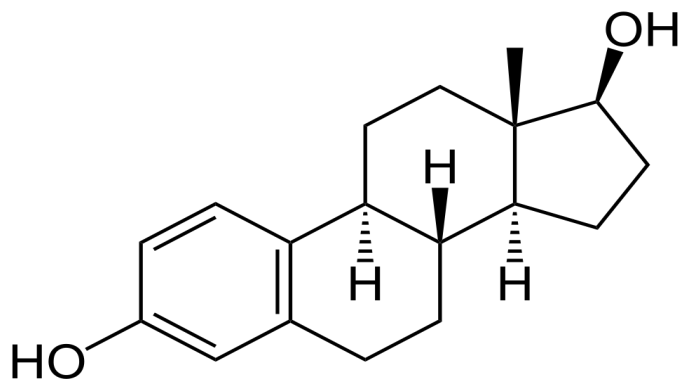


Abbildung 5: Strukturformel von 17 β -Östradiol

Da Östrogene Steroide sind, sind sie in der Lage, Zellmembranen zu passieren. Östrogen-Rezeptoren müssen daher nicht extrazellulär präsentiert werden und liegen in der Regel im Zytosol vor. Bisher wurden zwei ERs identifiziert, ER- α und

ER- β . Die Bindung eines Liganden führt zur Transkription diverser Gene (Abbildung 6). Neben diesem klassischen Weg der Signaltransduktion aktivieren Ligand-ER Komplexe aber auch die cytosolische Tyrosin Kinase Src. Dadurch werden die Signaltransduktionswege verschiedener Wachstumsfaktor-Rezeptoren so beeinflusst, dass eine Erhöhung des Wachstums und der Überlebensrate von Zellen beobachtet werden kann.^{10,11}

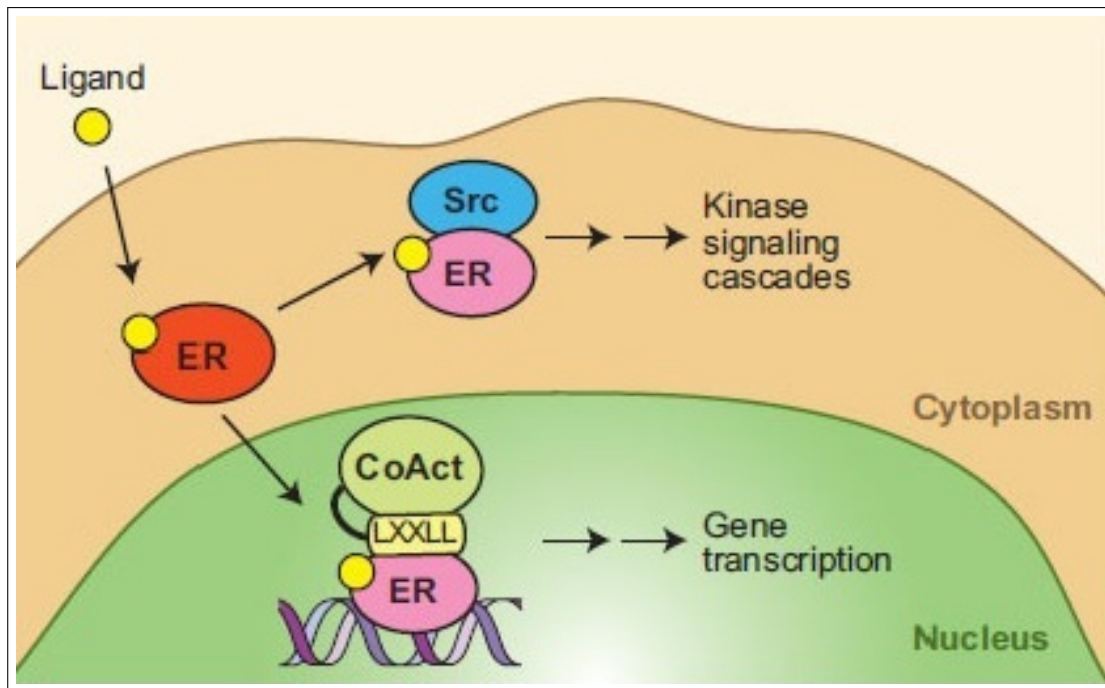


Abbildung 6: Stark vereinfachte Skizze der ER-Signaltransduktion. Ligandenbindung an einen ER lässt diesen an den ER-Operator von Genen binden, wodurch Co-Aktivatoren (CoAct) über das ER-bindende Motif LXXLL ebenfalls an den ER binden und die Transkription verschiedener Gene aktivieren. Weiters bindet der ER-Ligand Komplex auch an die Tyrosin Kinase Src, wodurch Phosphorylierungskaskaden ausgelöst oder beeinflusst werden.[aus: Weatherman, 2008, Sensing Estrogen's Many Pathways]

Die Affinität von BPA zu den ERs ist relativ schwach (ca. 1:2000 im Vergleich zu 17 β -Estradiol).¹² BPA bindet jedoch auch mit hoher Affinität an den Estrogen-related Receptor Gamma (ERR-Gamma),¹³ diese Affinität wird inzwischen als ausschlaggebend bei der Wirkung von BPA als endokrinem Disruptor angesehen. ERR- γ ist ein nuklearer Rezeptor, der nach Bindung eines Liganden Transkriptions-aktivierend wirkt. Die eigentliche Aufgabe von ERR- γ ist noch nicht geklärt, da noch kein natürlicher Ligand für den Rezeptor gefunden wurde.

Aufgrund der östrogenen Wirkung wird eine Reihe von negativen gesundheitlichen Effekten mit BPA in Verbindung gebracht (Tabelle 1). Die meisten dieser Effekte wurden bei pränataler bzw. frühkindlicher Exposition beobachtet, daher scheinen Organismen in frühen Entwicklungsstadien besonders gefährdet zu sein.

Tabelle 1: Auswahl dokumentierter Effekte, verursacht durch die östrogene Wirkung von BPA

Effekt	Organismus	Studie
Schädigung der Entwicklung des Uterus bei fötaler Exposition	Maus, Affe	Smith, Taylor 2007; ¹⁴ Calhoun et al. 2011 ¹⁵
Schädigung der Ovar-Entwicklung	Maus	Adewale et al. 2009 ¹⁶
Störung der männlichen Geschlechtsdetermination bei pränataler Exposition	Affe, Ratte	Nakagami et al. 2009; ¹⁷ Lubo et al. 2003 ¹⁸
Erektile Dysfunktion	Mensch	Li et al. 2010 ¹⁹
Verhaltensstörungen bei fötaler Exposition	Affe	Nakagami et al. 2009 ¹⁷
Eierstock-Dysfunktion	Mensch	Takeuchi et al. 2004 ²⁰

1.4.3 Kanzerogenität

Es gibt Studien, die auf einen Zusammenhang zwischen einer BPA-Exposition und erhöhten Brustkrebs- bzw. Leukämieraten hinweisen.^{21,22} Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) betrachtet diese Studien allerdings aufgrund der „zweifelhaften statistischen Signifikanz und der geringen Unterschiede zu Kontrollproben“ nicht als Beweis für die Kanzerogenität von BPA.²³

Außerdem weisen Studien auf eine Korrelation zwischen einer BPA-Exposition und der Wahrscheinlichkeit, an (meist gutartigen) Hirntumoren zu erkranken, hin.²⁴

1.4.4 Auswirkungen auf Herz und Leber sowie Zusammenhang mit Diabetes

Im Jahr 2008 kam eine sehr ausführliche und aufsehenerregende Studie zum Schluss, dass erhöhte BPA-Konzentrationen im Urin von Testpersonen mit erhöhten Raten von Herzmuskelerkrankungen und Diabetes sowie mit einer abnormalen Überexpression bestimmter Leberenzyme korrelierten.²⁵

1.4.5 Effekte bei sehr niedrigen Dosen

Ein relativ junges Forschungsgebiet sind die Auswirkungen von sehr geringen BPA-Dosen (sogenannte „low-dose effects“). Von der Kunststoffindustrie werden diese Effekte von BPA zwar hartnäckig bestritten, jedoch wurden diese in vielen Studien belegt. Zu den belegten Effekten zählen Eierstock-Schädigung, Aktivierung der Proliferation von Krebszellen, hormonelle Störungen im Thymus sowie Hemmung der Testosteron-Synthese, um nur einige zu nennen.²⁶

1.5 Bisphenol A als Umweltgift

Durch den Abbau von BPA-hältigem Kunststoffabfall gelangen große Mengen von BPA in Gewässer, v.a. große, in den Ozeanen treibende „Plastikinseln“ stellen eine Gefahr dar. Für in den Gewässern lebende Organismen kann es durch die Aufnahme von BPA, v.a. in Form kleiner Plastikpartikel, zu negativen Auswirkungen auf den Gesundheitszustand und die Reproduktionsfähigkeit kommen.²⁷ So wurde z.B. bei embryonaler Exposition von Fischen gegenüber niedrigen BPA-Dosen eine Veränderung der Transkription diverser Gene und auch ein Einfluss auf die Körperlänge der Larven festgestellt.²⁸

Fische speichern BPA sowohl in der Leber als auch in der Muskulatur, und werden als eine der Hauptquellen der menschlichen Exposition betrachtet.²⁹

1.6 Gesetzeslage

In der EU ist BPA von der EFSA (European Food Safety Authority) zur Verwendung in Lebensmittelkontaktmaterialien zugelassen. Im Jahr 2011 wurde allerdings der Einsatz von Bisphenol A enthaltenden Kunststoffen in Säuglingsflaschen verboten.³

Als Tolerably Daily Intake (TDI) wird momentan eine BPA-Konzentration von 0,05 mg/kg Körpergewicht betrachtet, der Grenzwert in Lebensmitteln wurde von der EFSA auf 0,6 mg/kg Lebensmittel festgesetzt. Dieser Grenzwert ist jedoch aufgrund der Nicht-Berücksichtigung der Art der Migration und aufgrund von dokumentierten negativen Effekten, die bei Exposition gegenüber unter dem Grenzwert liegender Konzentrationen auftreten, umstritten.

Im Februar 2012 kündigte die EFSA an, aufgrund jüngster Forschungsergebnisse „eine vollständige Neubewertung der für den Menschen bestehenden Risiken

im Zusammenhang mit der BPA-Exposition über die Ernährung vorzunehmen und dabei auch den Beitrag von Nicht-Nahrungsquellen zur BPA-Gesamtbelastung zu berücksichtigen.“ Diese Neubewertung war zum Zeitpunkt dieser Masterarbeit noch im Gang.³⁰

1.7 BPA-Analytik

Für die Bestimmung von Bisphenol A existieren zahlreiche Methoden. Vor allem chromatographische, aber auch immunanalytische Methoden spielen eine große Rolle. Die Bestimmung von Bisphenol A ist vor allem in Lebensmittelproben und anderen biologischen Proben von großem Interesse. Dabei handelt es sich um relativ komplexe Probenmatrizes, die für die Anwendung der meisten analytischen Methoden zuvor durch einen oder mehrere Probenvorbereitungsschritte vom Analyt abgetrennt werden müssen, um bei der eigentlichen analytischen Messung nicht zu stören. Abbildung 7 zeigt eine Übersicht über die für die Bestimmung von BPA in Lebensmitteln verwendeten Methoden.

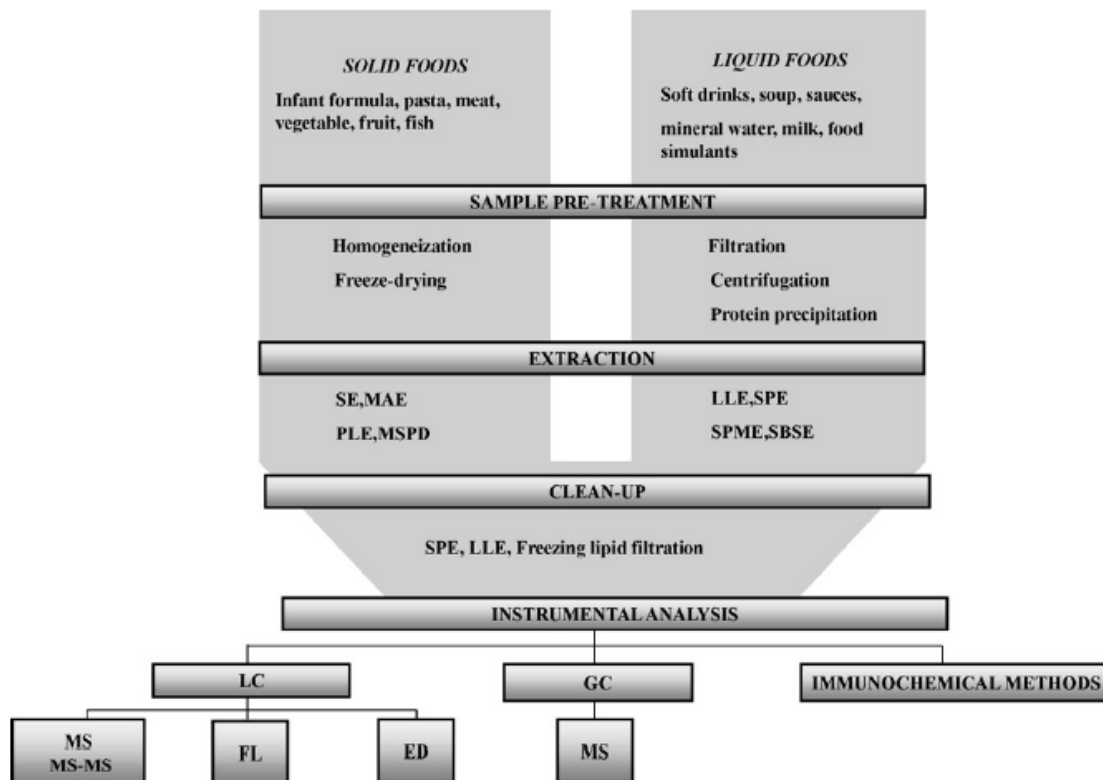


Abbildung 7: Übersicht über die analytischen Methoden zur Bestimmung von BPA in Lebensmitteln.

SE: solvent extraction, MAE: microwave-assisted extraction, PLE: pressurized liquid extraction, MSPD: matrix solid-phase dispersion, LLE: liquid-liquid extraction, SPE: solid-phase extraction; SPME, solid-phase microextraction; SBSE, stir bar sorptive extraction, FL: fluorescence detection, ED: electrochemical detection. [aus Ballesteros et al.: Analytical methods for the determination of bisphenol A in food, 2009]

1.7.1 Probenvorbereitung

Die meisten analytischen Methoden erfordern vor der Bestimmung von BPA in einer komplexen Matrix die Abtrennung eben dieser. Feste Proben werden dazu meistens homogenisiert, flüssige Proben werden zumeist filtriert und/oder zentrifugiert, um Schwebstoffe zu entfernen.³¹ Für die anschließende Probenvorbereitung existieren diverse Methoden. Eine zentrale Rolle nehmen dabei verschiedene Extraktionsmethoden ein.

1.7.1.1 Flüssig-Fest und Flüssig-Flüssig Extraktion

Die Flüssig-Fest Extraktion ist die am häufigsten verwendete Methode zum Abtrennen der Matrix bei festen Proben. In der Regel werden unterschiedliche Methoden für unterschiedliche Probenmatrizes verwendet, es wurden jedoch auch Methoden entwickelt, die für eine Vielzahl von Matrizes einsetzbar sind.³² Als Lösungsmittel werden v.a. Acetonitril (ACN), aber auch Aceton, Methanol oder Ethanol eingesetzt, die alle in der Lage sind, BPA aus der Probe zu extrahieren. Bei flüssigen Proben kann die Flüssig-Flüssig Extraktion eingesetzt werden, sie spielt im Vergleich zur Festphasenextraktion (SPE) aber eine untergeordnete Rolle. Gebräuchliche Lösungsmittel zur Extraktion von BPA aus flüssigen Proben sind z.B. Ethylacetat, Chloroform oder Dichlormethan.

Die Probenmenge, die in der Regel für eine Lebensmittelextraktion zur Bestimmung von BPA benötigt wird, liegt zwischen 0,5 und 30 g. Ein Nachteil dieser Methoden ist, dass sie recht unspezifisch verschiedene lösliche Anteile aus der Probe extrahieren und somit zumeist ein zweiter Aufreinigungsschritt notwendig ist.³¹

1.7.1.2 Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion (engl. solid phase extraction, SPE) wird in der BPA-Analytik sowohl zur Extraktion von flüssigen Lebensmitteln als auch zur Aufreinigung von durch Flüssig-Fest Extraktion erhaltenen Extrakten verwendet. Dafür können sowohl nicht-selektive als auch selektive Sorptionsmittel eingesetzt werden. Die Retention eines Analyten an nicht-selektiven Sorptionsmitteln beruht auf unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Sorbens und Analyt. Bisphenol A ist ein polares Molekül, und es besteht die Möglichkeit der Ausprägung von Wasserstoffbrückenbindungen. Aus diesem Grund hat sich vor allem das Divinylbenzol/N-Vinylpyrrolidon Copolymer als Sorbens bewährt. Das N-Vinylpyrrolidon-Polymer agiert als Wasserstoff-Akzeptor, das relativ apolare Divinylbenzopolymer hält BPA bei Verwendung eines polaren Lösungsmittels (z.B. Wasser) zurück. Andere Sorptionsmittel, die für die Aufreinigung von BPA-hältigen Lösungen verwendet werden, sind z.B. C₁₈-verknüpfte Silikapartikel oder Florisil.³¹

1.7.1.3 Immunaффinitätschromatographie

Die Immunaффinitätschromatographie (IAC) ähnelt vom Funktionsprinzip der SPE. Als Sorbens werden an ein Trägermaterial immobilisierte Antikörper verwendet.

Die Immobilisierung von Antikörpern an ein Trägermaterial kann sowohl durch kovalente Bindung als auch durch Einschluss mittels der Sol-Gel Methode durchgeführt werden.^{31,33} Letztere ist in Abschnitt 3.4.3.1.1 genauer beschrieben.

Die Trennung von Analyt und Matrix erfolgt durch die Wechselwirkung der immobilisierten Antikörper mit dem Analyten. Die Verwendung von immobilisierten Antikörpern ist aufgrund der sehr spezifischen Bindung an den Analyten und der damit verbundenen sehr guten Abtrennung der Matrix besonders gut für komplexe Probenmatrizes wie z.B. Lebensmittel geeignet.

In der Literatur existieren mehrere IAC-Methoden für BPA, u.a. für Dosenfisch,³⁴ Wein,³⁵ verschiedene Getränke, Dosenfrüchte oder Dosengemüse als Probenmatrix.³⁶

Die Vor- und Nachteile der Verwendung von Antikörpern werden in Abschnitt 1.7.4 diskutiert.

1.7.2 Chromatographische Methoden

Nach der Abtrennung der Probenmatrix kann die BPA-Konzentration einer Probe bestimmt werden. Insbesondere chromatographische Methoden haben sich dafür etabliert.

1.7.2.1 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Die Bestimmung von BPA mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) wird vor allem mit C₁₈ Umkehrphasen-Säulen durchgeführt.³¹ Als mobile Phase wird in der Regel entweder eine Mischung aus Wasser und Methanol (bei massenspektrometrischer Detektion) oder eine Mischung aus Wasser und ACN verwendet.

Für BPA kommen mehrere Detektionsmethoden in Frage.

1.7.2.1.1 Fluoreszenzdetektion

Bisphenol A ist eine fluoreszierende Substanz mit Anregungsmaxima bei 220 nm sowie 275 nm und einem Emissionsmaximum bei 306 nm.³⁷ Daher bietet sich die Fluoreszenzmessung als sehr empfindliche und relativ spezifische Detektionsmethode zur Bestimmung von BPA an. Die Fluoreszenzdetektion wurde in mehreren publizierten Methoden in Kombination mit SPE oder IAC für die Bestimmung von BPA verwendet, die Nachweisgrenzen lagen dabei im BPA-Konzentrationsbereich

von 0,1–5 ng/g Lebensmittel.^{31,36,35,34,38}

1.7.2.1.2 Elektrochemische Detektion

Die phenolische Gruppe von Bisphenol A kann oxidiert werden, BPA ist daher „elektroaktiv“ und kann mittels elektrochemischer Detektion bestimmt werden. Auch für diese Detektionsart gibt es in der Literatur einige Beispiele.^{39,40} Dabei wurden in Seewasser mit bis zu 0,36 ng/l sehr niedrige Nachweisgrenzen erreicht.⁴⁰

1.7.2.1.3 Massenspektrometrische Detektion

Die Detektion mittels Massenspektrometrie (MS) hat den besonderen Vorteil, dass durch die Identifikation von Analyt-Molekülen eine sehr hohe Spezifität gegeben ist. Dadurch kann das benötigte Ausmaß der Probenvorbereitung reduziert werden.

Als Ionisierungsmethode wird überwiegend die Elektrospray-Ionisation (ESI) verwendet, dabei werden Nachweisgrenzen von ca. 0,1-50 ng/g Lebensmittel erreicht.³¹

1.7.2.2 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie (GC) wird in der Regel mit der MS-Detektion gekoppelt. Mittels GC-MS werden niedrige Nachweisgrenzen erreicht. Diese Methode hat aber auch Nachteile. So muss BPA bei manchen Methoden vor der Messung in einem relativ aufwendigen Arbeitsschritt derivatisiert werden. Außerdem muss bei Anwesenheit von Lipiden in der Probe eine sehr aufwendige Probenvorbereitung durchgeführt werden, um die Lipide vollständig aus der Probe zu entfernen, da diese bei der GC-MS Messung empfindlich stören.³¹

Als Ionisierungsmethode wird vor allem die Elektronenstoß-Ionisation (EI) verwendet. Mit Derivatisierung können so Nachweisgrenzen von bis zu 0,004 ng erreicht werden, ohne Derivatisierung liegen die Nachweisgrenzen im Bereich von ca. 1 ng.^{41,31}

1.7.3 Immunoassay

Immunoassays nutzen die Wechselwirkung zwischen dem Analyten und einem spezifisch an den Analyten bindenden Antikörper zur direkten quantitativen Analyse. Sie ermöglichen die Bestimmung von BPA in komplexen Probenmatrizes ohne bzw. mit sehr geringem Aufwand an Probenvorbereitung. Aufgrund der hohen

Geschwindigkeit und des damit verbundenen hohen Durchsatzes eignen sie sich besonders als Screeningmethoden.

1.7.3.1 Radioimmunoassay

Radioimmunoassays (RIA) basieren auf der Verwendung von Radionuklid-markierten Antikörpern. Aufgrund der sehr geringen Hintergrundsignale können niedrige Nachweisgrenzen erreicht werden. Allerdings erfordert das Arbeiten mit radioaktiven Substanzen auch ein geschultes Personal und speziell eingerichtete Laboratorien. Ein Beispiel für die Anwendung zur BPA-Bestimmung ist ein von Kaddar et al. entwickelter RIA, mit dem in Blutplasma eine Nachweisgrenze von 0,08 ng/ml erreicht wurde.⁴²

1.7.3.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Beim Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) wird zur Detektion eine enzymatische Reaktion genutzt. ELISAs sind sehr einfache, selektive und schnelle Methoden, sie teilen allerdings die Nachteile aller immunanalytischen Methoden, die in Abschnitt 1.7.4 diskutiert werden. Es wurden bereits einige ELISAs zur Bestimmung von BPA entwickelt. Dabei wurden Nachweisgrenzen zwischen ca. 0,03 und 1 ng/ml erreicht.^{43,44} Inzwischen existieren für die Bestimmung von BPA auch kommerziell erhältliche ELISA-Kits.⁴⁵

1.7.4 Betrachtung der Verwendung von Antikörpern

Wie beschrieben, sind Antikörper gut für die Anwendung zur Analyse von komplexen Probenmatrizes geeignet, da sie in der Lage sind, spezifisch Zielmoleküle zu binden. Für viele Analyten, auch für BPA, sind Antikörper kommerziell erhältlich (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Kommerziell erhältliche BPA-bindende Antikörper bei verschiedenen Herstellern

Hersteller	Art der Antikörper	verwendete Spezies
AbD Serotec	monoklonal	Hase
EMD Millipore	polyklonal	Maus
Abcam	monoklonal	Maus
Novus Biologicals	polyklonal	Hase

In der Analytik kommen zwei Arten von Antikörpern zum Einsatz:

- **Polyklonale Antikörper** werden direkt aus dem Serum eines immunisierten Tieres gewonnen, sie sind ein Gemisch vieler verschiedener Antikörper.
- Für die Erzeugung von **monoklonalen Antikörpern** werden B-Lymphozyten mit Myeloma-Zellen fusioniert. Anschließend werden diejenigen Hybridzellen ausgewählt und kultiviert, die den gewünschten Antikörper produzieren und in das Nährmedium abgeben. Aus letzterem wird der monoklonale Antikörper gewonnen. Bei einem monoklonalen Antikörper handelt es sich um einen einzigen, bestimmten Typ von Antikörper.

Die Verwendung von Antikörpern bringt jedoch auch einige Nachteile mit sich:

- Vor allem bei der Verwendung von polyklonalen Antikörpern kommt es oft zum Auftreten von Kreuzreaktivitäten, d.h. zur Bindung von Substanzen, die dem Analyten strukturell sehr ähnlich sind, was zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann.
- Antikörper, besonders monoklonale Antikörper, sind relativ teuer, da sie nicht chemisch synthetisiert werden können.
- Polyklonale Antikörper stehen nur in bestimmten Mengen zur Verfügung, sind sie aufgebraucht, muss ein weiteres Tier immunisiert werden. Die dann erhaltene Antikörper-Mischung entspricht aber nicht zu 100 % der zuvor verwendeten Mischung, was zu Problemen mit der Reproduzierbarkeit der analytischen Methoden führen kann.
- Antikörper sind chemisch nicht sehr stabil, somit ist man in der Wahl der chemischen Bedingungen (pH, Salzkonzentration) eingeschränkt, und die Handhabung der Antikörper ist nicht einfach.

1.7.5 Aptamere - eine Alternative zu Antikörpern?

Aptamere sind, wie später in Kapitel 3 ausführlich beschrieben, Oligonukleotide, die ebenfalls in der Lage sind, Zielmoleküle zu binden. Im Vergleich zu Antikörpern sind Aptamere relativ günstig, da sie - einmal entdeckt - chemisch synthetisiert werden können. Außerdem sind sie daher in unbegrenzten Mengen verfügbar, was sich auch positiv auf die Reproduzierbarkeit der analytischen Methoden auswirkt. Aptamere sind stabiler als Antikörper und daher einfacher in der Handhabung bzw. auch unter nicht-physiologischen Bedingungen verwendbar, und sie sind innerhalb weniger Minuten regenerierbar. Durch die Einführung von

negativ-Selektionsschritten während des SELEX-Prozesses (siehe Abschnitt 3.3) kann außerdem die Kreuzreaktivität, auch mit Substanzen, die dem Analyten sehr ähnlich sind, sehr gering gehalten werden.⁴⁶

2 Zielsetzung

Bisphenol A ist in vielen Verpackungsmaterialien enthalten und dementsprechend weit verbreitet. Migration aus den Kunststoffen bzw. Abbau derselben unter Freisetzung von BPA und die darauffolgende Aufnahme von BPA in den menschlichen Organismus führt zu gesundheitlichen Schädigungen. An der Aufklärung der verschiedenen Auswirkungen von BPA auf den menschlichen Organismus, insbesondere als Folge der Exposition gegenüber geringen Dosen, wird nach wie vor geforscht.

Sowohl für die Kontrolle der gesetzlich verankerten Grenzwerte für BPA als auch für die Aufklärung von Effekten der Exposition gegenüber BPA sind leistungsstarke analytische Methoden gefragt.

Zur Analyse von BPA-hältigen Proben existieren viele Methoden, die jedoch gewisse Schwächen haben. So muss bei vielen Methoden aufgrund der komplexen Probenmatrizes (Lebensmittel, biologische Proben) die Probe aufbereitet werden, was die Kosten und den Zeitaufwand der Analyse erhöht. Eine Möglichkeit der Probenvorbereitung sind immunanalytische Methoden wie z.B. die Immunaффinitätschromatographie. Andere immunanalytische Methoden wie z.B. ELISAs ermöglichen eine direkte Bestimmung der BPA-Konzentration ohne Probenvorbereitung. Die Verwendung von Antikörpern bringt jedoch Nachteile mit sich, die in Abschnitt 1.7.4 diskutiert wurden.

Aptamere sind eine mögliche Alternative zur Verwendung von Antikörpern in der Analytik. Es handelt sich hierbei um Nukleinsäuresequenzen, die in der Lage sind, Zielmoleküle mit ähnlichen Affinitäten wie Antikörper zu binden. Daher können auf Aptameren basierende Methoden entwickelt werden, die eine ähnliche Empfindlichkeit aufweisen wie immunanalytische Methoden. Die Vorteile der Verwendung von Aptameren anstatt von Antikörpern wurden in Abschnitt 1.7.5 diskutiert.

Im Jahr 2011 wurde ein Aptamer publiziert, das selektiv an Bisphenol A bindet.⁴⁷ Das Ziel dieser Masterarbeit war es, unter Verwendung dieses Aptamers Analysemethoden für BPA zu entwickeln. Es sollte sowohl eine chromatographische

Methode zur Probenvorbereitung als auch eine direkte Screeningmethode entwickelt werden.

3 Theoretischer Hintergrund: Aptamere

Aptamere sind kurze Nukleinsäuresequenzen, die in der Lage sind, Zielsubstanzen zu binden. In diesem Kapitel will ich zuerst kurz auf Nukleinsäuren eingehen und dann die Entdeckung, die Herstellung und die Anwendungsmöglichkeiten von Aptameren erklären.

3.1 Nukleinsäuren

Unter Nukleinsäuren versteht man im allgemeinen Ribonukleinsäuren (RNA) und Desoxyribonukleinsäuren (DNA) und deren Derivate. Nukleinsäuren bestehen aus einem Rückgrat aus Ribose- bzw. Desoxyriboseeinheiten, die durch Phosphatgruppen verbunden sind sowie Nukleobasen, die 1' mit den Ribose-Einheiten verknüpft sind. Nukleobasen sind Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T, bei DNA) bzw. Uracil (U, bei RNA). Nachdem sich A und T bzw. G und C durch Wasserstoffbrückenbindungen verbinden, bildet sich ein Doppelstrang in Helix-Form aus (Abbildung 8).

Die biologische Funktion der DNA ist v.a. die als Träger der Erbinformation über die Codierung von Proteinen. Die RNA hat verschiedene Funktionen, u.a. den Transport des Proteincodes zu den Ribosomen (mRNA), die Hilfe bei der Proteinsynthese (tRNA), oder auch katalytische Funktionen.

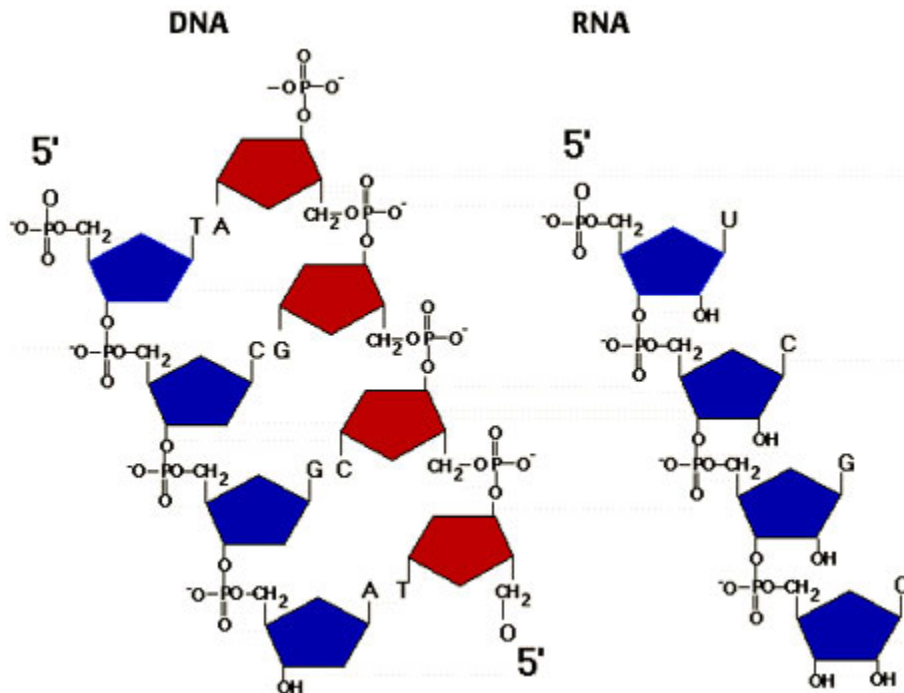


Abbildung 8: Struktur von DNA bzw. RNA [aus: Homepage des Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, University of Arizona, <http://www.biology.arizona.edu/biochemistry>]

3.2 Aptamere - Definition und Entdeckung

Unter Aptameren versteht man Nukleinsäuren, die aufgrund ihrer Faltung in der Lage sind, Zielmoleküle zu binden. Der Begriff „Aptamer“ wurde 1990 geprägt,⁴⁸ die ersten Vermutungen, dass RNA-Sequenzen biokatalytische Aktivitäten aufweisen könnten, und somit in der Lage sein müssten, Zielmoleküle zu binden, gab es allerdings schon in den 1960er Jahren. In den 1980er Jahren wurden einige RNA-Sequenzen identifiziert, die katalytisch aktiv waren, so war die Anwesenheit gewisser RNA-Fragmente essentiell bei bestimmten Umesterungen⁴⁹ oder Hydrolysen,⁵⁰ die in Zellen ablaufen.

Schwung in die Aptamer-Thematik kam aber erst mit der Entdeckung der Polymerase Kettenreaktion (PCR) von K. Mullis 1983 und der darauffolgenden Entwicklung des *in vitro* Selektionsprozesses SELEX 1990. SELEX ermöglichte es, gezielt nach an bestimmte Ziele bindende Nukleinsäuren zu suchen, und diese zu amplifizieren. Auf diese Weise wurden sowohl RNA- als auch DNA-Aptamere für

verschiedenste Analyten entwickelt.

3.3 SELEX - *in vitro* Selektion

SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) ist ein Prozess zur Selektion, Aufreinigung und Vervielfältigung von an eine Zielsubstanz („target“) bindenden Nukleinsäuren. Der Begriff wurde 1990 von Tuerk und Gold geprägt, die den Prozess zugleich, aber unabhängig voneinander, mit Ellington und Szostak entwickelten.^{51,52}

SELEX wird in mehreren Zyklen durchgeführt, wobei jeder Zyklus folgende Arbeitsschritte enthält (siehe Abbildung 9):

1. Selektion: Eine RNA- bzw. DNA-„Bibliothek“ wird mit der immobilisierten Zielsubstanz inkubiert, es kommt zur Bindung einzelner Nukleotidsequenzen.
2. Separation: Durch Waschen werden nicht gebundene Nukleotide entfernt.
3. Elution: Durch Änderung des Lösungsmittels werden gebundene Nukleotide wieder in Lösung gebracht.
4. Amplifikation: Die Nukleinsäuren werden mittels PCR amplifiziert.
5. Reinigung: Abtrennung der Komplementärstränge bzw. Transkription und Reinigung der relevanten DNA/RNA-Stränge.

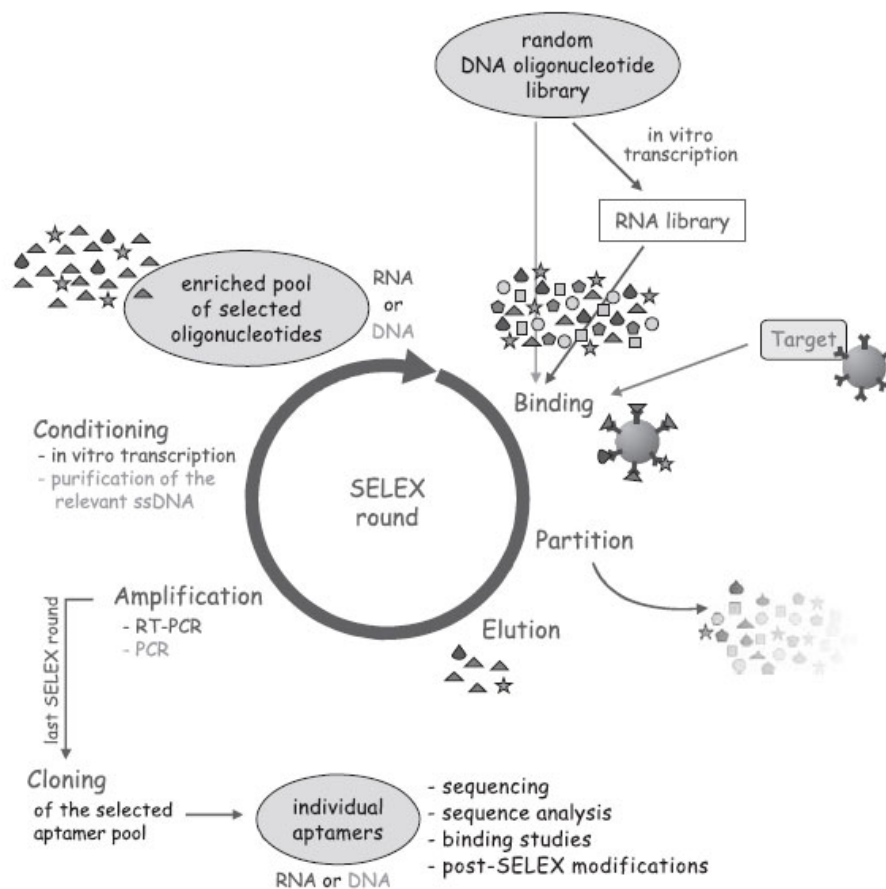


Abbildung 9: Der Selex-Prozess [aus Mascini: Aptamers in Bioanalysis, 2009]

3.3.1 Design der Bibliothek

Ein vorgelagerter Schritt im SELEX-Prozess ist die Herstellung einer Bibliothek aus zufällig generierten einzelsträngigen Oligonukleotiden. Da während des Selektionsprozesses mehrmals eine Amplifikation mittels PCR durchgeführt wird, müssen alle Oligonukleotide terminal konstante Sequenzen aufweisen. Die in der PCR eingesetzten Primer binden dementsprechend am 3'-Ende der Nukleotide (Primer_B) bzw. am 3'-Ende der Komplementärstränge (Primer_F). Primer_F entspricht also dem 5'-Ende der Nukleotide der Bibliothek. In der Mitte der Nukleotide befindet sich die variante Region. Sie wird als NX bezeichnet, wobei X die Zahl der zufälligen Basen ist.

Die Länge der Library-Nukleotide ist von entscheidender Bedeutung. Längere Nu-

kleotide sind in der Lage, komplexere Strukturen auszubilden, die möglicherweise besser an das Zielmolekül binden könnten. Auch ist die Zahl der möglichen unterschiedlichen Nukleotide höher, sie steigt mit jeder zusätzlichen Base um den Faktor vier. Andererseits wird die Synthese von Nukleotiden, aber auch die Identifizierung der Aptamere nach dem Durchlaufen des SELEX-Prozesses, mit zunehmender Basenzahl aufwendiger. Daher werden meistens Nukleotidbanken zwischen N30 und N70 verwendet.⁵³

3.3.2 Selektion der Nukleinsäuren

Zunächst wird das Zielmolekül immobilisiert, wofür abhängig von den chemischen Eigenschaften des Zielmoleküls eine Vielzahl verschiedener Methoden zum Einsatz kommen kann. Die Bibliothek wird nun unter bestimmten Bedingungen (definierter Puffer, Salzkonzentrationen) mit der immobilisierten Zielsubstanz inkubiert. Jene Nukleinsäuren, die an das Zielmolekül binden, bleiben haften. Die Diversität der möglichen Zielsubstanzen ist sehr groß, so wurden Aptamere sowohl für kleine Moleküle (z.B. Kohlenhydrate, Aminosäuren, Cofaktoren) als auch für große Moleküle (z.B. Proteine, Nukleinsäuren) entwickelt.⁵⁴ Die Wahl der richtigen Pufferbedingungen ist von großer Bedeutung für den Erfolg des Selektionsschritts. Der pH-Wert sollte im neutralen Bereich liegen, da dies für die Faltung der Aptamere optimal ist.⁵⁵ Soll das Aptamer therapeutisch angewendet werden, empfiehlt sich die Selektion bei physiologischem pH (ca. 7,4). Außerdem werden dem Bindungspuffer in der Regel bivalente Kationen (z.B. Magnesiumsalze) zugegeben, da diese für die korrekte Faltung der Nukleinsäuren benötigt werden.⁵⁶

3.3.3 Separation und Elution

Nach dem Selektionsprozess wird das Trägermaterial mit Bindungspuffer gewaschen, wobei die Nukleinsäuren, die an das Zielmolekül binden, haften bleiben, während Nukleinsäuren, die nicht oder nur schwach binden, entfernt werden. Anschließend werden die verbliebenen, an das „target“ gebundenen Nukleinsäuren eluiert.

3.3.4 Amplifikation der Aptamere

Im nächsten Schritt werden die Nukleinsäuren mittels PCR vervielfältigt. Wurde eine RNA-Bibliothek verwendet, muss die RNA zuerst in DNA „übersetzt“ werden, was durch Zugabe des Enzyms Reverse Transkriptase erreicht wird.

Die PCR wird anschließend mit Primern durchgeführt, die jeweils im ident codierten Teil der Bibliothek lokalisiert sind, um eine Vervielfältigung aller gebundenen Nukleinsäuren zu garantieren. Da nur der Ligand-bindende DNA-Strang benötigt wird, und der Komplementärstrang später entfernt werden muss, kommt vor allem die asymmetrische PCR zum Einsatz, eine spezielle Form der PCR, bei welcher der an den Ligand-bindenden Einzelstrang bindende Primer im Überschuss zugesetzt wird. Das führt dazu, dass, sobald der Primer für den Komplementärstrang aufgebraucht ist, nur mehr der benötigte Strang amplifiziert wird. Allerdings steigt die DNA-Konzentration dann nicht mehr so schnell, daher müssen im Vergleich zur herkömmlichen PCR mehr Zyklen durchgeführt werden.

Eine synthetische DNA-Bibliothek kann aus bis zu 10^{16} verschiedenen Nukleinsäuren bestehen, weit weniger, als theoretisch möglich wären. Daher können während der PCR optional auch Mutationen induziert werden, um diese Diversität zu erhöhen. Man spricht dann auch von „mutagener PCR“. Dazu wird eine spezielle fehleranfällige Polymerase verwendet.⁵⁴

Wurde der Selektionsschritt mit einer DNA-Bibliothek durchgeführt, müssen nach der Amplifikation die Komplementärstränge entfernt werden. Dazu wird die doppelsträngige DNA denaturiert, die Einzelstränge werden, z.B. mittels Gelelektrophorese, aufgetrennt und die gewünschten DNA-Einzelstränge werden für den nächsten SELEX-Zyklus verwendet.

Wurde mit einer RNA-Bibliothek gearbeitet, werden die bei der PCR produzierten DNA-Fragmente nach Denaturierung der Doppelstränge wieder in RNA umgewandelt, was *in vitro* mit Hilfe des Enzyms RNA-Polymerase durchgeführt wird. Durch Verwendung spezifischer Primer für den erwünschten Strang wird nur dieser transkribiert, danach wird die RNA von der DNA getrennt und die RNA wird als Bibliothek für den nächsten SELEX-Zyklus verwendet.⁴⁶

3.3.5 Zyklen

Die oben beschriebenen Schritte werden 8-15 Mal wiederholt, wobei die Bindungsbedingungen etwas geändert werden können, um am Ende die Aptamere

mit der höchsten Bindungsaffinität unter verschiedenen Bedingungen zu erhalten. Üblicherweise wird mit sehr „sanften“ Bedingungen begonnen, die von Zyklus zu Zyklus „stringenter“ werden.⁵⁴

3.3.6 SELEX-Modifikationen

In jüngerer Vergangenheit wurden verschiedene Sonderformen des SELEX-Prozesses entwickelt,⁴⁶ die unter anderem eine negativ-Selektion, die Unterscheidung von sehr ähnlichen Strukturen, Aptamere mit mehr als einer Funktion u.v.m. ermöglicht (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Verschiedene SELEX-Modifikationen (Auswahl)

Methode	Zweck der Methode	Durchführung
Negativ-SELEX	Minimierung der Koselektion unerwünschter Liganden	Vorselektion mit unerwünschten Liganden, Entfernung der an diese Liganden bindenden Nukleinsäuren
Subtraktions-SELEX	Aptamere binden nicht an ähnliche Strukturen	Selektionsschritt mit Zielmolekül-ähnlichen Liganden, Entfernung von Nukleinsäuren, die an diese Liganden binden
Chimärischer SELEX	Produktion von Aptameren mit mehr als einer Funktion	Verwendung zweier Bibliotheken, SELEX mit mehreren erwünschten Liganden, anschließend Verschmelzung der Nukleinsäuren zu einem chimärischem Aptamer
gemischter (engl. „blended“) SELEX	Einführung von zusätzlichen chemischen Eigenschaften, die nicht auf der Bindung an ein Target basieren	Verbindung anderer chemischer Strukturen mit den Nukleinsäuren
Genomischer SELEX	Identifizierung von bedeutenden Nukleinsäure-Interaktionen	Konstruktion der DNA/RNA-Bibliothek aus dem Genom eines Organismus
Zell-SELEX	Erzeugung von Zell-bindenden Aptameren	SELEX mit Zellen als Liganden, Subtraktion von an andere Zellen bindenden Aptameren

3.4 Anwendungen von Aptameren

3.4.1 Einsatz als Katalysatoren

Ein Einsatzgebiet von Aptameren ist die Anwendung als Katalysatoren in der Synthesechemie. Katalytisch wirksame Aptamere werden auch als „Aptazyme“ bezeichnet, es handelt sich meistens um RNA-Aptamere („Ribozyme“). Aptazy-

me sind in der Lage, eine Vielzahl unterschiedlicher chemischer Reaktionen zu katalysieren, wie z.B. Acylierungen, Diels-Alder Reaktionen, Bildung von Amid-Bindungen, Phosphorylierungen (u.a. auch RNA-Ligation), u.v.m.⁵⁷

3.4.2 Einsatz in der Medizin

Protein-bindende Aptamere können aufgrund ihrer hohen Spezifität sowohl als Marker als auch als Therapeutika eingesetzt werden. Sie haben das Potential, monoklonalen Antikörpern in der Medizin den Rang abzulaufen. Ein Problem beim *in vivo* Einsatz von Aptameren ist allerdings, dass sie anfällig auf die Nuklease-katalysierte Hydrolyse sind. Nukleasen sind in Organismen ubiquitär verbreitet, deshalb werden unmodifizierte Aptamere sehr schnell abgebaut.

Um sie gegen Nukleasen zu stabilisieren, wurden mehrere wirksame Modifikationen entwickelt, die die Halbwertszeit im Organismus drastisch verlängern. Ein Beispiel dafür ist das „3'-capping“, bei dem das 3'-Ende des Aptamers modifiziert wird, um die Erkennung durch 3'→5' spaltende Endonukleasen zu verhindern. Gebräuchliche 3'-Modifikationen sind invertiertes Thymidin (3'-idT) oder auch Biotin.

Eine weitere Möglichkeit, ein Aptamer für den *in vivo* Einsatz zu stabilisieren, sind 2'-Modifikationen des Nukleinsäure-Rückgrats. Da Modifikationen des Rückgrats aber meist das Faltungsverhalten des Aptamers und somit auch die Bindungsaffinität zum Target verändern, werden diese Modifikationen bereits vor dem SELEX-Prozess eingeführt. Das bedeutet, dass sowohl die Nukleinsäuren der Bibliothek als auch die PCR-Pools aus bereits modifizierten Nukleotiden bestehen müssen. Gebräuchlich ist unter anderem die Verwendung von 2'-Ribo, 2'-Fluoro, 2'-O-Methyl oder 2'-Amino Modifikationen.

Nachdem auch 5'→3' spaltende Nukleasen eine - wenn auch untergeordnete - Rolle beim Nukleinsäureabbau spielen, erhöhen auch 5'-Modifikationen die Stabilität der Aptamere. Bedeutend sind hier vor allem Phosphoramidite. Für viele Anwendungen muss das Aptamer jedoch ohnehin mit Proteinen bzw. Peptiden verknüpft werden, was in der Regel 5'-terminal geschieht, und als zusätzliche Wirkung auch die *in vivo*-Stabilität erhöht.^{58,59}

Die Entwicklung von Serum-stabilen Aptameren dauert in der Regel ca. 9-14 Monate⁵⁹ (siehe Abbildung 10).

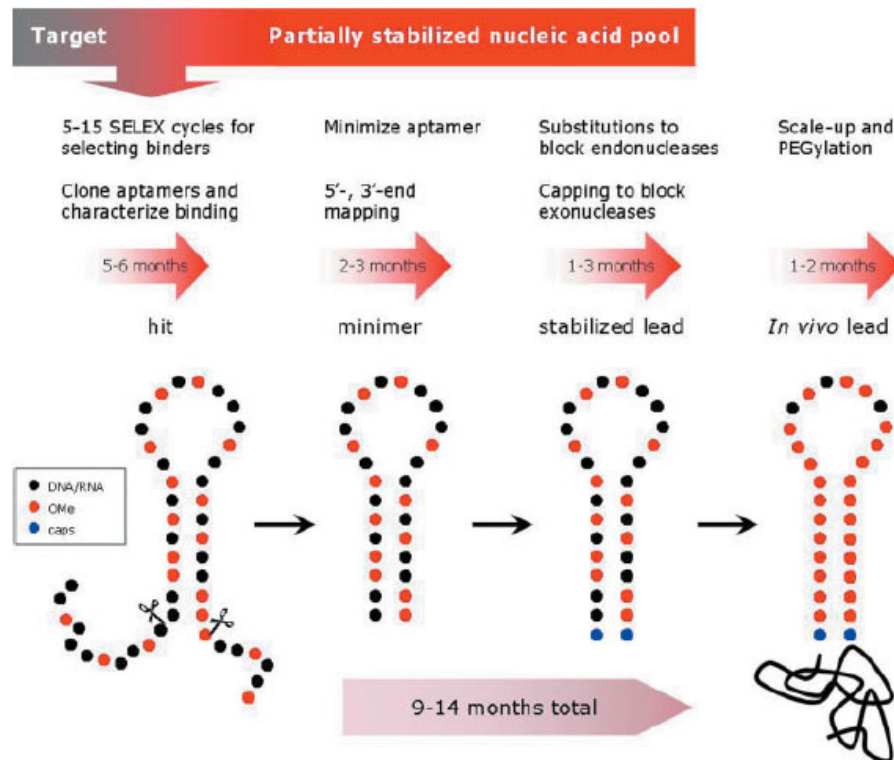


Abbildung 10: Prozess und benötigte Zeit zur Herstellung eines Serum-stabilen Aptamers [aus: Klussmann, 2006, The Aptamer Handbook]

3.4.2.1 Anwendung als Marker für SPECT und PET

Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT) und Positronen-Emissions-Tomographie (PET) sind bildgebende medizinisch-diagnostische Verfahren. Während bei der herkömmlichen Computertomographie (CT) nur ein Kontrastmittel verwendet wird, wird bei SPECT und PET eine schwach radioaktive Substanz (Radiopharmakon oder auch Tracer genannt) verabreicht. Je nach Art der radioaktiv markierten Substanz kommt es zur Verwendung bzw. Ablagerung in verschiedenen Körperteilen. So können beispielsweise Tumore erkannt werden, aber auch Stoffwechselfunktionen sichtbar gemacht werden. Besonders vielversprechend ist die Kombination von PET/SPECT mit der CT (siehe Abbildung 11).

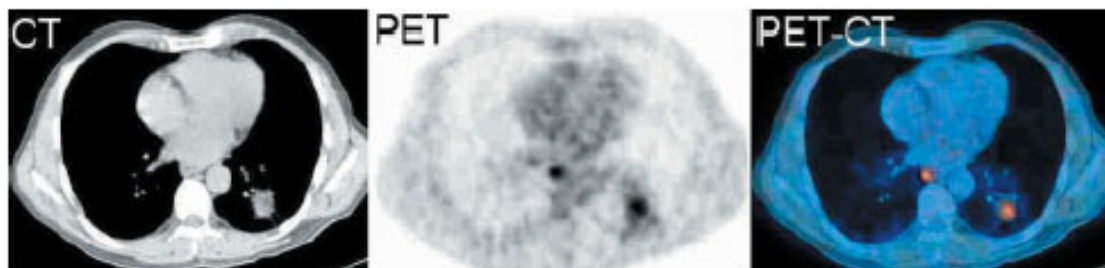


Abbildung 11: Erhöhung der Aussagekraft des diagnostischen Verfahrens durch Kombination von PET und CT (Beispiel Lungentumore)[aus: Klusmann, 2006, The Aptamer Handbook]

Neben der Verwendung von radioaktiv markierten Substanzen, die an bestimmten Stellen des Organismus aufgenommen werden, kommen auch markierte, an der gewünschten Markierungsstelle bindende Antikörper zum Einsatz, die z.B. gegen Proteinprodukte von Tumorzellen gerichtet sind. Nachteile sind allerdings die hohe *in vivo* Stabilität von Antikörpern und die damit verbundenen niedrigen Dosen, in denen diese eingesetzt werden können.

Aptamere sind eine vielversprechende Alternative für den Einsatz als Radiopharmaka. Sie können sehr spezifisch gegen gewünschte Proteine gerichtet werden, und ihre Verstoffwechselung und die damit verbundene Exkretion der Radionuklide ist aufgrund von Nukleasen sehr schnell, was die radioaktive Exposition des Patienten erniedrigt. Durch ihre geringere Größe können sie schneller in Gewebe und Organe diffundieren, was zu einer schnelleren Bindung und damit auch zu verringerten Wartezeiten vor der Messung führt. Auch lösen Aptamere keine Immunabwehr aus, was *in vivo* ein pharmakologischer Vorteil gegenüber Antikörpern ist.⁶⁰

3.4.2.2 Therapeutische Anwendung

Aufgrund der spezifischen Bindung an Zielmoleküle kommen Aptamere - ähnlich wie monoklonale Antikörper - auch für therapeutische Anwendungen in Frage. Aptamere können so entwickelt werden, dass sie spezifisch an aktive Zentren von Enzymen bzw. an Bindungsdomänen von Rezeptoren und Rezeptor-Liganden binden, und somit inhibitorisch wirken. Ein Beispiel dafür ist das von Pfizer hergestellte Medikament MacugenTM (Wirkstoff Pegaptanib, Abbildung 12), das erste Aptamer, das 2004 von der US Food and Drug Administration (FDA) als Medikament zugelassen wurde. Pegaptanib ist ein modifiziertes RNA-Aptamer, das an das Signalmolekül „Vascular endothelial growth factor“-A₁₆₅ (VEGF-A₁₆₅) bindet

und somit die Bindung an den VEGF-Rezeptor inhibiert. VEGF-A₁₆₅ spielt eine Rolle bei der Altersbedingten Makuladegeneration (AMD), einer häufigen Augen-erkrankung. MacugenTM wird zur Behandlung eben dieser eingesetzt.^{59,61}

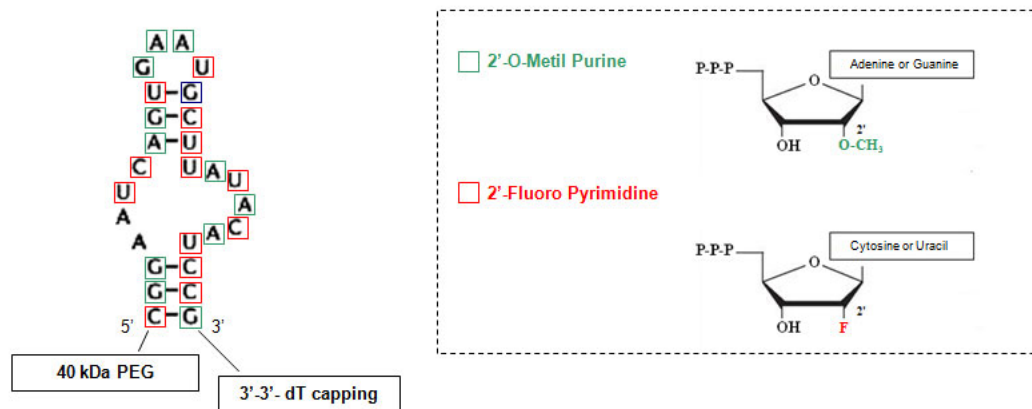


Abbildung 12: Sequenz und Sekundärstruktur von Pegaptanib [aus: Esposito et al., 2011, New Insight into Clinical Development of Nucleic Acid Aptamers]

Eine weitere mögliche Wirkungsweise therapeutischer Aptamere ist der Transport von zuvor synthetisch verknüpften Zytotoxinen zu spezifisch erkannten, erkrankten Zellen. Dafür müssen Aptamere an Bestandteile der Zelloberfläche der Zielzellen binden. Dieses Gebiet ist vor allem für die Krebsforschung hoch interessant, zugelassene therapeutische Aptamere mit dieser Wirkungsweise gibt es jedoch noch keine.

Aber auch eine intrazelluläre Anwendung von Aptameren ist denkbar, da diese in der Lage sind, sich auch im Zellinneren korrekt zu falten und somit ihre Bindungsaffinität zu erhalten.⁵⁹

3.4.3 Anwendungen in der Analytik

Die Anwendung von Antikörpern ist in der analytischen Chemie weit verbreitet, sowohl in direkten Methoden (ELISA, Immunsensoren) als auch zur Probenvorbereitung bzw. -aufreinigung. Die Verwendung von Antikörpern bringt jedoch auch einige Nachteile mit sich. So sind Antikörper relativ teuer, sie sind nicht sonderlich stabil und daher nicht einfach in der Handhabung und einmal denaturiert dauert es lange, sie zu regenerieren. Außerdem zeigen sie oft ein erhebliches Maß an Kreuzreaktivität für andere, dem Analyten strukturell sehr ähnliche Substanzen.

Die Vorteile von Aptameren im Vergleich zu Antikörpern, die in Abschnitt 1.7.5 beschrieben wurden, erklären, warum in den letzten Jahren viele der immunanalytischen Methoden so verändert wurden, dass anstatt von Antikörpern Aptamere implementiert wurden. Diese Adaption der Methoden ist oft recht unkompliziert. Beispiele dafür sind die Aptamer-Affinitätschromatographie, Enzyme-linked Aptamer Assays (ELAAs) oder auch Aptamer-Affinitätssensoren.

In der Analytik werden meist DNA-Aptamere verwendet, da diese wesentlich stabiler als RNA-Aptamere sind und ihre Handhabung daher weniger aufwendig ist. Für viele Analyten wurden bereits Aptamere entwickelt, deren Bindungsaffinität durchaus mit der Affinität von Antikörpern ($K_D = \sim 10^{-5} - 10^{-10}$ M) vergleichbar ist (Tabelle 4).

Tabelle 4: Aptamere und zugehörige Dissoziationskonstanten für einige Analyten

Analyt	K_D[mol/l]
Ochratoxin A ⁶²	$0,36 \cdot 10^{-6}$
Kokain ⁶³	$2,0 \cdot 10^{-5}$
Bisphenol A ⁴⁷	$8,3 \cdot 10^{-9}$
Theophyllin (bzw. Coffein) ⁶⁴	$2,5 \cdot 10^{-6}$

3.4.3.1 Aptamer-Affinitätschromatographie

Im Gegensatz zur IAC werden bei der Aptamer-Affinitätschromatographie Aptamere statt Antikörper an dem Trägermaterial immobilisiert und dienen als stationäre Phase. Die mobile Phase, die die Probe mit dem gelösten Analyten enthält, passiert die stationäre Phase, wobei der Analyt durch Aptamer-Analyt-Wechselwirkungen zurückgehalten wird. Durch Änderung der Laufmittelzusammensetzung (Verringerung der Polarität) wird der Analyt eluiert. Die Vorteile der Verwendung von Aptameren liegen in der Möglichkeit, harschere Elutionsbedingungen zu verwenden, der schnelleren Regenerierung der Säule sowie der geringeren Größe von Aptameren, die bewirkt, dass das Trägermaterial dichter mit Liganden beladen werden kann, was wiederum die Säulenkapazität erhöht bzw. wichtig für Miniaturisierungen ist.⁶⁵

Für die Immobilisierung von Aptameren an Trägermaterialien kommen ähnliche Methoden in Frage wie bei Immunaффinitätssäulen, wie z.B. Sol-Gel-Verfahren, die kovalente Immobilisierung oder die Immobilisierung durch die Avidin-Biotin Wech-

selwirkung.

3.4.3.1.1 Sol-Gel Methode

Die Sol-Gel Methode ist ein Einschlussverfahren, das zur Immobilisierung unterschiedlichster Verbindungen genutzt werden kann. Ein Präkursor, in der Regel Tetramethylorthosilikat (TMOS, Abbildung 13) oder Tetraethylorthosilikat (TEOS), wird mit Wasser und Säure versetzt. Durch Hydrolyse und anschließende Polykondensation entsteht zuerst ein Sol und schließlich ein Gel, wobei Poren zurückbleiben, in denen Moleküle eingeschlossen werden können (siehe Abbildung 14). Je länger man die Reaktion ablaufen lässt, desto kleiner werden diese Poren. Die Reaktionszeit (bzw. der Massenverlust des Gels durch Verdampfen des bei der Kondensation entstehenden Wassers) muss so gewählt werden, dass die Poren klein genug sind, um das Zielmolekül einzuschließen, aber groß genug, dass eine Wechselwirkung mit dem Analyt möglich ist.³³ Der große Vorteil der Sol-Gel Methode ist, dass das immobilisierte Molekül dabei chemisch nicht verändert wird, während bei Methoden, die auf kovalenter Bindung von Molekülen an ein Trägermaterial basieren, die Gefahr besteht, dass durch die chemische Modifikation die Bindungsaffinität zum Ligand beeinträchtigt wird.

Die Sol-Gel Methode eignet sich auch zum Einschluss von Aptameren, so sind in der Literatur einige Beispiele für diese Anwendung bekannt,⁶⁶ und auch die Entdecker des im Rahmen dieser Masterarbeit verwendeten BPA-bindenden Aptamers immobilisierten das Aptamer mit diesem Verfahren.⁴⁷

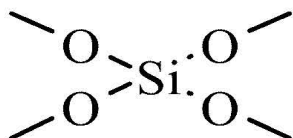
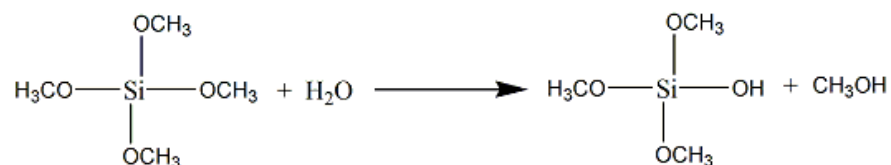


Abbildung 13: Strukturformel von TMOS

I. Hydrolyse des Präkursors:



II. Kondensation:

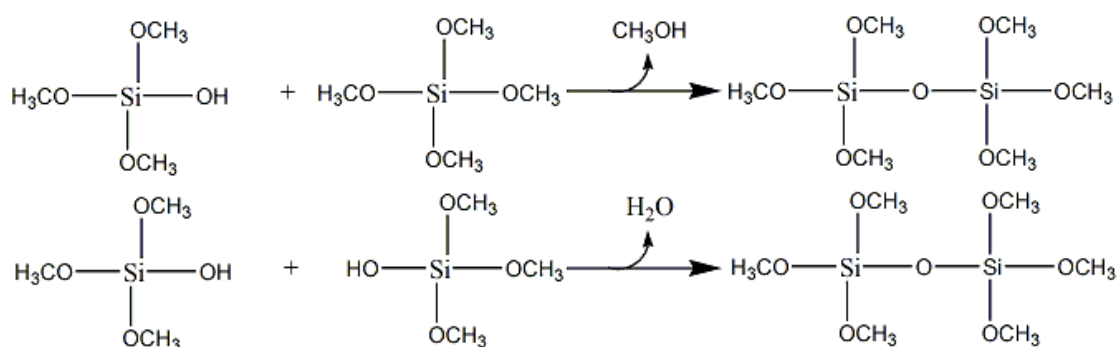


Abbildung 14: Mechanismus der Sol-Gel Bildung durch Hydrolyse und Polykondensation

3.4.3.1.2 Kovalente Immobilisierung

Eine weitere Möglichkeit zur Immobilisierung ist die kovalente Bindung des Aptamers an ein Säulenmaterial. Dies geschieht durch Veresterung von Phosphatgruppen mit am Säulenmaterial gebundenen Aminen, wie z.B. Diamino-Dipropylamin (DADPA). Dafür wird als Reagenz 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) verwendet (Abbildung 15). Zur Veresterung von DNA wird im Allgemeinen eine 5'-Phosphat-Modifizierung empfohlen, es gibt aber auch Beispiele in der Literatur, in denen die kovalente Immobilisierung von Aptameren durch interne Phosphatgruppen beschrieben wird.⁶⁷

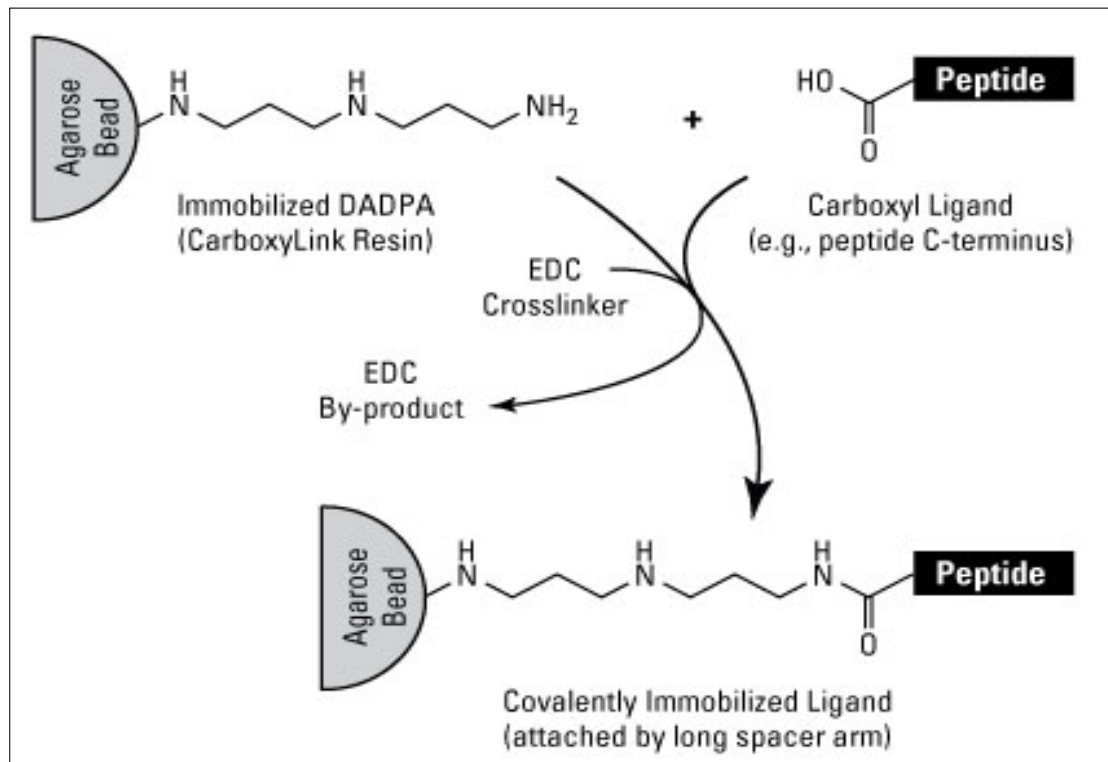


Abbildung 15: Mechanismus der kovalenten Immobilisierung, hier am Beispiel der Immobilisierung eines Peptids. Der gezeigte Mechanismus funktioniert auch mit DNA. [aus: FischerScientific CarboxyLink Manual]

3.4.3.1.3 Immobilisierung durch die Avidin-Biotin Wechselwirkung

Die starke Wechselwirkung zwischen Avidin und Biotin kann auch zur Immobilisierung von Aptameren genutzt werden. Dazu werden Aptamere am 5'-Ende mit Biotin verknüpft („biotinyliert“). Auf dem Trägermaterial wird zuvor Avidin oder Streptavidin gebunden, danach wird es mit dem biotinylierten Aptamer inkubiert, wodurch das Aptamer gebunden wird. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass die Gefahr der Beeinflussung der Faltung und somit der Beeinträchtigung der Bindungsaffinität der Aptamere im Gegensatz zur kovalenten Immobilisierung de facto nicht gegeben ist.

3.4.3.2 Enzyme-linked Aptamer Assay (ELAA)

Der ELAA ist eine dem ELISA nachempfundene selektive Analysenmethode. Je nach Art des Kompetitionsschritts unterscheidet man zwischen direkt-kompetitiven

und indirekt-kompetitiven Tests (siehe Abbildung 16).

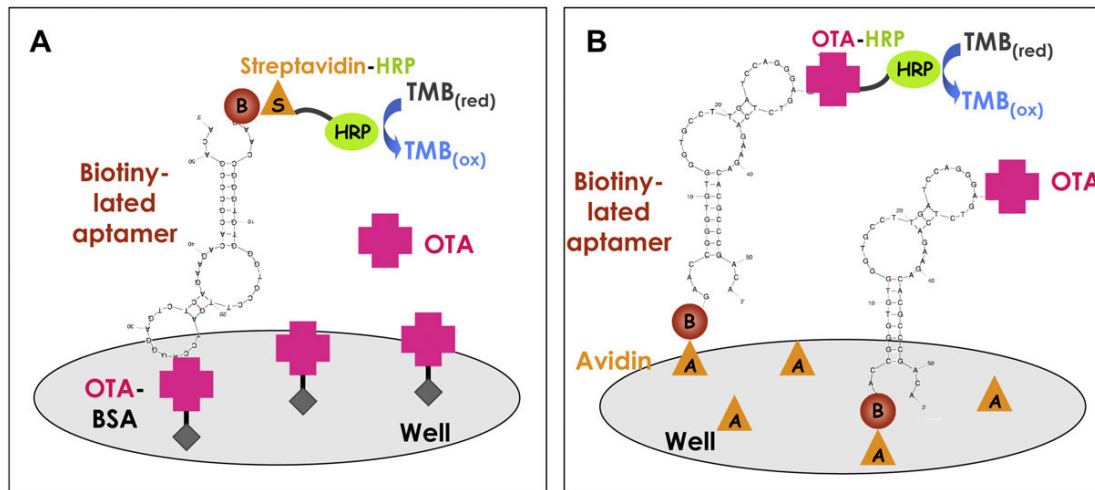


Abbildung 16: Mechanismus des indirekt-kompetitiven (A) bzw. des direkt-kompetitiven (B) ELAA anhand von Ochratoxin A (OTA) als Beispiel. [aus Barthelmebs et al., 2011: Enzyme-linked Aptamer Assays (ELAAs), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of Ochratoxin A in wine]

3.4.3.2.1 Direkt-kompetitiver ELAA

Der erste Schritt bei der Durchführung eines direkt-kompetitiven ELAA ist die Modifikation einer Mikrotiterplatte mit Avidin oder Streptavidin. Nach Blocken der freien Bindungsplätze der Platte mit einer Proteinlösung (zur Verhinderung von unspezifischen Bindungen an die Platte) wird das 5'-Biotin-modifizierte Aptamer zugegeben. Aufgrund der starken Wechselwirkung zwischen Biotin und Avidin bzw. Streptavidin wird das Aptamer an der Platte immobilisiert. Nun wird der Wettbewerbsschritt durchgeführt. In die Wells der Platte wird einerseits ein Standard bzw. eine Probe, andererseits ein Analyt-HRP (Meerrettichperoxidase, engl. horseradish peroxidase) Konjugat zugegeben. Analyt und Analyt-HRP Konjugat konkurrieren um die im Überschuss vorliegenden Aptamer-Bindungsplätze, je mehr Analyt in der Probe (bzw. im Standard) ist, desto weniger Analyt-HRP Konjugat kann gebunden werden. Nach Waschen der Platte wird ein Substrat aus 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und H_2O_2 zugegeben. HRP katalysiert die Oxidation von TMB zum Tetramethylbenzidin-Diimin, einem intensiv blau gefärbten Stoff. Durch Zugabe von Säure wird diese Reaktion gestoppt, unter Verwendung von Schwefelsäure bildet sich ein stabiler, gelb gefärbter Komplex. Die

bei 450 nm gemessene Extinktion ist direkt proportional zur HRP-Konzentration und somit indirekt-proportional zur Analyt-Konzentration in der Probe.⁶⁸

Das verwendete Analyt-HRP Konjugat ist in der Regel nicht kommerziell erhältlich und muss daher vor der Ausführung synthetisiert werden.

3.4.3.2.2 Indirekt-kompetitiver ELAA

Beim indirekt-kompetitiven ELAA wird der Analyt an der Mikrotiterplatte immobilisiert („Coating“-Schritt). Dazu wird die Platte mit einer Lösung von Analyt-Protein Konjugat (z.B. mit Albumin) in Carbonatpuffer über Nacht inkubiert, wobei das Konjugat von der Kunststoff-Oberfläche der Mikrotiterplatten adsorbiert wird. Nach Blocken mit einer Proteinlösung werden das Aptamer sowie die Probe zugegeben und der freie Analyt konkurriert mit dem immobilisierten Analyt um das Aptamer. Je höher die Konzentration des Analyten in der Probe ist, desto weniger Aptamer wird an der Platte gebunden. Nach Waschen der Platte wird ein Konjugat aus Avidin/Streptavidin und HRP zugegeben, welches an das gebundene Biotin-modifizierte Aptamer bindet. Dann wird wie im direkt-kompetitiven Assay Substrat zugegeben, die Farbreaktion abgewartet, die Reaktion mit Schwefelsäure gestoppt und die Extinktion gemessen.⁶⁸

3.4.3.3 Anwendung von Aptameren als Molecular Beacons

Molecular Beacons sind auf der Fluoreszenz basierende DNA-Sonden, die vor allem in der quantitativen Real-time PCR zum Einsatz kommen.

Bei der Adaptierung von Aptameren für Molecular Beacons wird das Analyt-bindende Aptamer 3' und 5' mit komplementären Nukleotiden verknüpft, und bildet bei Abwesenheit des Analyten eine sogenannte „Stamm-Schleifen-Struktur“ aus. Am 3' und 5' Ende sind zusätzlich je ein Fluorophor bzw. ein „Quencher“ (Fluoreszenz-absorbierende Gruppe) angehängt. Durch die Stamm-Schleifen-Struktur sind Fluorophor und Quencher in unmittelbarer Nähe zueinander. Kommt es zur Bindung eines Analyten, verändert sich die Konformation des Aptamers und die Distanz zwischen Fluorophor und Quencher ändert sich, wodurch Fluoreszenzstrahlung emittiert wird, die detektiert werden kann.⁶⁹

3.4.3.4 Aptamer-Affinitätssensoren

Eine weitere Möglichkeit, Aptamere für die Analytik zu nutzen, ist die Herstellung von Sensoren durch Immobilisierung von Aptameren. Solche Sensoren werden auch als „Aptasensoren“ bezeichnet. Auf diesem Gebiet gab es eine Vielzahl von Entwicklungen, darunter elektrochemische, Fluoreszenz-basierende oder auch massensensitive Sensoren.

3.4.3.4.1 Elektrochemische Aptasensoren

Elektrochemische Sensoren auf Aptamer-Basis sind genaugenommen eine Weiterentwicklung von DNA-sensitiven elektrochemischen Sensoren. Bei diesen wird ein mit einem Redox-Element markiertes DNA-Stück auf einer Elektrode immobilisiert, und zwar so, dass sich das Redox-Element in einer wegstehenden DNA-Schleife befindet. Durch die relative Nähe des Redox-Elements zur Elektrode kommt es im nativen Zustand zur Übertragung von Elektronen und damit zu einem elektrischen Signal. Wird der Komplementärstrang der immobilisierten DNA erkannt, kommt es durch die Bindung des Strangs zur Strukturänderung mit der Folge, dass das Redox-Element der DNA nun zu weit von der Elektrode entfernt ist, um ein Signal auszulösen, daher fällt dieses bei Anwesenheit des Analyten ab. Dieses Prinzip ist auch auf Aptamere anwendbar, indem Aptamere in der Analyt-bindenden Region Redox-markiert werden. Kommt es zur Bindung des Analyten, verändert sich die räumliche Struktur des Aptamers, wodurch das elektrische Signal abfällt.⁷⁰ So ein Sensor wurde z.B. für die Bestimmung des Proteins Thrombin in Serum entwickelt, die Nachweisgrenze war dabei ca. 20 nM⁷¹ (siehe Abbildung 17).

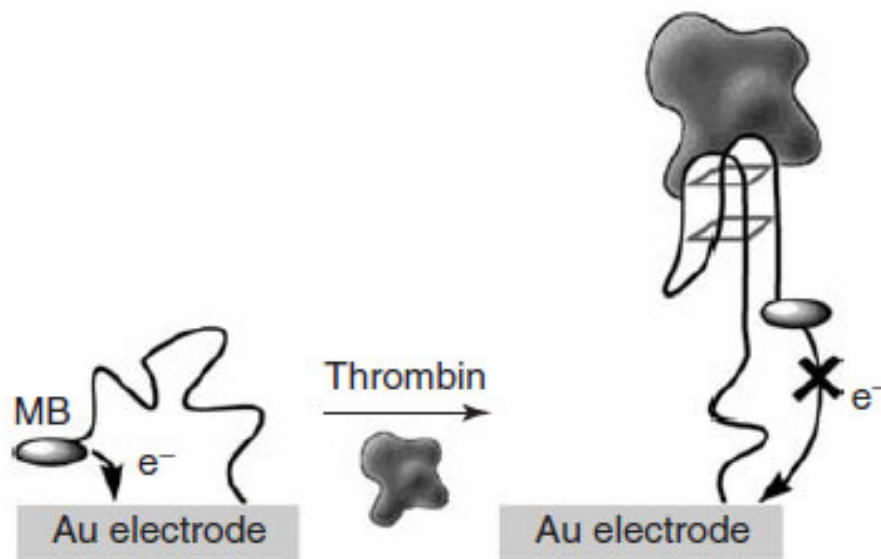


Abbildung 17: Elektrochemischer Aptamer-Sensor für Thrombin [aus: Mascini, 2009, Aptamers in Bioanalysis]

Es gibt auch elektrochemische Aptasensoren mit anderen Funktionsprinzipien, wie etwa der Verwendung von einem unmodifizierten immobilisierten Aptamer und einem Enzym- oder Nanopartikel gekoppelten Aptamer in Lösung, sowie auch Marker-freie elektrochemische Aptasensoren.⁷⁰

3.4.3.4.2 Massensensitive Aptasensoren

Durch Immobilisierung von Aptameren auf einer Quarzkristall-Mikrowaage lassen sich spezifische massensensitive Sensoren realisieren. Ein Beispiel dafür ist ein Aptasensor, der für das Protein HIV-1 Tat entwickelt wurde. Im Vergleich zu einem Sensor, bei dem monoklonale anti-HIV 1 Tat Antikörper immobilisiert wurden, wurden mit dem Aptasensor sehr vergleichbare Nachweisgrenzen und lineare Bereiche erreicht.⁷²

3.4.3.4.3 Sonstige Aptasensoren

Mittlerweile wurde eine Vielzahl von unterschiedlichen Aptasensoren entwickelt, die auf unterschiedlichen Methoden basieren, wie z.B. auf der Fluoreszenz basierende Aptasensoren u.v.a.⁷⁰

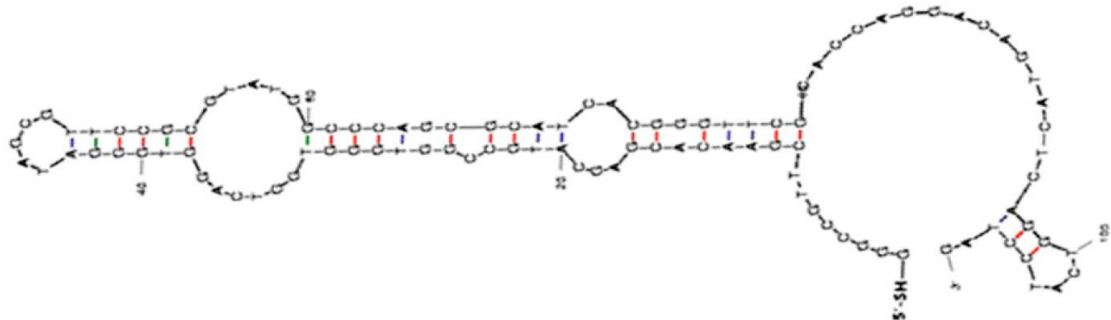
3.4.4 Protein-Funktionsanalyse sowie Entwicklung von Medikamenten

Ein häufig verwendeter biologischer Ansatz, die Funktion von Proteinen bzw. deren Rolle bei Erkrankungen zu erforschen, ist das sogenannte „gene knockout“, bei dem Gene inaktiviert werden, und das von ihnen codierte Protein somit nicht mehr synthetisiert wird. Diese Methode hat allerdings die Nachteile, dass in Modelltieren beobachtete Phänotypen oft nicht 1:1 auf den Menschen übertragbar sind, und dass durch die totale Abwesenheit des Proteins die Aussagekraft der beobachteten Effekte eingeschränkt ist.

Eine Alternative zum „gene knockout“ bzw. „mRNA knockout“ ist die Anwendung von Aptameren, die an aktive Zentren von Proteinen binden und deren biologische Funktion somit inaktivieren. Die Auswirkungen dieser Inaktivierung auf das Testsystem können beobachtet und Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins gezogen werden. Eine besondere Stärke von Aptameren in diesem Zusammenhang ist die hohe Spezifität für bestimmte Proteine, so kann z.B. ein phosphorylierter Zustand von einem nicht-phosphorylierten Zustand unterschieden werden, was mit anderen Methoden nur schwer möglich ist. Im Gegensatz zu Knockout-Methoden ist auch ein Dosis-Wirkung Zusammenhang beobachtbar.^{58,73}

3.5 BPA-bindendes Aptamer

Ein BPA-bindendes DNA-Aptamer wurde 2011 von Jo et al. publiziert (Abbildung 18). Es wurde gemeinsam mit anderen Aptameren durch SELEX (siehe Abschnitt 3.3) aus einer DNA-Bibliothek isoliert und zeigte im Bindungsversuch in einem Sol-Gel-Biosensor eine hohe Affinität zu BPA ($K_D = 8,3 \cdot 10^{-9}$ M) bei niedriger Kreuzreaktivität zu Bisphenol B, 4,4'-Bisphenol und Hexafluorid-Bisphenol A.⁴⁷



(a)

5'-GGGCCGTTCGAACACGAGCATGCCGGTGGGTGGTCAGGTGGGATAGCGTTCCGC-
-GTATGGCCCAGCGCATCACGGGTTCGCACCAGGACAGTACTCAGGTCATCCTAG-3'

(b)

Abbildung 18: Struktur (a) und Sequenz (b) des BPA-bindenden Aptamers

In einer weiteren Publikation wurde dieses Aptamer zudem erfolgreich für die Herstellung eines BPA-spezifischen massensensitiven Sensors verwendet.⁷⁴

4 Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen dieser Masterarbeit sollte das von Jo et al. selektierte BPA-bindende Aptamer (siehe Abschnitt 3.5) zur Entwicklung einer Methode zur Probenvorbereitung sowie zur Entwicklung eines ELAA verwendet werden. Dafür wurde die Synthese des Aptamers in Auftrag gegeben.

4.1 Überprüfung des Aptamers mittels Real-time PCR

Nach dem Kauf des BPA-bindenden Aptamers wurde die Identität desselben mittels Real-time PCR überprüft. Dafür wurden folgende Primer entworfen und verwendet:

Sequenz Vorwärts-Primer (P_F): TGGGTGGTCAGGTGGGATAG

Sequenz Rückwärts-Primer (P_B): CTAGGATGACCTGAGTACTGTCC

Mit diesen Primern, und unter Verwendung von EvaGreen als interkalierendem Farbstoff, wurde die Real-time PCR mit einer Verdünnungsreihe des Aptamers im Konzentrationsbereich von 2 ng/ml - 0,2 pg/ml durchgeführt.

Anhand der erhaltenen Amplifikationskurven (Abbildung 19, 20) konnte die Identität des BPA-bindenden Aptamers bestätigt werden.

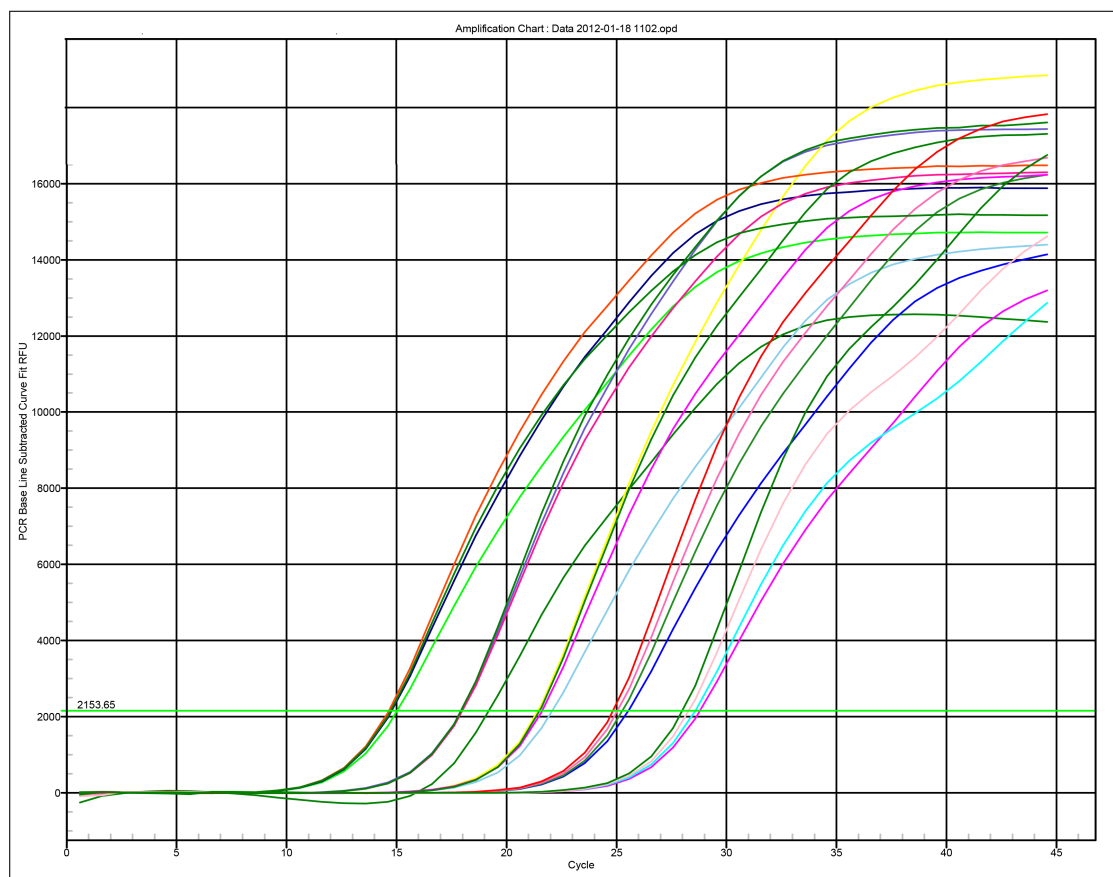


Abbildung 19: Überprüfung der Identität des Aptamers mittels real-time PCR. Aptamerkonzentration: 2 ng/ml - 0.2 pg/ml, (n=4)

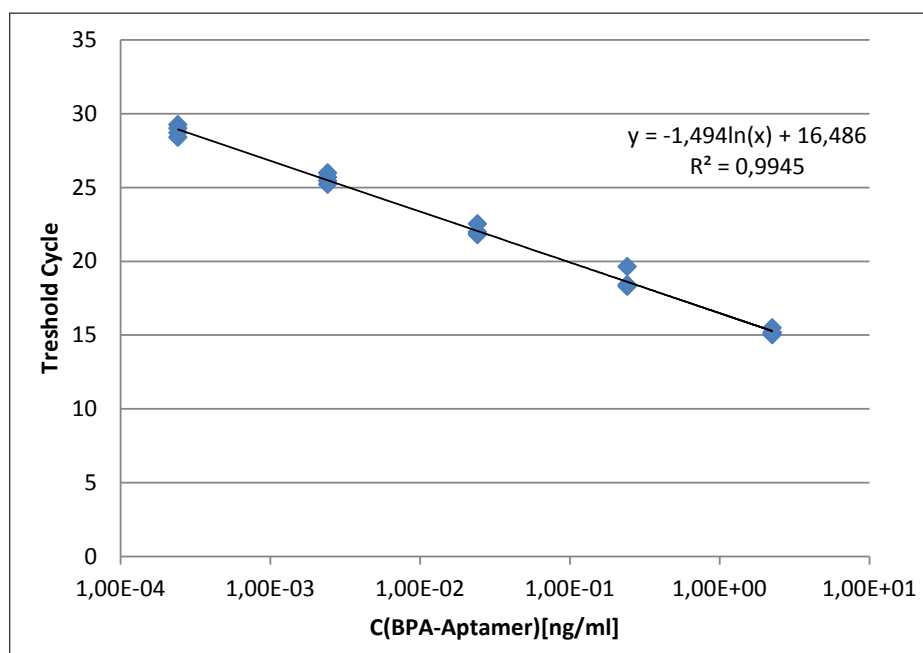


Abbildung 20: Kalibrierfunktion, die durch Auftragen des Ct-Wertes gegen den Logarithmus der Startkonzentration des Aptamers erhalten wurde

4.2 Bestimmung von BPA mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion (HPLC-FL)

Im Laufe meiner Arbeit war es oft notwendig, die BPA-Konzentration von Lösungen zu ermitteln. Das wurde mittels HPLC durchgeführt, wobei zur Trennung eine Reversed Phase (RP) Methode verwendet wurde. BPA fluoresziert (Anregungsmaxima: ca. 220 nm, 275 nm; Emissionsmaximum: 306 nm), daher eignet sich als Detektionsmethode besonders die Fluoreszenz-Detektion. Die experimentellen Details sind in Abschnitt 5.5 beschrieben.

Abbildung 21 zeigt eine exemplarische Kalibrierfunktion der HPLC-FL für BPA. Um sie zu erhalten, wurden aus einem Urstandard mit einer BPA-Konzentration von 1 mg/ml durch Verdünnung mit H₂O Standards im Konzentrationsbereich von 1-100 ng/ml hergestellt und mehrmals in das HPLC-System injiziert. Die durch Auftragen der Peakfläche gegen die BPA Konzentration erhaltene Kalibrierfunktion zeigt einen linearen Verlauf, der Korrelationskoeffizient (R^2) betrug 0,9957.

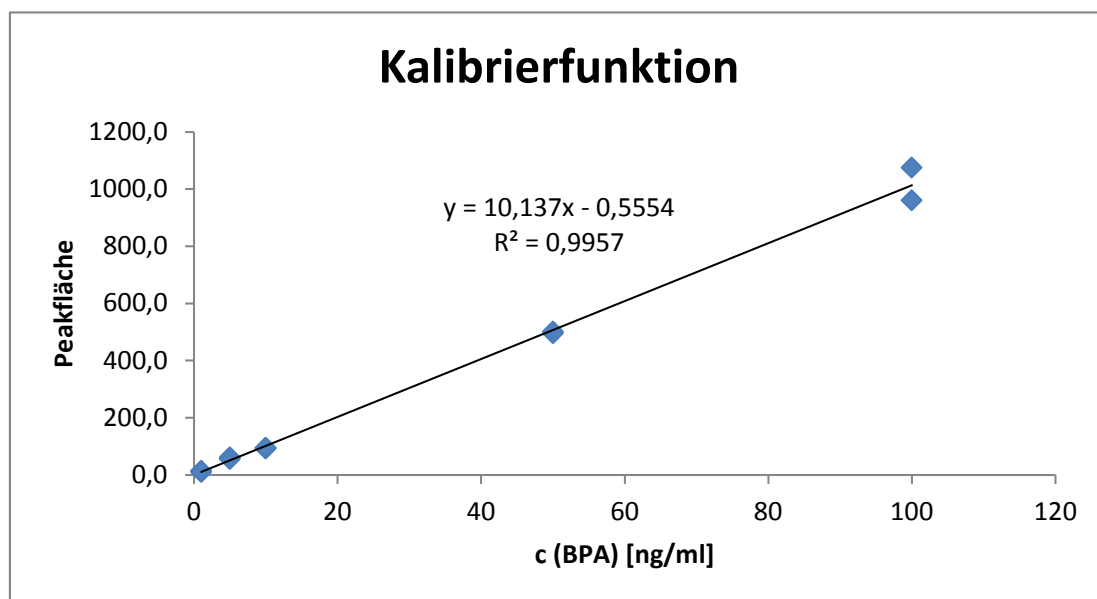


Abbildung 21: Repräsentative HPLC-FL Kalibrierfunktion für die Bestimmung von Bisphenol A

4.3 Aptamer-Affinitätschromatographie

Das erste Ziel der Masterarbeit war die Entwicklung einer selektiven Probenvorbereitungsmethode zur Bestimmung von BPA in Lebensmitteln. Dazu sollte das BPA Aptamer mittels der Sol-Gel Methode immobilisiert und anschließend die Probenaufgabe, der Waschschrift und die Elution optimiert werden.

4.3.1 Immobilisierung des BPA-Aptamers mittels der Sol-Gel Methode

4.3.1.1 Herstellung des Sol-Gels

Wir versuchten, das Aptamer mittels der Sol-Gel Methode zu immobilisieren, wobei in einer ersten Versuchsreihe die Porengröße optimiert werden sollte. Dazu wurden mehrere Sol-Gel Gläser mit einer konstanten Menge an Aptamer ($1 \mu\text{g}$), aber unterschiedlichem Massenverlust (30-70%) hergestellt. Um das Ausmaß des Ausblutens des Aptamers zu bestimmen, wurden die Gläser zerkleinert und in Zentrifugenröhrchen zwei Mal mit je 5 ml PBS gewaschen. Die Aptamerkonzentration in den Waschlösungen wurde mittels Real-time PCR bestimmt. Die Ergebnisse

sind in Tabelle 5 und Abbildung 22 dargestellt. Die experimentellen Details sind in Abschnitt 5.6.1.1 beschrieben.

Tabelle 5: Ergebnisse des Ausblutungstests, MV: Massenverlust

MV [%]	Waschschritt 1			Waschschritt 2			Summe Austritt [%]
	C [fg/ μ l]	m (Austritt) [fg]	Austritt [%]	C [fg/ μ l]	m (Austritt) [fg]	Austritt [%]	
30	218	109	10,90	295	147,5	14,75	25,65
40	160	80	8,00	40,1	20,05	2,01	10,01
50	6,48	3,24	0,32	64,3	32,15	3,22	3,54
60	8,72	4,36	0,44	26,7	13,35	1,34	1,77
70	41,4	0,207	0,02	513	2,565	0,26	0,28

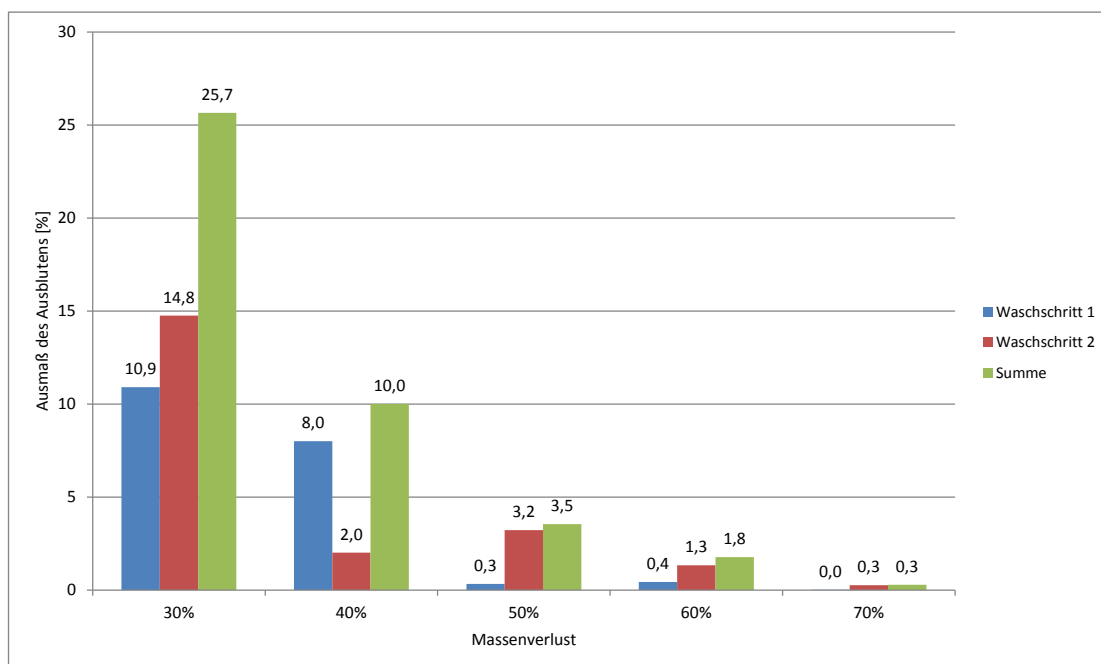


Abbildung 22: Einfluss der Porengröße auf das Ausbluten des Aptamers

Wie erwartet verringerte sich das Ausmaß des Ausblutens mit steigendem Massenverlust und dem daraus resultierenden kleineren Porendurchmesser. Als akzeptabel erschien uns ein Ausbluten von unter 3 % des eingesetzten Aptamers. Da zu enge Poren zu einer Denaturierung des eingeschlossenen Aptamers führen können, wurden bei der Herstellung weiterer Sol-Gel Gläser die Kondensationsreaktionen bei einem Massenverlust von 60-70 % gestoppt.

4.3.1.2 Messung der Bindungskapazität in Batchversuchen

Als nächstes wurde der Einfluss der Porengröße des Sol-Gel Glases auf die Bindungskapazität untersucht. Dazu wurden Sol-Gel Gläser mit gleicher Aptamer-menge ($25\text{ }\mu\text{g}/\text{Ansatz}$) und einem Massenverlust von 60 bzw. 70 % hergestellt, mit einem Mörser zerkleinert und zum Abstoppen der Kondensationsreaktion in PBS-Puffer suspendiert. Nach der Äquilibration mit BB wurden die Glaspartikel abzentrifugiert und mehrmals mit je 5 ml eines 10 ng/ml BPA-Standards in Bindungspuffer (BB) inkubiert. Die BPA-Konzentration der nach der Zentrifugation entnommenen Überstände wurde mittels HPLC-FL (Kalibrierfunktion siehe Abbildung 21) ermittelt. Die experimentellen Details sind in Abschnitt 5.6.1.3 beschrieben.

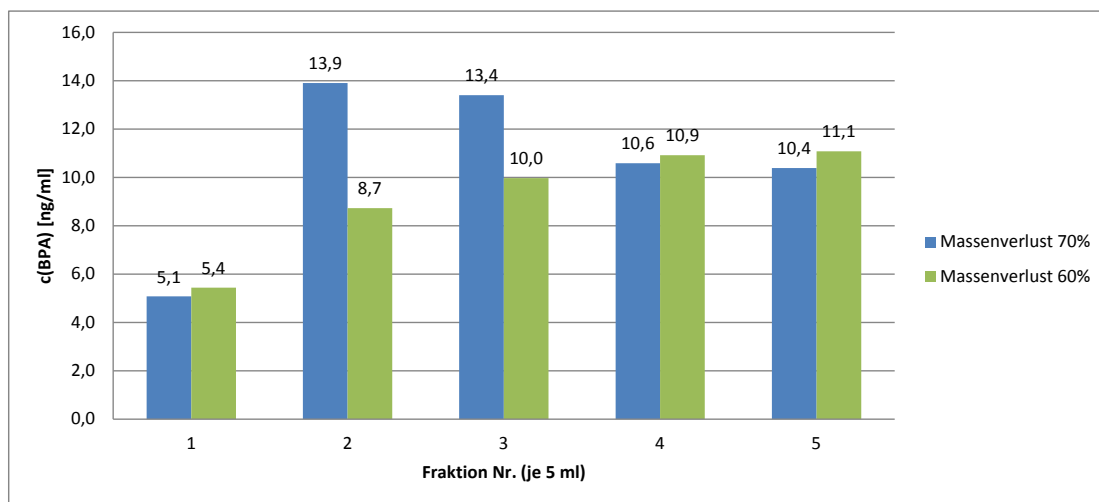


Abbildung 23: Bestimmung der Bindungskapazität der Aptamer Sol-Gel Gläser im Batchversuch. Dargestellt ist die BPA Konzentration in den Überständen nach je 30 min Inkubation. Menge des Aptamers im Sol-Gel Glas: $25\text{ }\mu\text{g}/\text{Ansatz}$, eingesetzte BPA Lösung: je 5 ml einer 10 ng/ml Lösung in BB

Es wurde jedoch bei keinem der beiden Gläser eine Abnahme der BPA-Konzentration der Inkubationslösung beobachtet (siehe Abbildung 23). Die verringerte BPA-Konzentration der jeweils ersten Fraktion kann auf die Verdünnung durch die Restflüssigkeit, die vor der Standardaufgabe im Sol-Gel Sediment enthalten war, zurückgeführt werden. Wir schlossen aus dem Ergebnis, dass die Menge an gebundenem BPA unter der Nachweisgrenze des HPLC-FL Systems lag.

Daher wurde ein weiterer Versuch gestartet. Nach Reäquilibration des Sol-Gel

Materials mit BB wurde dieses mit Elutionspuffer (EB) und anschließend mehrmals mit BB gewaschen. Dann wurde es mit 3 ml BPA-Lösung (5 ng/ml in BB) geschüttelt, wobei die BPA-Konzentration in der überstehenden Lösung nach einer Stunde sowie 2,5 Stunden Schütteln mittels HPLC-FL ermittelt wurde.

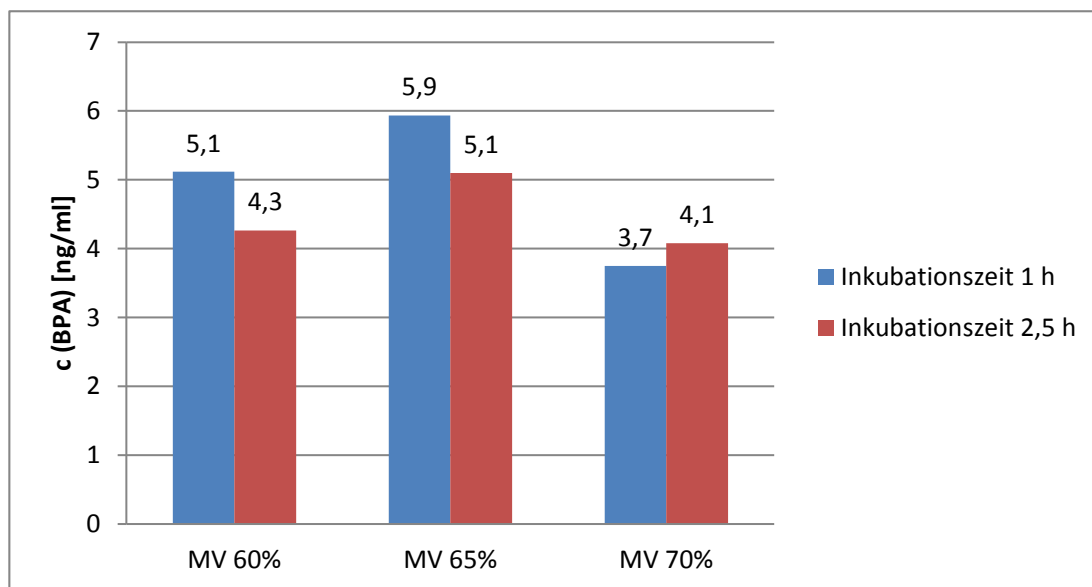


Abbildung 24: Bestimmung der Bindungskapazität der Aptamer Sol-Gel Gläser im Batchversuch. Dargestellt ist die BPA Konzentration im Überstand nach 1 h bzw. 2,5 h Inkubation. Menge des Aptamers im Sol-Gel Glas: 25 μg /Ansatz, eingesetzte BPA Lösung: je 3 ml einer 5 ng/ml Lösung in BB

Auch in diesem Versuch konnte keine Bindung von BPA an die Aptamer-hältigen Glasmaterialien beobachtet werden (siehe Abbildung 24). Da parallel zu diesen Versuche die ersten positiven Ergebnisse mit ELAAs (siehe Abschnitt 4.4.2) erhalten wurden, stellten wir die Affinität des Aptamers zu BPA noch nicht in Frage, und führten weitere Immobilisierungsversuche durch.

4.3.1.3 Messung der Bindungskapazität in Säulenversuchen

Um die Bindungskapazität zu erhöhen, wurde zunächst ein neues Sol-Gel Material mit stark erhöhter Aptamer-Menge (200 $\mu\text{g/g}$) und 70 % Massenverlust hergestellt. Die experimentellen Details sind in Abschnitt 5.6.1.4 beschrieben. Auf 1 g Säulenmaterial wurde acht Mal je 1 ml eines BPA-Standards (50 ng/ml in BB) aufgetragen. Die Fraktionen (je 1 ml) wurden gesammelt und ihre BPA-

Konzentration mittels HPLC-FL ermittelt. Nachdem schon in der 2. Fraktion die BPA-Konzentration annähernd der Aufgabekonzentration entsprach, wurde auf eine Bestimmung der BPA-Konzentration der weiteren Fraktionen verzichtet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Ergebnis des Sol-Gel Säulen-Bindungsversuchs. Angegeben ist die BPA-Konzentration den ersten beiden Fraktionen. Menge des Aptamers im Sol-Gel Glas: 200 μg , eingesetzte BPA Lösung: je 1 ml einer 50 ng/ml Lösung in BB

Fraktion Nr.	m (BPA) [ng]
1	15,23
2	47,88

Da eine gewisse Restwahrscheinlichkeit blieb, dass die Säule eine - wenn auch sehr geringe - Bindungskapazität für BPA hatte, führten wir einen weiteren Säulenversuch durch, mit dem wir zugleich auch die möglichen Effekte einer Lebensmittelmatrix auf unser Affinitätschromatographie-System beobachten wollten. Auf die mit BB reäquilibrierte Säule wurden 20 Mal je 1 ml einer Probelösung aus Rotwein und BB (50:50, v/v), zu der 0,25 ng/ml BPA zugesetzt worden war, aufgegeben. Danach wurde die Säule mit BB gewaschen sowie fünf Mal mit je 1 ml BB/ACN (50:50, v/v) eluiert und die BPA-Konzentration des Eluats mittel HPLC-FL bestimmt. Die genaue Durchführung ist in Abschnitt 5.6.1.4 beschrieben.

Die im Eluat wiedergefundene BPA-Konzentration war mit 4 ng sehr niedrig. Wir vermuteten, dass die Porengröße des Sol-Gel Glases so gering gewählt war, dass eine Interaktion des Aptamers mit dem Analyten nicht mehr ausreichend möglich war. Bei größeren Poren kam es allerdings zu einem nicht vernachlässigbaren Ausbluten des Aptamers (siehe Abschnitt 4.3.1.1). So wurde beschlossen, eine andere Art der Immobilisierung zu versuchen.

4.3.2 Kovalente Immobilisierung

Eine Alternative zur Immobilisierung durch Einschluss in eine poröse Glasmatrix ist die Immobilisierung des Aptamers durch die Veresterung von Phosphatgruppen mit an Agarosepartikel gebundenen Aminen, wie z.B. Diaminodipropylamin (DADPA). Dafür wird als Reagenz 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (EDC) verwendet. Für den Versuch der kovalenten Immobilisierung des Aptamers wurde ein kommerziell erhältlicher Immobilisierungskit erworben.

Die Immobilisierung wurde gemäß dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt (siehe Abschnitt 5.6.2).

4.3.2.1 Immobilisierung des unmodifizierten Aptamers

Da in einer Publikation eine kovalente Immobilisierung von Aptameren durch interne Phosphatgruppen beschrieben wird,⁶⁷ wurde auch von uns zunächst das unmodifizierte Aptamer verwendet. Für die Immobilisierung wurden 66,9 μg Aptamer und 40 μl Säulenmaterial (eine Suspension von DADPA-aktivierten Agarosepartikeln) eingesetzt. Danach wurde das Trägermaterial abzentrifugiert, der Überstand entnommen, das Material mit BB gewaschen und mehrere Stunden in BB äquilibriert. Analog dazu wurde ein Blindversuch durchgeführt, bei dem ebenfalls 40 μl Säulenmaterial das selbe Protokoll - nur ohne Aptamerzusatz - durchlief. Das gesamte Säulenmaterial beider Produktionsansätze wurde in je ein Zentrifugenröhrchen transferiert, mit 1 ml eines BPA-Standards (10 ng/ml in BB) versetzt und 30 min am Schüttler inkubiert. Danach wurde zentrifugiert und anschließend der Überstand entnommen. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt. Danach wurde das Säulenmaterial zwei Mal mit BB gewaschen, und schließlich mit 1 ml Elutionsbuffer (EB) eluiert. Nach Abzentrifugieren und Entnahme des Überstands wurde das Material in BB reäquilibriert.

Die BPA-Konzentrationen der Überstände sowie des Eluats wurden mittels HPLC-FL bestimmt. Dabei konnte im Vergleich zur Blindprobe weder eine Abnahme der BPA-Konzentration in den Überständen, noch BPA im Eluat gefunden werden (siehe Abbildung 25).

Wir wiederholten die Immobilisierung des Aptamers sowie den anschließenden Bindungstest mit veränderten Mengen von Säulenmaterial (je 500 μl Suspension), aber das negative Ergebnis wurde bestätigt (siehe Abbildung 26).

Daraus mussten wir schließen, dass entweder die kovalente Immobilisierung durch molekülinterne Phosphatgruppen nicht ausreichend funktionierte, oder aber dass durch die Veresterung der Phosphatgruppen mit dem Trägermaterial die Raumstruktur des Aptamers auf eine Art und Weise verändert wird, die die Aptamer-BPA Bindung verhindert. Um ersteres auszuschließen, bestellten wir Phosphatmodifiziertes Aptamer (Aptamer mit endständiger Phosphat-Gruppe am 5' Ende des Moleküls) und versuchten, es kovalent am Trägermaterial zu immobilisieren. Dazu ist allerdings zu sagen, dass bei einer Analyse der nach der Immobilisierung des unmodifizierten Aptamers verwendeten Waschlösungen mittels Real-time PCR

nur 0,21 % bzw 0,28 % des eingesetzten Aptamers wiederfindbar waren. Der Rest war daher an das Trägermaterial gebunden worden. Also durfte von vornherein bezweifelt werden, dass die Verwendung von Phosphat-modifiziertem Aptamer die Bindungskapazität des Säulenmaterials erhöhen würde.

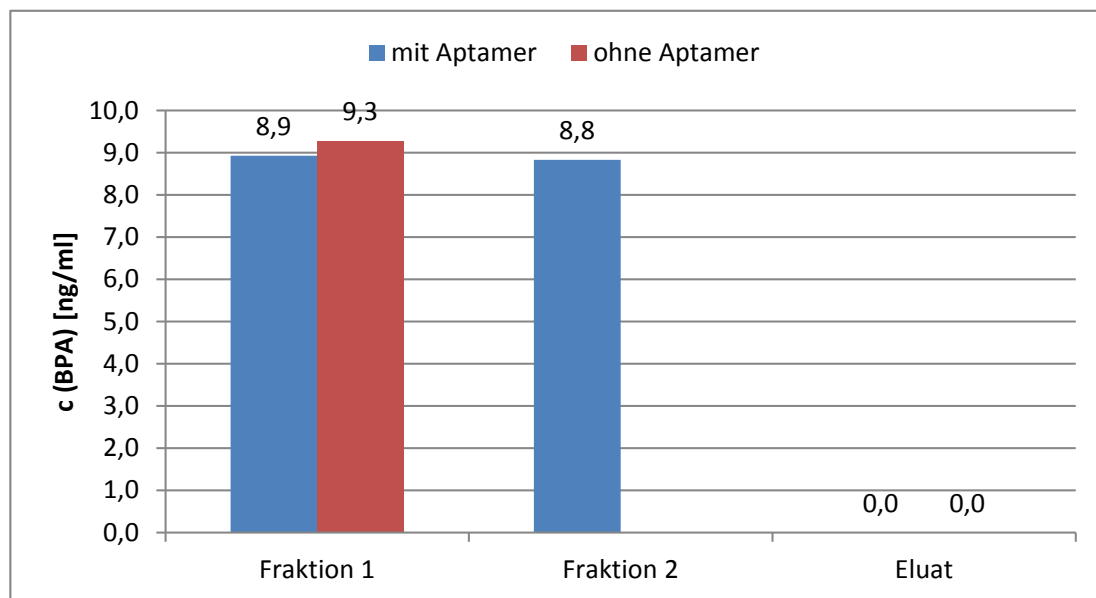


Abbildung 25: Ergebnisse des Batchversuchs zur Bestimmung der Bindungskapazität des an Säulenmaterial immobilisierten nicht-modifizierten Aptamers. Dargestellt ist die BPA Konzentration in den Überständen nach 30 min (Fraktion 1) bzw. 1 h Inkubation (Fraktion 2) sowie im Eluat. Menge des Aptamers im Versuchsansatz: 66,9 μg bzw. 0 μg , immobilisiert auf 40 μl Trägermaterial-Suspension; eingesetzte BPA Lösung: je 1 ml einer 10 ng/ml Lösung in BB.

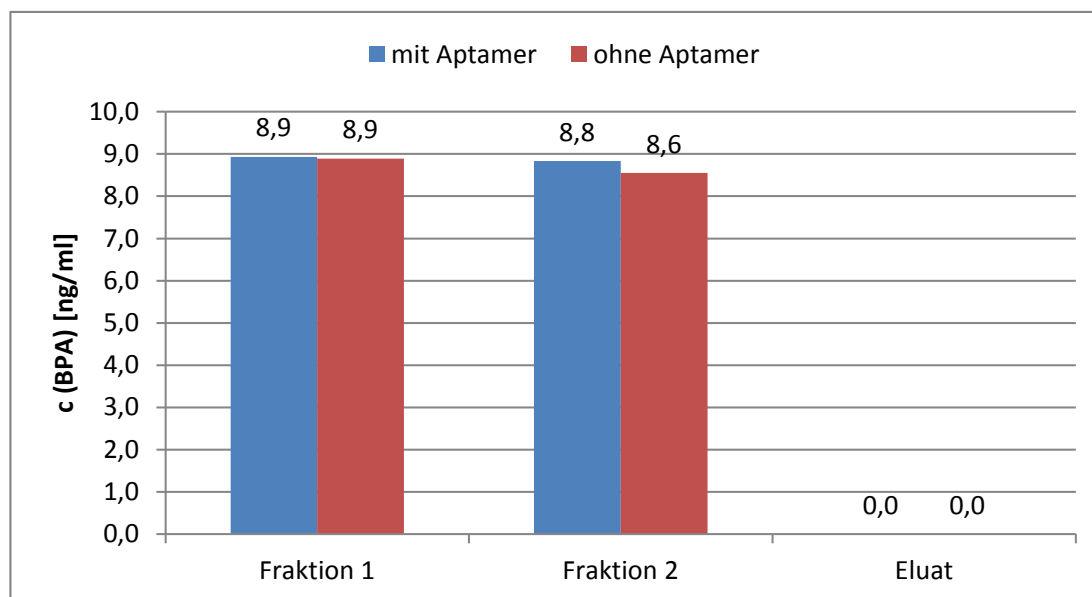


Abbildung 26: Ergebnisse des Batchversuchs zur Bestimmung der Bindungskapazität des an Säulenmaterial immobilisierten nicht-modifizierten Aptamers. Dargestellt ist die BPA Konzentration in den Überständen nach 30 min (Fraktion 1) bzw. 1 h Inkubation (Fraktion 2) sowie im Eluat. Menge des Aptamers im Versuchsansatz: 66,9 μg bzw. 0 μg , immobilisiert auf 500 μl Trägermaterial-Suspension; eingesetzte BPA Lösung: je 1 ml einer 10 ng/ml Lösung in BB.

4.3.2.2 Immobilisierung des Phosphat-modifizierten Aptamers

Die Immobilisierung des Phosphat-modifizierten Aptamers wurde gemäß der Arbeitsvorschrift des Herstellers des Immobilisierungskits durchgeführt. Dafür wurden 10 nmol (334,5 μg) Phosphat-modifiziertes Aptamer und 2 ml Trägermaterial eingesetzt. Die genaue Durchführung ist in Abschnitt 5.6.2.1.2 beschrieben. Analog wurde mit 2 ml Trägermaterial, nur ohne Zugabe der Aptamerlösung, verfahren, um Kontrollversuche durchführen zu können.

4.3.2.2.1 Bestimmung der Bindungskapazität im Batchversuch

2 ml Trägermaterial, an das Phosphat-modifiziertes Aptamer gebunden worden war, wurden in ein Zentrifugenröhrchen transferiert, mit 2 ml eines 150 ng/ml BPA-Standards in BB versetzt und 30 min am Schüttler inkubiert. Das Material wurde abzentrifugiert und der Überstand entnommen. Der Vorgang wurde drei Mal wiederholt, danach wurde das Säulenmaterial drei Mal mit je 3 ml BB gewa-

schen und anschließend mit 5 ml EB eluiert. Danach wurde das Material in BB reäquilibriert.

Die BPA-Konzentrationen der Überstände sowie des Eluats wurden mittels HPLC-FL bestimmt.

Auf den ersten Blick sahen die Ergebnisse danach aus, als würde das Säulenmaterial BPA binden (siehe Abbildung 27). Die Überstände wiesen zum Teil deutlich niedrigere BPA-Konzentrationen auf als der zugegebene Standard. Das könnte allerdings zum Teil auch an Verdünnungseffekten liegen. Allein bei der ersten Inkubation kam es zu einer Verdünnung von 1:1, da 2 ml Trägermaterial-Suspension sowie 2 ml BPA-Standard eingesetzt wurden. Gerade im ersten Überstand war die BPA-Konzentration allerdings so niedrig, dass von einer gewissen Bindung von BPA ausgegangen werden konnte. Bei der Elution betrug die BPA-Konzentration 7,38 ng/ml BPA, was einer Gesamtmenge von 36,9 ng BPA entsprach, es könnte allerdings sein, dass drei Waschschritte nicht genug waren, um ungebundenes BPA vollständig zu entfernen. Aber auch wenn die Säule eine Bindungskapazität von 36,9 ng BPA aufweisen würde, wäre der Einsatz zur Probenvorbereitung nicht rentabel, da ja pro μg Aptamer nur 0,11 ng BPA gebunden worden wären (vorausgesetzt, dass das zur Immobilisierung eingesetzte Aptamer vollständig an das Trägermaterial gebunden wurde).

4.3.2.2.2 Säulenversuch

Da die Ergebnisse aus dem Batchversuch nicht eindeutig interpretierbar waren, führten wir auch einen Bindungsversuch in Glassäulen durch. Dazu wurden 2 ml des mit BB regenerierten Säulenmaterials in eine Glassäule gepackt und zwei Mal mit BB gewaschen. Je 1 ml eines 5 ng/ml BPA-Standards in BB wurde aufgegeben und langsam durch die Säule laufen gelassen. Danach wurde zehn Mal mit je 1 ml BB gewaschen, und schließlich mit 5 ml EB eluiert.

Die BPA-Konzentration in den gesammelten Fraktionen wurde mittels HPLC-FL bestimmt. Im Eluat wurden 0,60 ng/ml BPA gefunden, was einer Gesamtmenge von 3 ng entspricht (siehe Abbildung 28). Nachdem eine sehr große Menge an Aptamer (10 nmol) immobilisiert wurde, und nur sehr wenig BPA zurück gehalten wurde, gaben wir die Hoffnung auf, das immobilisierte Aptamer für die Probenvorbereitung verwenden zu können.

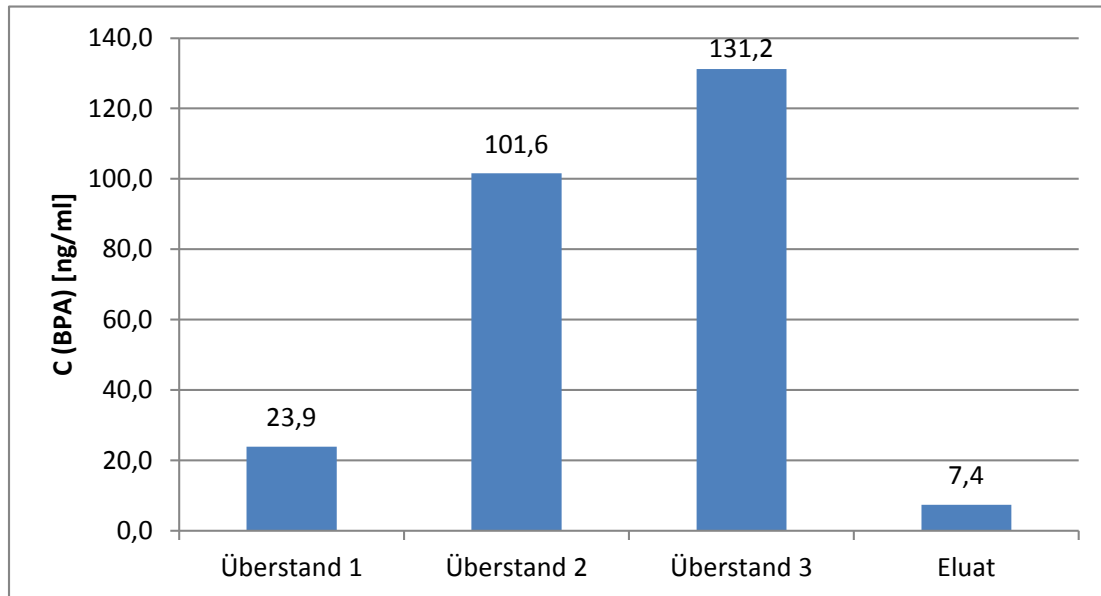


Abbildung 27: Ergebnisse des Batchversuchs zur Bestimmung der Bindungskapazität des an Säulenmaterial immobilisierten Phosphat-modifizierten Aptamers. Dargestellt ist die BPA Konzentration in den Überständen nach 30 min (Überstand 1), 1 h (Überstand 2) bzw. 1.5 h Inkubation (Überstand 3) sowie im Eluat. Menge des phosyphorylierten Aptamers im Versuchsansatz: 334,5 μg , immobilisiert an 2 ml Trägermaterial-Suspension; eingesetzte BPA Lösung: je 2 ml einer 150 ng/ml Lösung in BB.

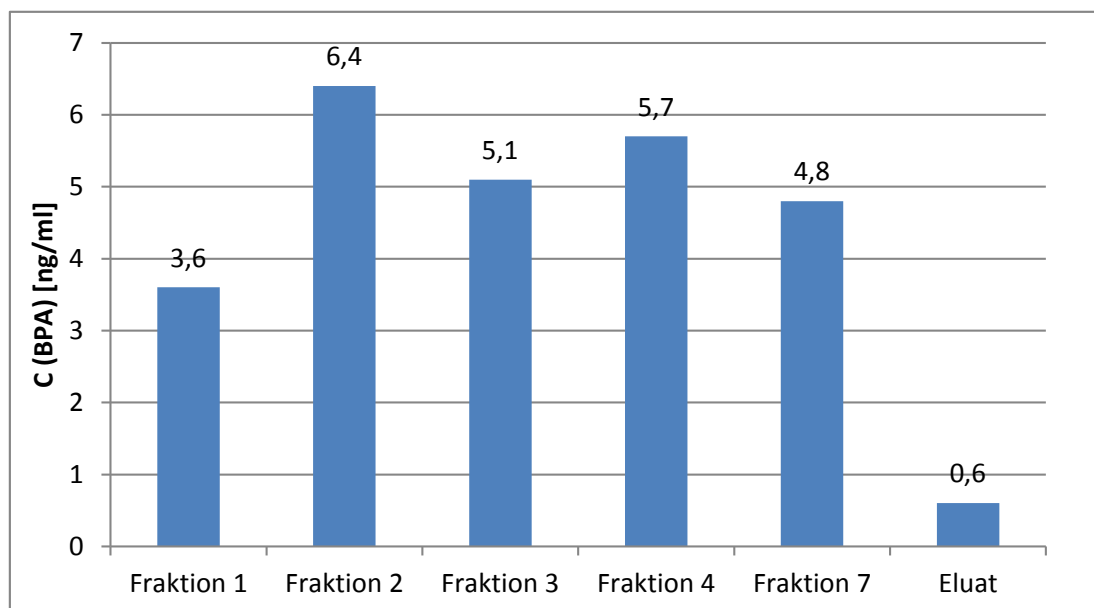


Abbildung 28: Ergebnisse des Säulenversuchs zur Bestimmung der Bindungskapazität des an Säulenmaterial immobilisierten Phosphat-modifizierten Aptamers. Dargestellt ist die BPA Konzentration der gesammelten Fraktionen. Menge des phoyphorylierten Aptamers im Versuchsansatz: 334,5 μg , immobilisiert an 2 ml Trägermaterial; eingesetzte BPA Lösung: je 1 ml einer 5 ng/ml Lösung in BB. Da die BPA Konzentration ab der zweiten Fraktion annähernd gleich war wie die Konzentration der Aufgabelösung, wurden die Fraktionen 5 und 6 nicht in das HPLC-FL System injiziert.

Nach diesen Versuchen konzentrierten wir unsere Arbeit auf die Entwicklung und Optimierung von ELAAs, da zu diesem Zeitpunkt erste vielversprechende Ergebnisse vorlagen (siehe Abschnitt 4.4.2).

4.4 Enzyme-linked Aptamer Assay (ELAA)

Die Methode des Enzyme-linked Aptamer Assays ist der des Enzyme-linked Immunoassays (ELISA) nachempfunden, nur dass anstelle von Antikörpern Aptamere an ein Zielmolekül binden, und die Methode dementsprechend adaptiert werden muss. Die Methode wurde bereits in Abschnitt 3.4.3.2 beschrieben. Im Rahmen der Masterarbeit wurde versucht, sowohl einen indirekt-kompetitiven als auch einen direkt-kompetitiven Assay zur Bestimmung der Konzentration von BPA in Lebensmitteln zu entwickeln.

Um den Einfluss des verwendeten Bindungspuffers zu untersuchen, wurden ELAAs in zwei verschiedenen Bindungspuffern durchgeführt. Der Bindungspuffer (BB, der auch für die zuvor beschriebenen Bindungstests verwendet wurde), ist der von den Entwicklern des von uns verwendeten Aptamers publizierte Puffer.⁴⁷ Eine zweiter Pufferlösung, Bindungspuffer „M“ (BB_M), wurde für die Entwicklung eines ELAA für Ochratoxin A verwendet.⁶⁸ Tabelle 16 in Abschnitt 5.7.3 fasst zusammen, in welchen Versuchen welcher Puffer verwendet wurde. Die Zusammensetzung des Bindungspuffers hatte jedoch keinen Einfluss auf die erhaltenen Ergebnisse.

4.4.1 Indirekt-kompetitiver Assay

Beim indirekt-kompetitiven Testansatz wird BPA (über ein Proteinkonjugat) an der Oberfläche einer Mikrotiterplatte adsorbiert („Coating“-Schritt). In der Testlösung konkurrieren das immobilisierte BPA und das freie BPA um die Bindungsplätze am biotinylierten Aptamer, das ebenfalls zugegeben wird. Nur Aptamer, das an gecoatetem BPA gebunden ist, verbleibt nach einem Waschschrift in der Mikrotiterplatte. Nun wird Streptavidin-HRP Konjugat zugeben und Streptavidin bindet an das biotinylierte Aptamer. Nach abermaligem Waschen wird die Substratlösung (TMB/H₂O₂ in Substratbuffer) zugegeben. Je nach Menge des gebundenen BPA-HRP Konjugats färbt sich die Lösung blau, bzw. nach Zugabe von H₂SO₄ gelb und die Extinktion wird bei 450 nm gemessen.

4.4.1.1 Herstellung des BSA-BPA Konjugats

Für die Durchführung der indirekt-kompetitiven ELAAs wurde anhand einer Vorschrift von Krapivin et al.⁴⁴ ein Konjugat aus Bovinem Serum Albumin (BSA) und BPA hergestellt. Dazu wurden BPA-Valerat, N-Hydroxysuccinimid (NHS)

und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in Dimethylformamid (DMFA) gelöst und tröpfchenweise zu einer BSA-Lösung zugegeben. Diese wurde drei Stunden gerührt, über Nacht bei 4 °C stehen gelassen, und schließlich gegen 0,01 M PBS dialysiert. Die exakte Durchführung ist in Abschnitt 5.7.1.2 beschrieben.

4.4.1.2 Entwicklung des ELAA

Wir gingen von dem indirekt-kompetitiven ELAA-Versuchsansatz aus, den Barthelmebs et. al für Ochratoxin A entwickelt hatten⁶⁸ und versuchten, diesen für BPA zu optimieren.

Bei einem ersten Vorversuch wurde eine Mikrotiterplatte über Nacht bei 4 °C mit je 200 µl/well BSA-BPA Konjugat (Konzentration 0,05 µg/ml bzw. 0,01 µg/ml) gecoatet. Nach Blocken der Platte mit Casein wurden 100 µl biotinyliertes Aptamer (Konzentration 1 nM) und 100 µl BPA-Standards in BB_M (Konzentrationen zwischen 0,0001 ng/ml und 1000 ng/ml) zugegeben und 30 min am Schüttler inkubiert. Danach wurde Streptavidin-HRP Konjugat (Strep-HRP) und nach einem Waschschrift das Substrat zugegeben. Nach Stoppen der Enzymreaktion mit H₂SO₄ wurde die Extinktion bei 450 nm gemessen. Die experimentellen Details sind in Abschnitt 5.7.2 beschrieben.

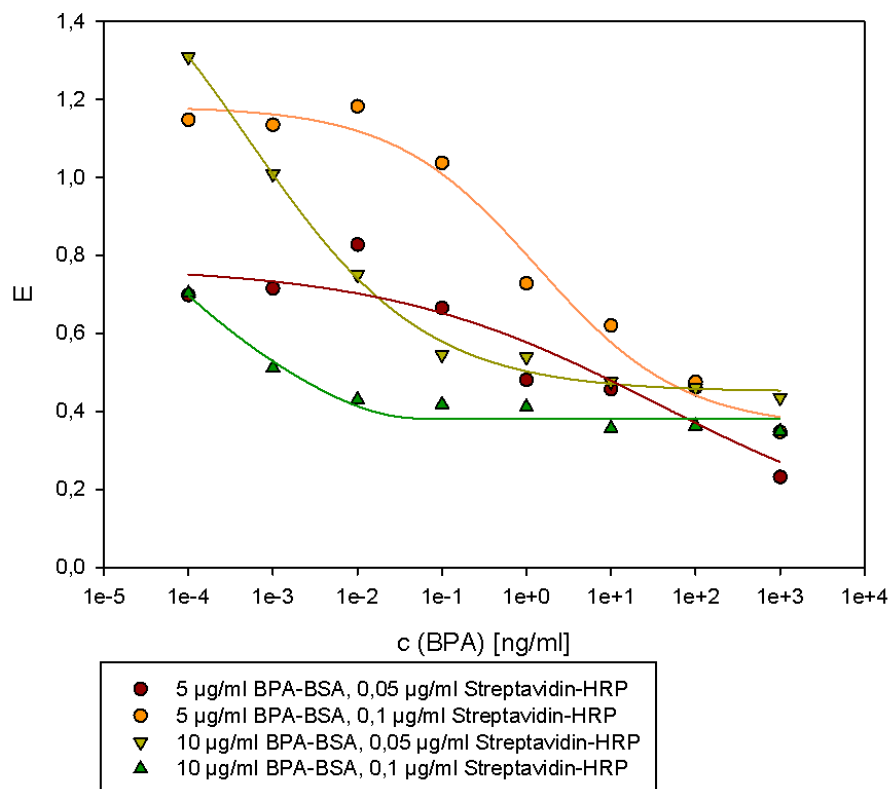


Abbildung 29: Einfluss der BPA-BSA und Streptavidin-HRP Konjugat Konzentration auf die Kalibrierfunktion im indirekt-kompetitiven ELAA. Konzentration des BSA-BPA Konjugats: 5 μ g/ml bzw. 10 μ g/ml, Aptamerkonzentration: 1 nM, Konzentration des Strep-HRP Konjugats: 0,05 μ g/ml bzw. 0,1 μ g/ml.

Das erste Ergebnis (siehe Abbildung 29) sah durchaus vielversprechend aus. Eine Abhängigkeit der Extinktion von der BPA-Konzentration war erkennbar. Die Unterschiede zwischen den vier Kurven sind allerdings nicht erklärbar. Bei einer BPA-BSA Konzentration von 5 μ g/ml wurde mit einer Strep-HRP Konzentration von 0,1 μ g/ml eine höhere Extinktion erhalten, bei einer Coating Konzentration von 10 μ g/ml jedoch mit einer Strep-HRP Konzentration von 0,05 μ g/ml. Vor allem letzteres ist unlogisch, da sich eine höhere Enzymkonzentration ja, falls überhaupt eine Auswirkung sichtbar ist, nur verstärkend auf die Farbreaktion auswirken kann. Es wurden daher weitere Vorversuche zur Optimierung des indirekt-kompetitiven ELAA durchgeführt. Die Ergebnisse waren allerdings nur sehr begrenzt reproduzier- und erklärbar. So wurde unter anderem der Einfluss der Strep-HRP Konzentration

auf die Extinktion untersucht, wobei erneut teils niedrigere Konzentrationen von Strep-HRP eine höhere Extinktion verursachten (siehe Abbildung 30). Zumeist war aber nicht einmal mehr eine BPA-Konzentrationsabhängigkeit sichtbar oder die Platten blieben komplett farblos. Um als Ursache eine begrenzte Stabilität der Reagentien ausschließen zu können, wurden neue BPA-Konjugate hergestellt, sowohl mit BSA als auch mit Ovalbumin. Aliquote davon wurden als Lyophilisat gelagert. Weiters wurden neue Aliquote des Aptamers verwendet. All dies führte aber nicht zu einer Verbesserung der Ergebnisse. Darum wurde beschlossen, den indirekt-kompetitiven Ansatz vorerst aufzugeben und den direkt-kompetitiven zu versuchen.

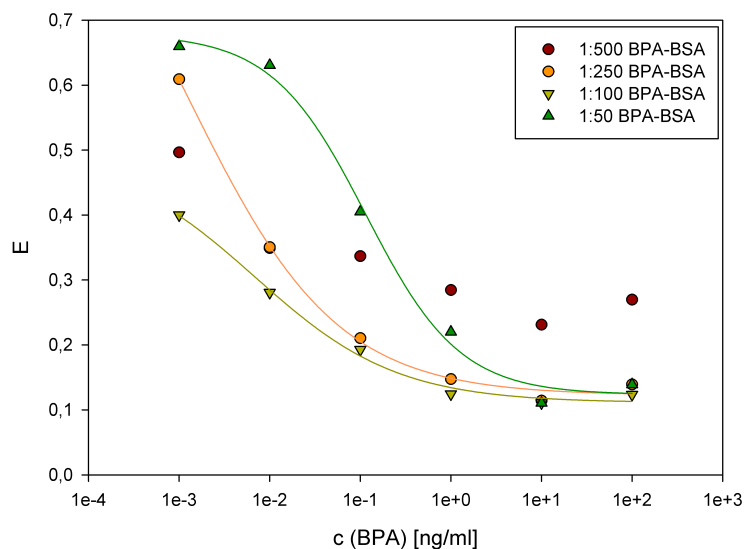


Abbildung 30: Indirekt-kompetitiver ELAA-Versuch mit BPA-Standardlösungen in $\text{BB}_\text{M}/\text{ACN}$ (90:10, v/v), bei denen die Coating-Konzentration variiert wurde. Aptamerkonzentration: 1 nM, Strep-HRP Konzentration: 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

4.4.2 Direkt-kompetitiver Assay

Als Alternative zum indirekt-kompetitiven Assay wurde auch der direkt-kompetitive Ansatz verfolgt. Wir gingen von einem direkt-kompetitiven ELAA-Versuchsansatz aus, den Barthelmebs et. al für Ochratoxin A entwickelt hatten⁶⁸ und versuchten, diesen für BPA zu optimieren.

Dabei werden die Mikrotiterplatten zuerst eine Stunde mit Avidin in HEPES-Puffer versetzt und nach Waschen der Platten wird das biotinylierte Aptamer zuge-

geben. Durch die starke Avidin-Biotin-Bindung ist das Aptamer nun auf der Plattenoberfläche gebunden. Nach Blocken mit Casein werden BPA sowie zuvor hergestelltes BPA-HRP Konjugat zugegeben, die um die Bindungsplätze am Aptamer konkurrieren. Nach abermaligem Waschen wird die Substratlösung (TMB/H₂O₂ in Substratbuffer) zugegeben, je nach Menge des gebundenen BPA-HRP färbt sich die Lösung blau, bzw. nach Zugabe von H₂SO₄ gelb und die Extinktion bei 450 nm wird gemessen. Die genaue Durchführung ist in Abschnitt 5.7.3 beschrieben.

4.4.2.1 Herstellung des BPA-HRP Konjugats

Das benötigte BPA-HRP Konjugat wurde anhand einer Vorschrift von Krapivin et al. hergestellt.⁴⁴ BPA-Valerat, NHS und DCC wurden in DMFA gelöst, die Lösung anschließend mit HRP-Lösung versetzt und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das entstandene Konjugat wurde auf eine Ultrafiltrationseinheit aufgegeben und mehrmals mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Konjugat in 4 ml PBS/Glycerin (50:50, v/v) gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

4.4.2.2 Entwicklung des direkt-kompetitiven ELAA

Um eine grobe Einschätzung der am besten geeigneten Konzentrationen für das Konjugat bzw. das Aptamer treffen zu können, wurde in einem Vorversuch eine weite Bandbreite an Konzentrationen mit jeweils einer Positivkontrolle (BPA-Konzentration 10 µg/ml) und einer Negativkontrolle (ohne Zusatz von BPA) getestet. Die Inkubation der Platte mit der Substratlösung wurde hierbei wegen der sehr schnellen, intensiven Färbung der Wells mit hoher BPA-HRP Konjugatkonzentration schon nach drei Minuten durch Zugabe von H₂SO₄ gestoppt. Die photometrische Messung der Platten führte zu den in Tabelle 7 zusammengefassten Werten. Die Extinktionswerte, die bei der BPA Konzentration 10 µg/ml und der BPA Konzentration 0 µg/ml erhalten wurde, unterschieden sich stark. Ebenso war ein großer Einfluss der BPA-HRP Konjugatkonzentration zu erkennen. Die Aptamerkonzentration schien dagegen einen relativ geringen Einfluss auf die Intensität der Färbung zu haben.

Tabelle 7: Direkt-kompetitiver ELAA Vorversuch. BPA-HRP Konjugatkonzentration: 1:100-1:10000; Aptamerkonzentration: 1-20 nM; BPA-Konzentration: 0 bzw. 10 µg/ml

Aptamer-Konzentration	Extinktionswerte			
	1 nM	5 nM	10 nM	20 nM
BPA-HRP Konjugat 1:100, BPA-Konzentration 0	1,95	2,16	2,21	2,42
BPA-HRP Konjugat 1:100, BPA-Konzentration 10 µg/ml	0,24	0,27	0,26	0,31
Differenz	1,71	1,89	1,95	2,12
BPA-HRP Konjugat 1:500, BPA-Konzentration 0	0,56	0,57	0,58	0,64
BPA-HRP Konjugat 1:500, BPA-Konzentration 10 µg/ml	0,16	0,14	0,16	0,15
Differenz	0,40	0,43	0,42	0,49
BPA-HRP Konjugat 1:1000, BPA-Konzentration 0	0,46	0,44	0,40	0,38
BPA-HRP Konjugat 1:1000, BPA-Konzentration 10 µg/ml	0,26	0,25	0,21	0,32
Differenz	0,20	0,20	0,18	0,07
BPA-HRP Konjugat 1:5000, BPA-Konzentration 0	0,16	0,16	0,14	0,14
BPA-HRP Konjugat 1:5000, BPA-Konzentration 10 µg/ml	0,18	0,11	0,09	0,11
Differenz	-0,02	0,05	0,05	0,03
BPA-HRP Konjugat 1:10000, BPA-Konzentration 0	0,11	0,09	0,10	0,19
BPA-HRP Konjugat 1:10000, BPA-Konzentration 10 µg/ml	0,08	0,13	0,09	0,24
Differenz	0,03	-0,04	0,00	-0,05

In einem weiterführenden Versuch sollte eine erste Kalibrierfunktion für den direkt-kompetitiven Assay erstellt werden, wobei die Aptamerkonzentrationen mit 1 nM bzw. 5 nM festgelegt wurden. Das Konjugat wurde 1:200, 1:400, 1:600 bzw. 1:800 verdünnt eingesetzt. Die Konzentration der BPA Standards betrug zwischen 10000 ng/ml und 0,01 ng/ml.

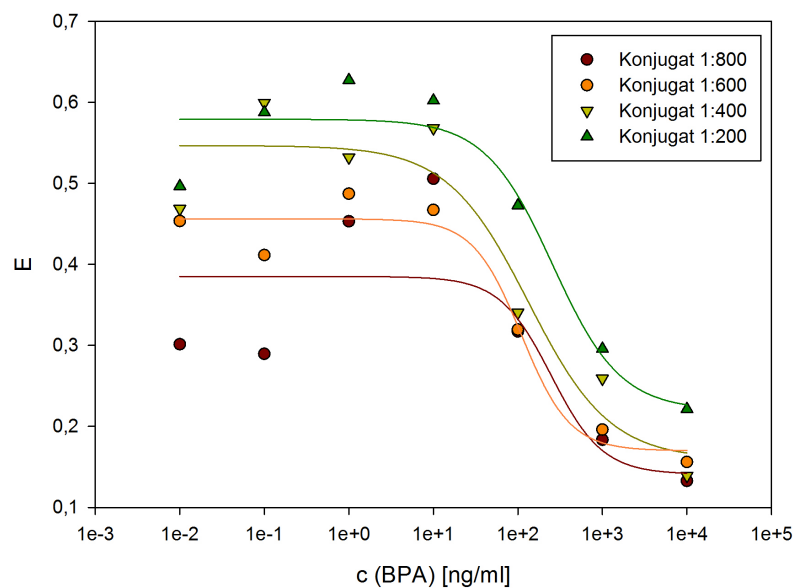


Abbildung 31: Einfluss der BPA-HRP Konzentration auf die Kalibrierfunktion. Apta-merkonzentration: 1 nM; BPA-HRP Konjugatkonzentration: 1:200-1:800

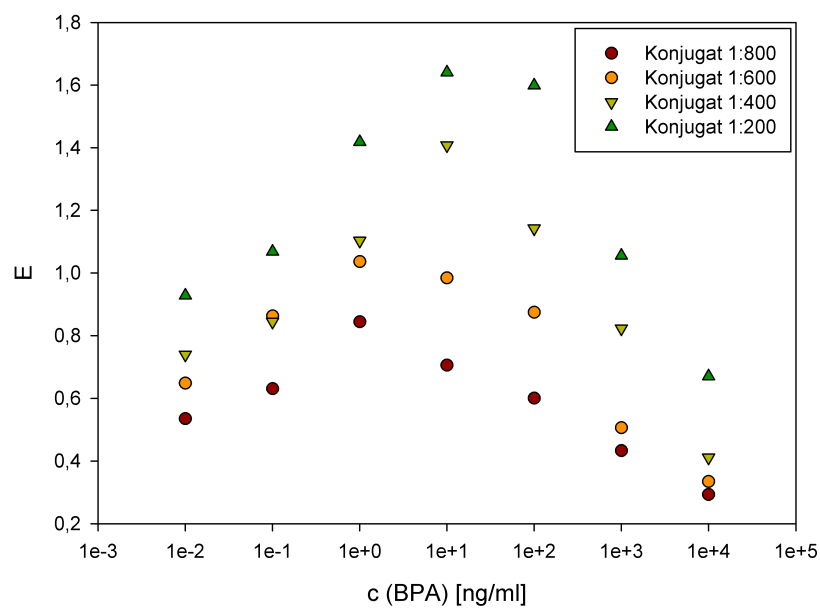


Abbildung 32: Einfluss der BPA-HRP Konzentration auf die Kalibrierfunktion. Apta-merkonzentration: 5 nM; BPA-HRP Konjugatkonzentration: 1:200-1:800

Eine Abhängigkeit der Extinktion von der Bisphenol A Konzentration konnte beobachtet werden, wenn auch klar wurde, dass Verbesserungen und Optimierungen nötig sein würden. So nahm die Extinktion im Konzentrationsbereich von 10-10000 ng/ml ab, es wurden jedoch auch bei BPA Konzentrationen unter 10 ng/ml niedrigere Extinktionswerte beobachtet, ein Effekt, der schwer zu erklären ist. Die Versuche wurden wiederholt, wobei der Konzentrationsbereich der BPA-Standards enger gefasst wurde (1-10000 ng/ml). Ein gutes Ergebnis lieferte der Versuch mit einer Aptamerkonzentration von 5 nM. Die erhaltenen Extinktionswerte wurden gegen die BPA-Konzentration aufgetragen, und eine nicht-lineare Regression durchgeführt (siehe Abbildung 33). In diesem Konzentrationsbereich war die gesuchte Abhängigkeit sehr gut sichtbar.

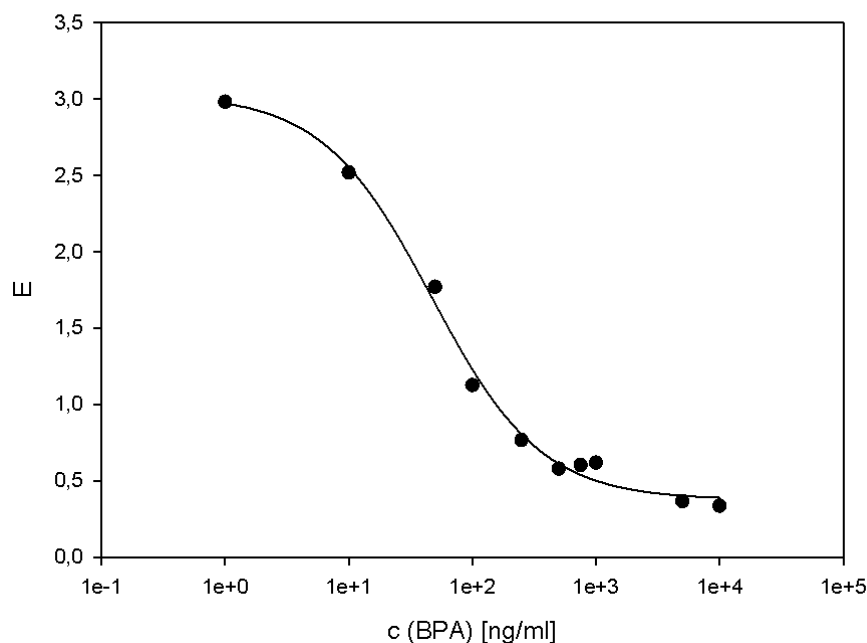


Abbildung 33: Erste Kalibrierfunktion für den direkt-kompetitiven ELAA. Aptamerkonzentration: 5 nM; BPA-HRP Konjugatkonzentration: 1:100 (Zugabevolumen 10 μ l); Inkubationszeit des kompetitiven Schritts: 30 min.

4.4.2.3 Optimierungsversuche

In der Folge wurde versucht, die Parameter des Experiments so zu optimieren, dass reproduzierbare Ergebnisse bei maximaler Empfindlichkeit der Methode erreicht

werden.

4.4.2.3.1 Optimierung der Konjugat-Konzentration

Auf zwei Platten wurden insgesamt vier Messserien mit vier verschiedenen Konzentrationen (Verdünnungen von 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000 der Urlösung) des zugegebenen BPA-HRP Konjugats durchgeführt. Alle anderen Parameter wurden dabei konstant gehalten. Das Ergebnis (siehe Abbildung 34) zeigt wie erwartet, dass die Konjugatkonzentration vor allem einen Einfluss auf die Signalintensität hatte, auf die Empfindlichkeit der Methode aber nur insofern einen Einfluss hatte, als dass man eine Konjugatkonzentration zu wählen hatte, bei der der Unterschied zwischen der höchsten und niedrigsten Extinktion („Maximum/Sockel Verhältnis“) möglichst groß ist. Auf diese Größe hatte auch die Substrat-Inkubationszeit einen großen Einfluss. So musste bei sehr hoher Konjugat-Konzentration die Substratreaktion sehr früh gestoppt werden, um die Extinktion im linearen Bereich des Photometers zu halten.

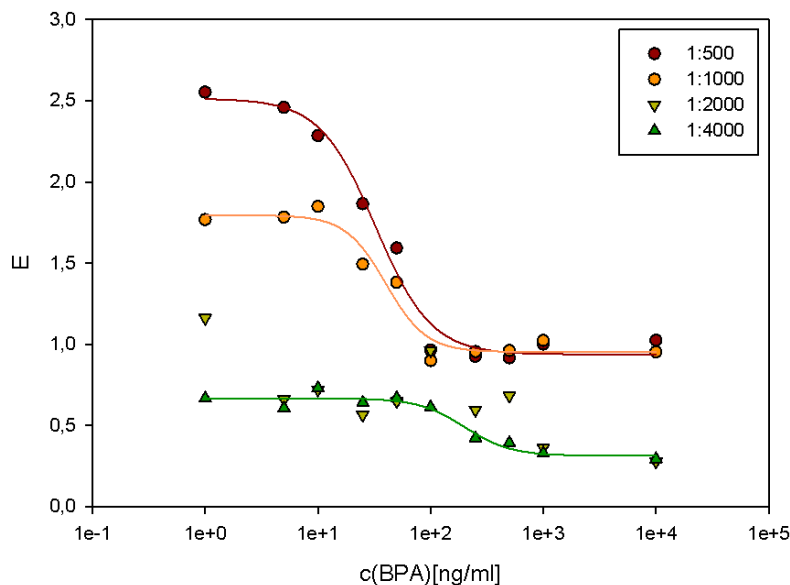


Abbildung 34: Einfluss der Konjugatkonzentration auf die Kalibrierfunktion. Aptamerkonzentration: 5 nM; BPA-HRP Konjugatkonzentration: 1:500-1:4000; Inkubationszeit beim kompetitiven Schritt: 30 min

Nicht zu unterschätzen war auch der Einfluss des Alters des Konjugats (Abbil-

dung 35). Ein am Vortag hergestelltes Konjugat führte in der selben Konzentration zu wesentlich intensiveren Extinktionswerten als eine Konjugatlösung, die einige Wochen alt war.

Es ist somit schwierig, eine optimale Konjugatkonzentration anzugeben. Je nach Alter des Konjugats wurde die Konzentration in den weiteren Experimenten so gewählt, dass nach ca. 15-20 min Substratinkubation eine maximale Extinktion von 2 erhalten wurde.

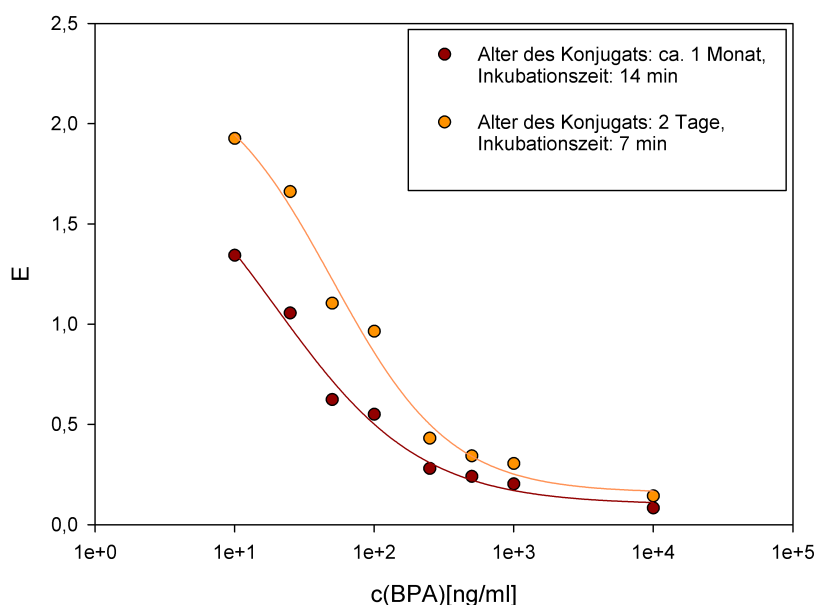


Abbildung 35: Einfluss des Alters des Konjugats auf die Kalibrierfunktion. Konzentration des BPA-HRP Konjugats: 1:1000 (Zugabevolumen 100 μ l), Konzentration der Aptamerlösung: 5 nM, Inkubationszeit beim kompetitiven Schritt: 30 min

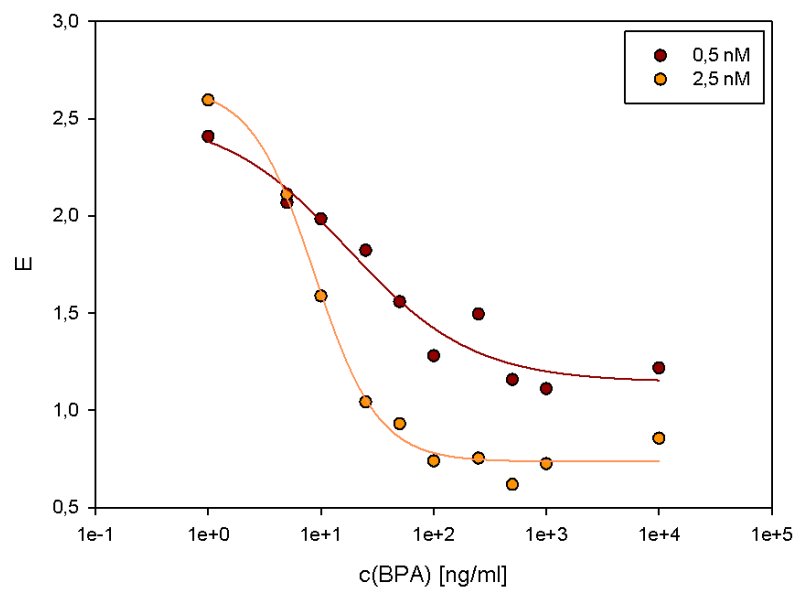
4.4.2.3.2 Optimierung der Aptamerkonzentration

In zwei Versuchen mit insgesamt drei Platten wurde versucht, die Konzentration der zugegebenen Aptamer-Lösung zu optimieren. Die dabei verwendeten Konzentrationen betrugen im ersten Versuch 0,5 nM bzw. 2,5 nM. Abbildung 36a zeigt, dass bei einer Aptamerkonzentration von 2,5 nM eine deutlich höhere Empfindlichkeit erzielt wurde. Für einen zweiten Versuch wurden vier Aptamerkonzentrationen im Bereich von 1 nM bis 2,5 nM verwendet. Bei diesem Versuch hatte die Aptamerkonzentration kaum einen Einfluss auf die Empfindlichkeit, bei niedrigerer Aptamer-Konzentration wurden jedoch geringere maximale Extinktionswerte

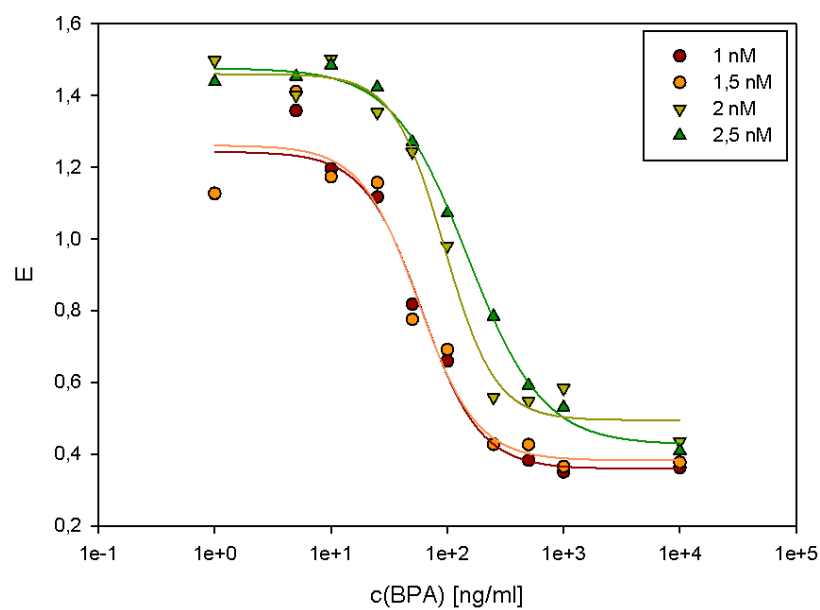
erhalten (siehe Abbildung 36b). Dies könnte im Nachhinein betrachtet allerdings auch daran liegen, dass die Versuche auf zwei verschiedenen Platten durchgeführt wurden und somit leicht voneinander abweichende Substrat-Inkubationszeiten hatten. Wir haben das Ergebnis der beiden Versuche zuerst so interpretiert, dass die Aptamerkonzentration mindestens 1 nM betragen muss, die optimale Konzentration aber zwischen 2 und 2,5 nM liegt. In weiteren Versuchen wurde das Aptamer in einer Konzentration von 2,5 nM eingesetzt.

4.4.2.3.3 Optimierung der Inkubationszeit des kompetitiven Schritts

In der nächsten Versuchsreihe wurden alle Parameter konstant gehalten und nur die Zeit, in der BPA und das BPA-HRP Konjugat um die Bindungsstellen am Aptamer konkurrieren, variiert. Dazu wurden auf zwei Mikrotiterplatten insgesamt vier Messserien durchgeführt, und der kompetitive Schritt nach je 15, 30, 45 bzw. 60 min durch manuelles Waschen gestoppt. Abbildung 37 zeigt das Ergebnis dieses Experiments. Je länger der kompetitive Schritt dauerte, desto höher wurde die Extinktion, sowohl bei niedrigen als auch bei hohen BPA Konzentrationen. Bei einer Inkubationszeit von 30 min nahm die Extinktion schon ab der zweitniedrigsten Konzentration ab, die Methode hätte demnach eine niedrigere Nachweisgrenze als bei einer 45 min bzw. 60 min dauernden Inkubation. Da bei längeren Reaktionszeiten auch die Sockelhöhe stieg, war das Maximum/Sockel-Verhältnis vergleichbar. Wir entschieden uns dafür, vorerst mit einer Reaktionszeit von 30 min weiter zu arbeiten. Da weitere Versuche unter dieser Bedingung schöne Kurven lieferten (siehe z.B. Abbildung 39 oder 46), blieben wir dabei.



(a)



(b)

Abbildung 36: Einfluss der Aptamerkonzentration auf die Kalibrierfunktion. Aptamerkonzentration: 0,5-2,5 nM; Konzentration des BPA-HRP Konjugats: a) 1:500 (Zugabevolumen 50 μ l), b) 1:2000 (Zugabevolumen 50 μ l); Inkubationszeit beim kompetitiven Schritt: 30 min

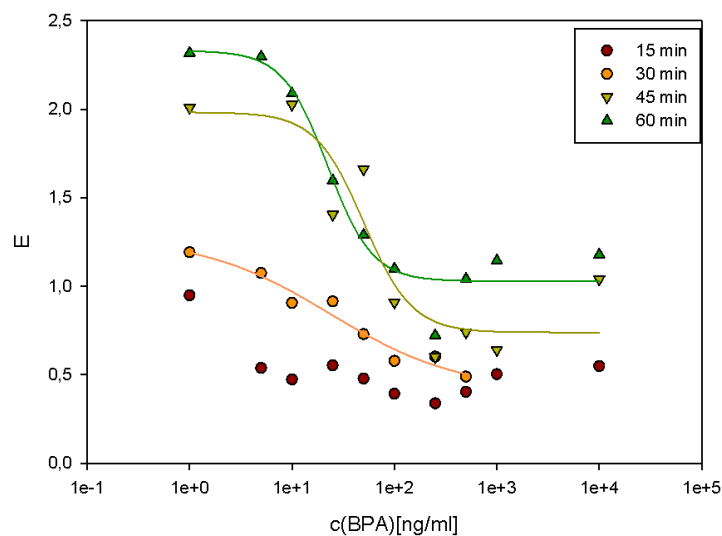


Abbildung 37: Optimierung der Inkubationszeit. Aptamerkonzentration: 2,5 nM; Inkubationszeit beim kompetitiven Schritt: 30 min.

4.4.2.3.4 Streuung der Meßwerte

Ein erhebliches Problem bei den ersten Versuchen war die sehr hohe Streuung der Messwerte, die u.a. dadurch bedingt war, dass das zugegebene Volumen an Konjugat-hältiger Lösung mit 10 μl sehr gering war. Um dieses Problem zu lösen, wurde die Methode von uns dahingehend verändert, dass das zugegebene Volumen an Konjugatlösung auf 100 μl erhöht wurde. Die Lösung wurde dementsprechend 1:10 verdünnt. Tatsächlich konnte die Streuung dadurch deutlich verringert werden, wenn auch eine hohe Reststreuung vorhanden blieb, die bis zum Ende meiner Arbeit immer wieder Probleme bereitete.

4.4.2.3.5 Zusammenfassung der optimierten Bedingungen

Es wurden die Volumina und Konzentrationen der Aptamerlösung, der Konjugatlösung, der BPA-Standards sowie die Reaktionszeiten optimiert. Für weitere Versuche wurden folgende Parameter gewählt:

Aptamer:	200 μ l; 2,5 nM
Konjugat:	100 μ l; Konzentration variabel je nach Alter des Konjugats (1:1000-1:2000)
BPA-Standards:	100 μ l; 1-10000 ng/ml
Konkurrenzreaktionszeit:	30 min
Substratinkubationszeit:	variabel, 5-45 min

4.4.2.4 Anwendung des ELAA auf Lebensmittel

Nach der Optimierung des ELAA versuchten wir, diesen auf Realproben anzuwenden. Da die Migration von Bisphenol A vor allem bei flüssigen Lebensmitteln eine große Rolle spielt, wurden verschiedene Getränke (Milch, Weißwein, Rotwein, Römerquelle Emotion der Sorte Apfel-Ribisl, Coca-Cola, Orangensaft) als Probenmatrizes ausgewählt.

Um einen etwaigen Einfluss der Lebensmittelmatrix feststellen zu können, wurden Kalibrierstandards einerseits durch Verdünnen mit BB_M und andererseits durch Verdünnen mit der jeweiligen Lebensmittelmatrix hergestellt.

4.4.2.4.1 Milch

Der Versuch, den Aptamer Assay auf Milch anzuwenden, gelang nicht (siehe Abbildung 38a). Nicht nur war kein Anstieg der Extinktion mit sinkender BPA-Konzentration zu beobachten, der Trend war sogar eher umgekehrt als erwartet. Die Kalibrierfunktion, die mit den in BB_M hergestellten BPA-Standardlösungen erhalten wurde, wies einen hohen „Sockel“ auf, was die Vermutung nahe legt, dass es bei diesem Versuch zu erheblichen Problemen beim Blocken der Mikrotiterplatten kam. Im parallel durchgeführten Versuch mit Weißwein wurde ein ähnliches Ergebnis erhalten, jedoch führten die in BB_M hergestellten BPA Standardlösungen zu einer annähernd sigmoiden Kalibrierfunktion. Wir schlossen daraus, dass es bei der Verwendung von Milch als Probenmatrix aufgrund der in der Milch enthaltenen Stoffe zu Matrixeffekten kam.

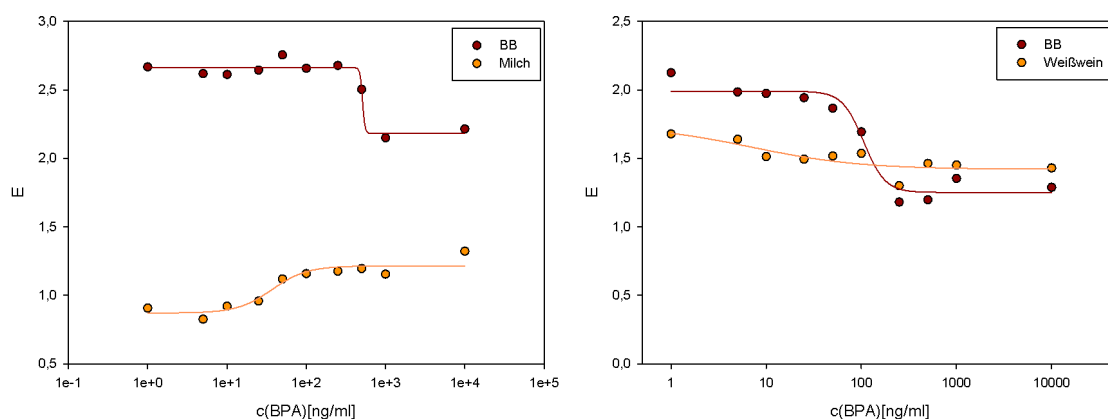


Abbildung 38: Anwendung des direkt-kompetitiven ELAA auf Milch (a) bzw. Weißwein (b). Aptamerkonzentration: 2,5 nM; Inkubationszeit beim kompetitiven Schritt: 30 min.

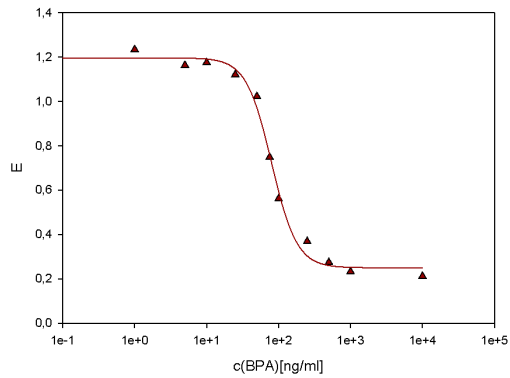
4.4.2.4.2 Weißwein

Nachdem wie oben beschrieben der erste Versuch zur Anwendung des ELAA auf Weißwein fehlgeschlagen war, was wir auf unspezifische Wechselwirkungen entweder des BPA oder des Aptamers mit Inhaltsstoffen des Weins zurückführten, sollte in einem zweiten Experiment versucht werden, diese Wechselwirkungen durch die Zugabe von 10 % Acetonitril (ACN) zu unterbinden. Dazu musste zuerst festgestellt werden, ob die Zugabe von 10 % ACN die Wechselwirkungen zwischen dem Aptamer und BPA beeinträchtigt. Nachdem das offensichtlich nicht der Fall war (siehe Abbildung 39a), wurden auf einer Mikrotiterplatte zwei BPA Standardreihen, eine durch Verdünnen der BPA Urlösung mit $\text{BB}_\text{M}/\text{ACN}$ (90:10, v/v), die andere durch Verdünnen mit Weißwein/ACN (90:10, v/v) aufgetragen. Abbildung 39b zeigt, dass die Zugabe von ACN keine Verbesserung des Ergebnisses zur Folge hatte.

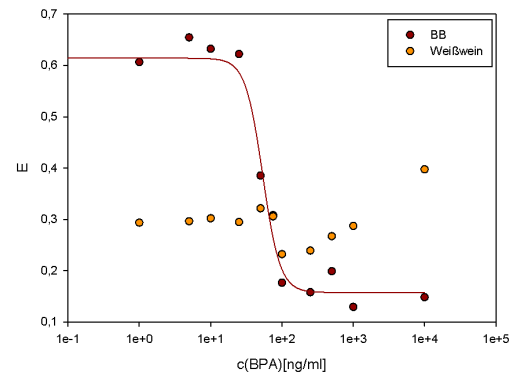
Da der verwendete Wein einen pH-Wert von 3,7 hatte, lag es nahe, dass der niedrige pH Wert die Wechselwirkungen zwischen dem Aptamer und BPA beeinträchtigte. Daher wurde im nächsten Versuch der Wein vor der Verwendung mit NaOH neutralisiert (pH 7,0). Zusätzlich wurden eventuell störende Schwebstoffe im Wein durch Zentrifugieren entfernt. Aber auch diese Probenvorbereitung brachte keine Verbesserung des Ergebnisses mit sich (siehe Abbildung 39c).

4.4.2.4.3 Römerquelle Emotion, Apfel-Ribisl Geschmack

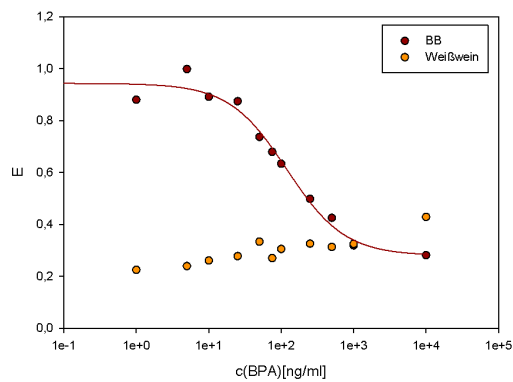
Als relativ unproblematisch vermutete Matrix wählten wir Mineralwasser mit Apfel-Ribisl Geschmack. Das Mineralwasser wurde 10 min im Ultraschallbad entgast, neutralisiert und zur Herstellung der Standards verwendet. Doch auch in diesem Fall wurden Matrixeffekte beobachtet (siehe Abbildung 39d). In einem weiteren Versuch wurde das Getränk 1:5 mit BB_M verdünnt, 10 % ACN zugegeben und das so vorbehandelte Mineralwasser zur Herstellung der BPA Standardlösungen verwendet. Doch sogar bei dieser Verdünnung der Matrix gelang es nicht, eine Änderung der Extinktion mit Änderung der BPA Konzentration zu erzielen, während mit den in BB_M hergestellten Standardlösungen eine sigmoide Kalibrierfunktion erhalten wurde (siehe Abbildung 39e).



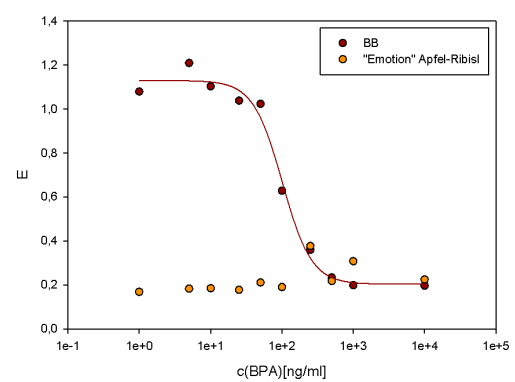
(a) BPA Standardlösungen in BB_M/ACN (90:10, v/v)



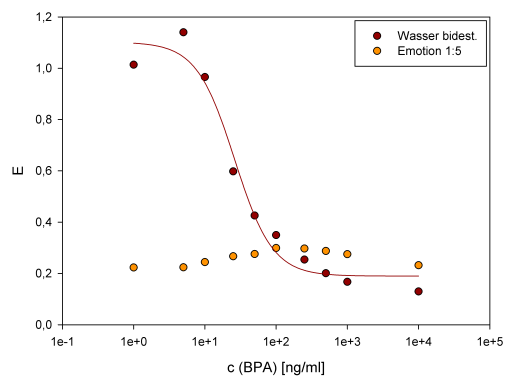
(b) BPA Standardlösungen in Weißwein/ACN (90:10, v/v)



(c) BPA Standardlösungen in Weißwein/ACN (90:10, v/v). Der Wein wurde zuvor zentrifugiert und mit NaOH neutralisiert.



(d) BPA Standardlösungen in Mineralwasser mit Ribislgeschmack/ACN (90:10, v/v). Das Getränk wurde zuvor mit NaOH neutralisiert.



(e) BPA Standardlösungen in Mineralwasser mit Ribislgeschmack/ BB_M/ACN (20:70:10, v/v/v). Das Getränk wurde zuvor mit NaOH neutralisiert.

Abbildung 39: Einfluss der Lebensmittelmatrix auf die Kalibrierfunktion. Aptamerkonzentration: 2,5 nM; Inkubationszeit beim kompetitiven Schritt: 30 min.

4.4.2.4.4 Matrixverdünnungen

Wir gingen nun dazu über, die Matrizes stark zu verdünnen, um zu sehen, ab welchem Verdünnungsfaktor der Assay funktionieren würde. Um den Zeit- und Materialaufwand gering zu halten, wurde pro Probenmatrix und Verdünnung nur eine ungespikete Probe (BPA-Konzentration 0) analysiert und die Extinktionswerte mit jenen verglichen, die in BB bzw. bidestilliertem Wasser erhalten wurden.

In Abbildung 40 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Es ist ersichtlich, dass auch durch Verdünnen der Probenmatrizes nicht so hohe Extinktionswerte erhalten wurden wie in BB oder Wasser. Nur beim Apfel-Ribisl Mineralwasser führte die Verdünnung zu einem Anstieg der Extinktion. Allerdings wäre die Methode viel zu unempfindlich, würde man jede Probe 1:20-1:100 verdünnen müssen, also wurde dieses Ergebnis nicht weiter verfolgt und stattdessen versucht, das zugrunde liegende Problem zu lösen.

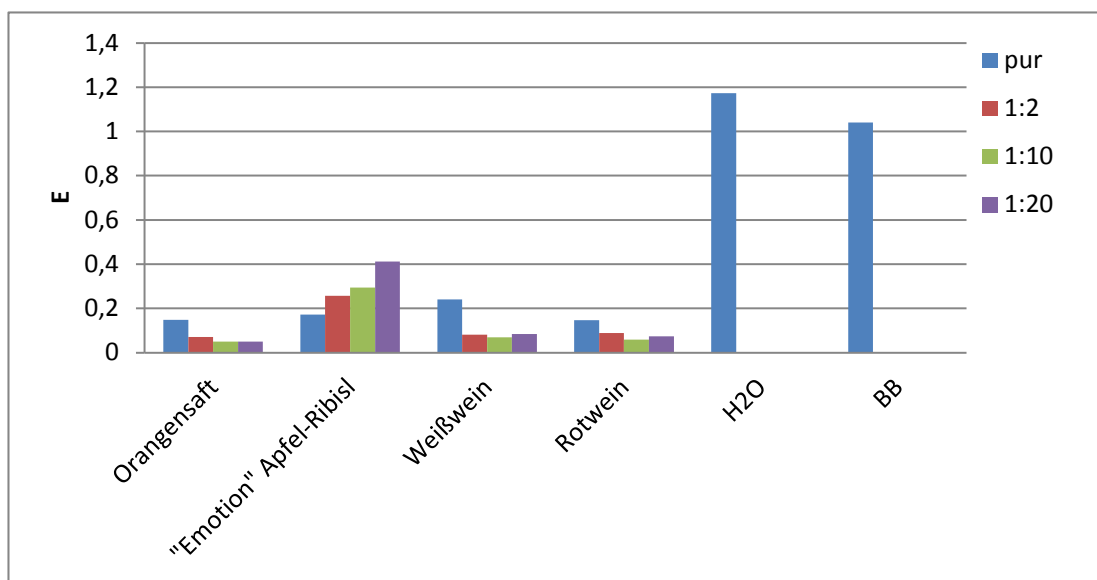


Abbildung 40: Anwendung des ELAA auf verdünnte Lebensmittelmatrizes. Aptamerkonzentration: 2,5 nM; Inkubationszeit beim kompetitiven Schritt: 30 min.

Eine mögliche Ursache für diese Ergebnisse ist, dass der pH-Wert und/oder die Schwebstoffe in den Proben die Wechselwirkung zwischen BPA und dem Aptamer beeinträchtigen. Daher wurden der Orangensaft bzw. der Weißwein zuerst mit NaOH auf pH 7,4 (pH-Wert des Bindungspuffers) eingestellt, und ein Aliquot der Probe anschließend zentrifugiert. Sowohl die Überstände als auch die nicht

zentrifugierten Proben wurden analysiert. Abbildung 41 zeigt, dass selbst wenn die Matrices 1:100 mit BB verdünnt wurden, die Extinktionswerte signifikant niedriger waren als der mit BB erhaltene Extinktionswert.

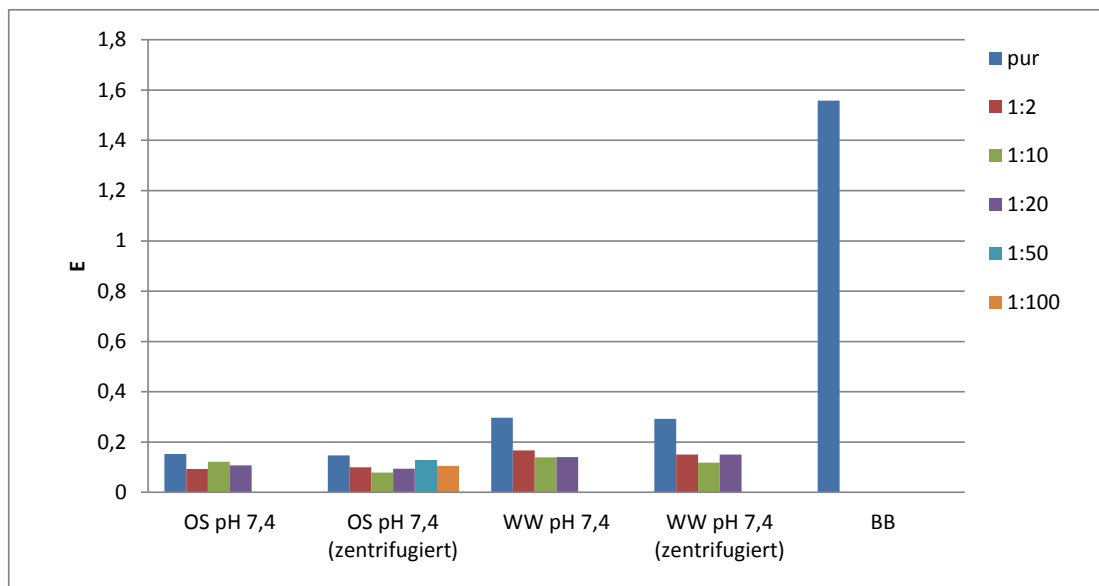


Abbildung 41: Anwendung des ELAA auf verdünnte Lebensmittelmatrices nach Probenvorbereitung. OS: Orangensaft, WW: Weißwein. Aptamerkonzentration: 2,5 nM; Inkubationszeit beim kompetitiven Schritt: 30 min.

Weitere Versuche wurden mit Orangensaft, Weißwein und Mineralwasser durchgeführt. Dazu wurde erneut der pH-Wert der Matrices auf 7,4 eingestellt. Statt in Zentrifugenröhrchen zu zentrifugieren und den Überstand zu verwenden, wurden die Proben auf Ultrafiltrationseinheiten (Porengröße 10 kDa) aufgegeben, zentrifugiert und das Filtrat verwendet. Außerdem wurden 10 % Acetonitril zugegeben, um eventuelle unspezifische Bindungen zu unterbinden. Als zusätzliche Probe zu Orangensaft und Weißwein wurde Mineralwasser verwendet.

Das Ergebnis (siehe Abbildung 42) zeigte erneut, dass auch die Verdünnung, die pH-Einstellung und die Abtrennung der Schwebstoffe nicht zu einem Anstieg der Extinktion führten. In Mineralwasser hingegen erhielten wir hohe Extinktionswerte, die sogar höher waren als die in BB gemessenen Werte. Es drängte sich somit der Schluss auf, dass in den verwendeten Matrices Stoffe enthalten sein mussten, die eine Bindung zwischen Aptamer und BPA verhinderten.

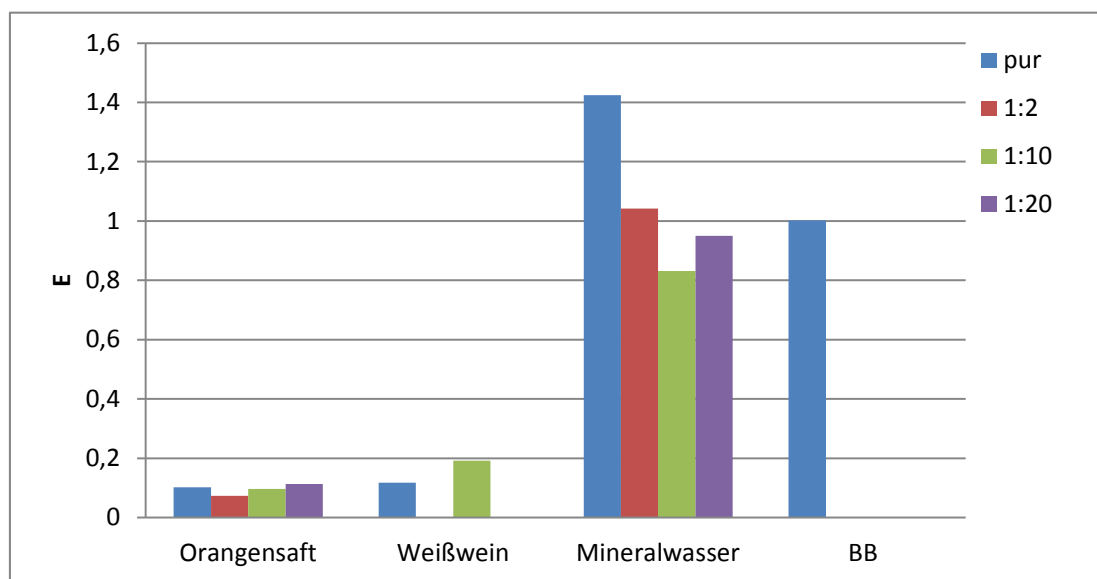


Abbildung 42: Anwendung des ELAA auf verdünnte Lebensmittelmatrizes (Orangensaft, Weißwein, Mineralwasser) nach Probenvorbereitung. Aptamerkonzentration: 2,5 nM; Inkubationszeit beim kompetitiven Schritt: 30 min.

4.4.2.4.5 Coca-Cola, Fanta

Weitere Versuche wurden mit Coca-Cola und Fanta durchgeführt, doch auch bei diesen Matrizes wurden Matrixeffekte beobachtet (siehe Abbildung 43).

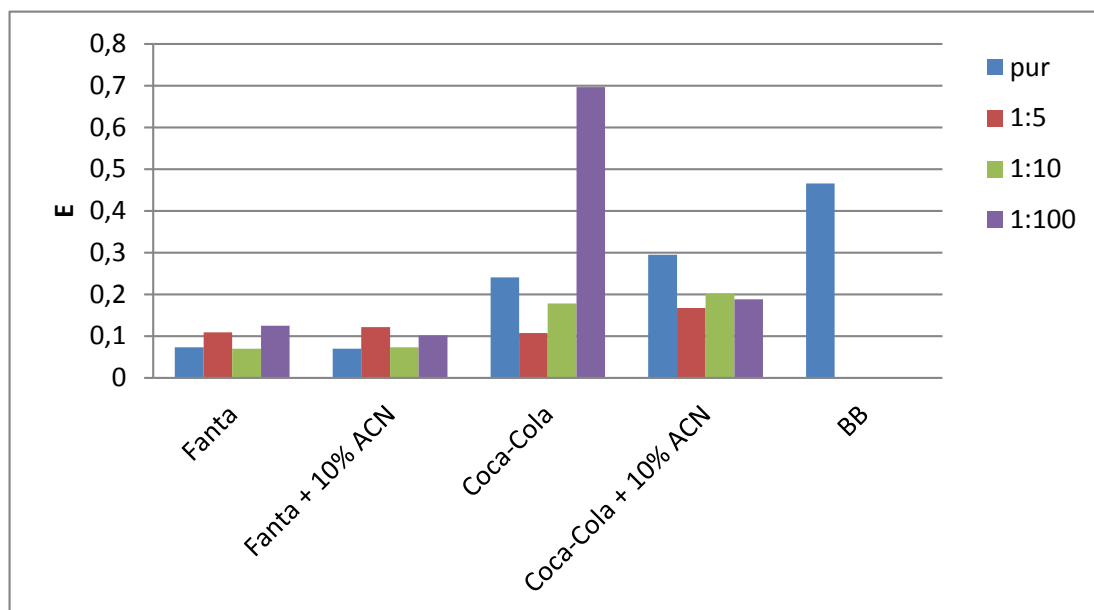


Abbildung 43: Anwendung des ELAA auf verdünnte Lebensmittelmatrizes (Coca-Cola, Fanta) nach Probenvorbereitung. Aptamerkonzentration: 2,5 nM; Inkubationszeit beim kompetitiven Schritt: 30 min.

4.4.2.5 Aptamerproblematik

4.4.2.5.1 Überprüfung des Einflusses von DNAsen

Die beobachteten Matrixeffekte waren wesentlich stärker als erwartet, was die Frage nach ihrer Ursache in den Raum stellte. Eine unserer ersten Vermutungen war, dass in den Matrizes enthaltene DNAsen das Aptamer abbauen und somit für die negativen Ergebnisse verantwortlich wären. Wir führten daher einige Versuche durch, um diese Hypothese zu prüfen.

Verschiedenen Proben (Weißwein und Orangensaft) sowie Bindungspuffer und ultrareinem Wasser wurden 40 nmol Aptamer zugesetzt. Nach 30 min Inkubation am Schüttler wurde die Aptamerkonzentration mittels Real-time PCR bestimmt. Im Falle einer DNase-Aktivität in den Proben sollte sich die Aptamerkonzentration verringern. Es war allerdings keine Abnahme der Aptamerkonzentration in den Lebensmittelmatrizes im Vergleich zu ultrareinem Wasser zu beobachten.

Nachdem Ergebnisse der Real-time PCR nicht auf eine DNase Aktivität in den Proben schließen ließen, wurde erneut ein ELAA mit Weißwein als Matrix durchgeführt. Verglichen wurden dabei filtrierter Weißwein und filtrierter, hitzebehandelter Weißwein. Für letzteren wurde die Weinprobe nach der Filtration für 30 min

auf ca. 80 °C erhitzt, um eine eventuell in der Probe vorhandene DNase zu inaktivieren. Die Vorbehandlungen hatten jedoch keinen Einfluss auf die Extinktion (siehe Abbildung 44). Daher musste die These, dass DNAsen für die Probleme mit der Probematrix verantwortlich seien, verworfen werden.

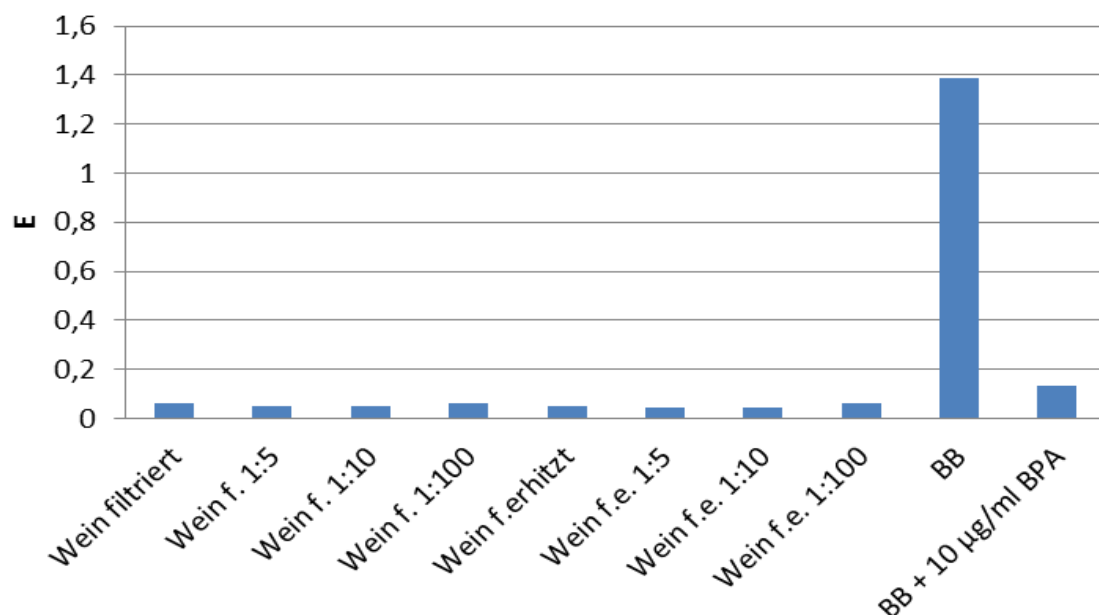
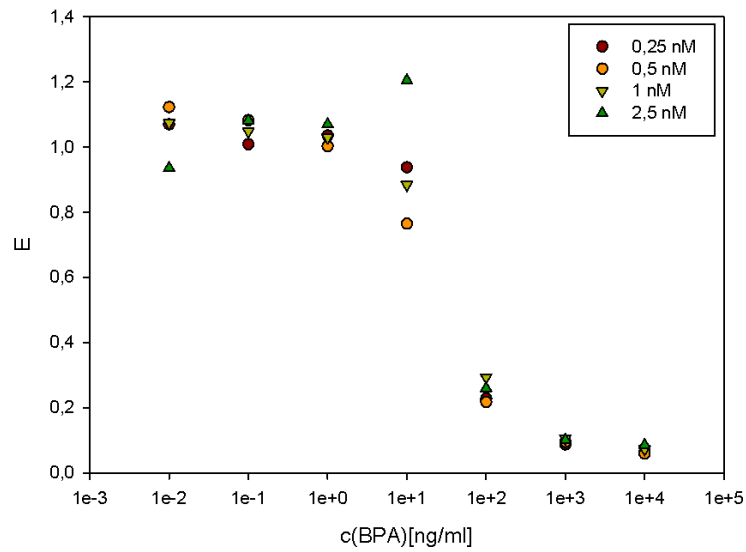


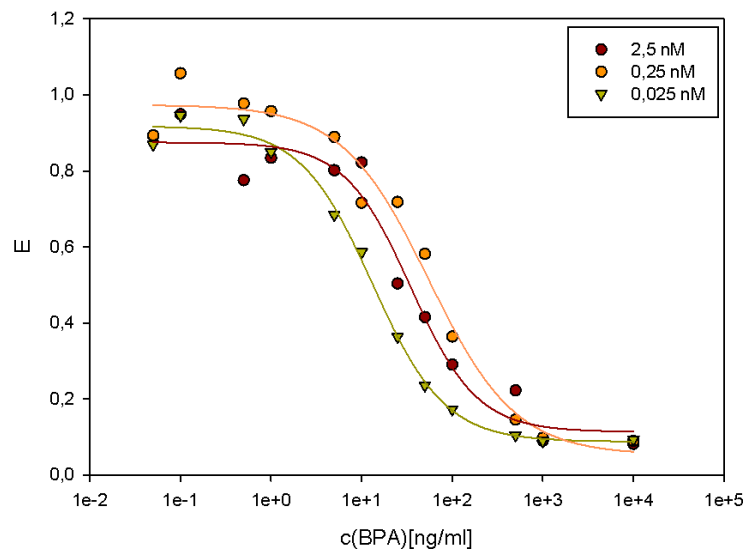
Abbildung 44: ELAA in Weißwein mit verschiedenen Probenvorbereitungsschritten zur DNase-Deaktivierung; e.: 30 min erhitzt auf 80 °C, f.: filtriert mittels Ultrafiltrationseinheit. Aptamerkonzentration: 2,5 nM; Inkubationszeit beim kompetitiven Schritt: 30 min.

4.4.2.5.2 Erneute Optimierung der Aptamerkonzentration

Eine weitere Hypothese war, dass die in BB optimierte Aptamerkonzentration nicht auf Realproben anwendbar ist. Daher wurde beschlossen, erneut Versuche zur Optimierung der Aptamerkonzentration durchzuführen. Dazu wurden auf einer Mikrotiterplatte Assays unter konstanten Bedingungen, aber mit unterschiedlicher Aptamerkonzentration durchgeführt (siehe Abbildung 45).



(a)



(b)

Abbildung 45: Einfluss der Aptamerkonzentration (0,0025-2,5 nM) auf die Kalibrierfunktion. Inkubationszeit beim kompetitiven Schritt: 30 min.

Nachdem die Aptamerkonzentration im Bereich von 0,025-2,5 nM nur einen geringen Einfluss auf die Kalibrierfunktion hatte, wurde ein weiterer Versuch durch-

geführt, bei dem die Aptamerkonzentration noch weiter erniedrigt und auch eine Negativkontrolle (Aptamerkonzentration 0) mitgemessen wurde. Wir erhielten das doch sehr überraschende Ergebnis, dass auch ohne Zugabe von Aptamer eine sigmoide Kalibrationskurve erhalten wurde (siehe Abbildung 46). Dieses Ergebnis bestätigte sich in weiteren Versuchen.

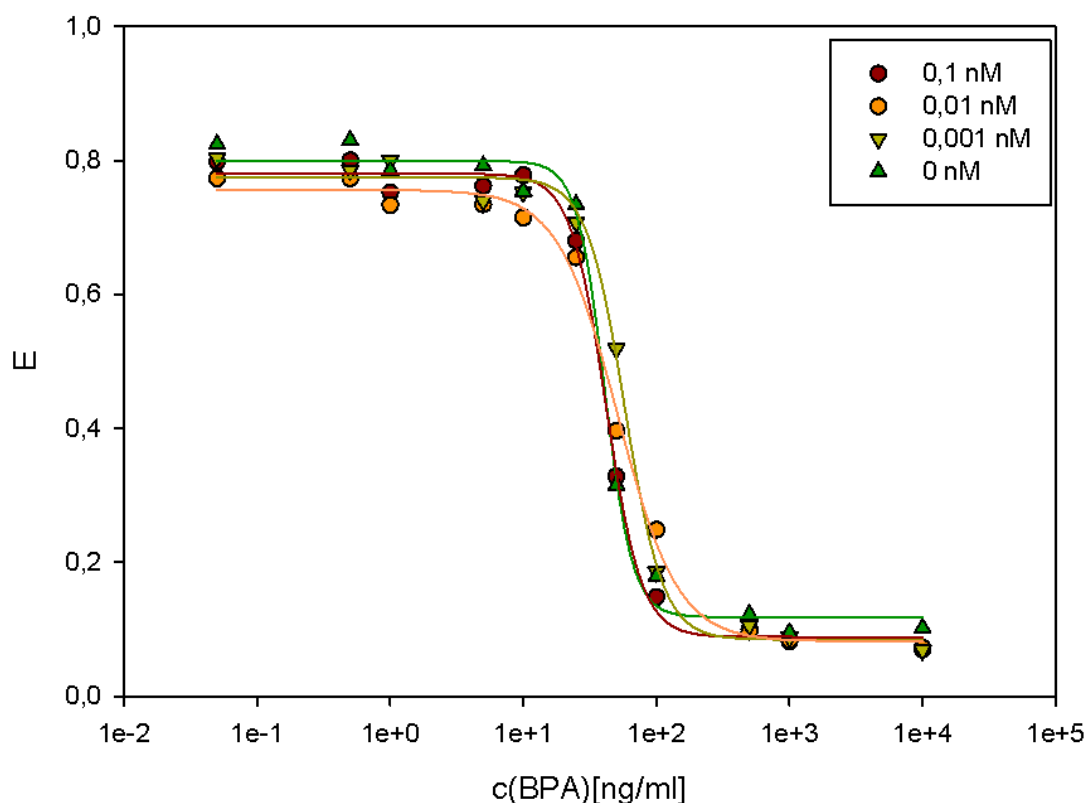


Abbildung 46: Einfluss der Aptamerkonzentration (0-0,1 nM) auf die Kalibrierfunktion. Inkubationszeit beim kompetitiven Schritt: 30 min

Da die Konzentrationsabhängigkeit von BPA auch ohne Zusatz des Aptamers gegeben war, mussten wir annehmen, dass eine unspezifische Bindung von BPA und dem BPA-HRP Konjugat, nicht aber die Bindung an das Aptamer der Grund für unsere bisher gesammelten Ergebnisse war. Im ELAA-System gibt es außer dem Aptamer prinzipiell drei Möglichkeiten zur Wechselwirkung mit BPA: die Oberfläche der Mikrotiterplatte, Avidin oder Casein. In der Literatur wurden unspezifische Wechselwirkungen von BPA mit der Oberfläche der Mikrotiterplatte,

Avidin oder Casein nicht beschrieben.

Als nächster Schritt galt es nun heraus zu finden, welcher der oben erwähnten Stoffe für die unspezifische Bindung verantwortlich war. Um zu testen, ob BPA unspezifisch an die Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden wird, wurde eine Mikrotiterplatte mit einem BPA-Standard (10 ng/ml in BB) befüllt und am Schüttler inkubiert. Die BPA-Konzentration des Standards und der nach 30 min bzw. 90 min Inkubationszeit entnommenen Aliquote wurde mittels HPLC-FL bestimmt. Dabei war keine Abnahme der BPA-Konzentration über die Zeit erkennbar (siehe Abbildung 47), eine Wechselwirkung mit den Mikrotiterplatten konnte daher ausgeschlossen werden.

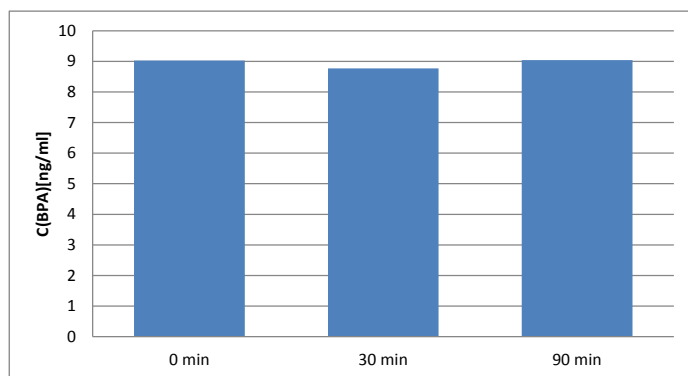
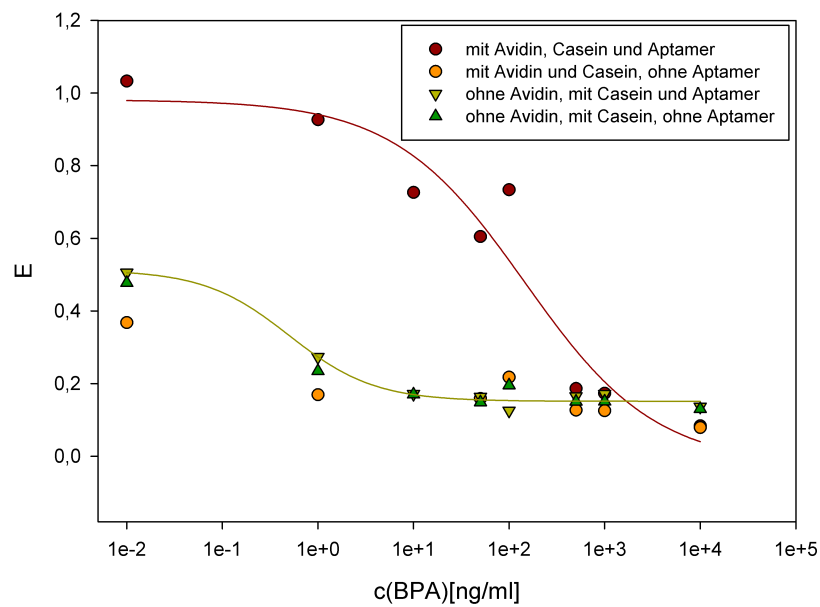


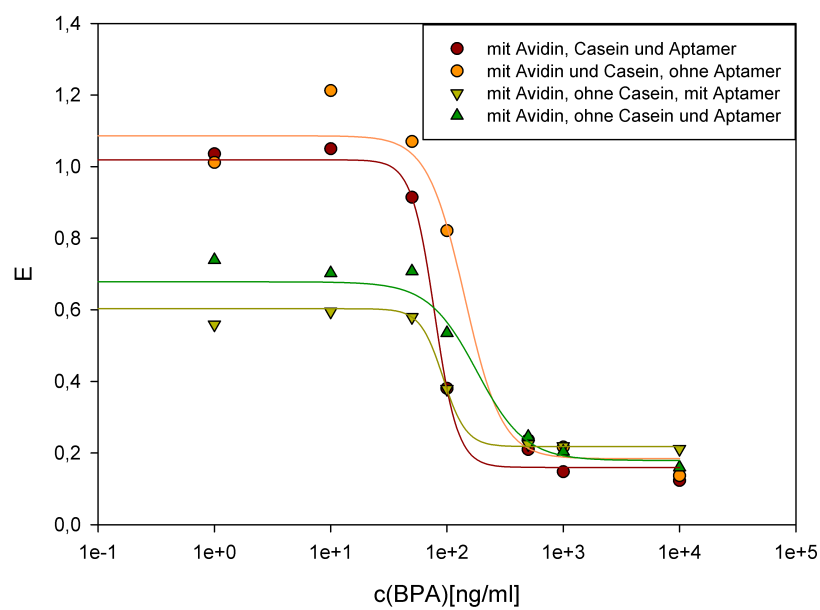
Abbildung 47: Test auf unspezifische Adsorption von BPA an die Mikrotiterplatte

Außerdem wurden zwei Assays durchgeführt, bei denen entweder das Aptamer, Avidin oder Casein nicht zugegeben wurde. Während die Ergebnisse auf der ersten Platte darauf schließen lassen, dass sigmoide Kalibrierfunktionen nur erhalten werden, wenn sowohl Avidin als auch das Aptamer zugesetzt werden (siehe Abbildung 48a), wurden auf der zweiten Mikrotiterplatte auch sigmoide Kurven erhalten, wenn das Aptamer nicht zugesetzt wurde (siehe Abbildung 48b). Die Ergebnisse sind daher etwas widersprüchlich. Dass auch ohne Zugabe des Aptamers sigmoide Kalibrierfunktionen erhalten wurden, wurde allerdings schon zuvor und auch bei späteren Versuchen des öfteren beobachtet, und so darf insgesamt angenommen werden, dass Platte 2 ein richtiges Bild lieferte. Eine Vermutung war, dass BPA an Avidin bindet. Um diese These zu untermauern, wurde auch ein Bindungsversuch in Ultrafiltrationseinheiten mit Avidin und Streptavidin durchgeführt, der allerdings zum Ergebnis kam, dass weder Avidin noch Streptavidin an BPA bindet (siehe Abschnitt 4.5.2.4).

Die Ursache der BPA-Konzentrationsabhängigkeit des Assays auch ohne Aptamer-Zugabe blieb leider ungeklärt. Um Kontaminationen als Grund für die beobachteten Effekte auszuschließen, wurden weitere Tests mit frisch hergestellten Reagenzien und Puffern durchgeführt, doch auch mit diesen wurden sigmoide Kalibrierfunktionen erhalten, wenn kein Aptamer zugesetzt wurde. Folglich konnten Aptamerkontaminationen als Grund ausgeschlossen werden.



(a)



(b)

Abbildung 48: Einfluss des Fehlens von Avidin, Casein bzw. des Aptamers auf die Kalibrierfunktion. Inkubationszeit beim kompetitiven Schritt: 30 min.

4.5 Bindungsversuche mit Ultrafiltrationseinheiten

Da bei den vorhergehenden Versuchen eine Bindung des Aptamers an BPA nicht beobachtet werden konnte, wurden Bindungsversuche mit Ultrafiltrationseinheiten (Porengröße 10^4 kDa) vorgenommen. Auch sollte so die beobachtete unspezifische Bindung von BPA (siehe Abschnitt 4.4.2.5) aufgeklärt werden. Diese Bindungsversuche wurden sowohl mit unmodifiziertem Aptamer als auch mit 5'-biotinyliertem Aptamer durchgeführt. Die genaue Durchführung der Versuche ist in Abschnitt 5.8 beschrieben.

BPA, Aptamer (bzw. Avidin, Streptavidin oder Casein) und Bindungspuffer wurden in die Filtrationseinheit pipettiert, eine halbe Stunde am Schüttler inkubiert und die Flüssigkeit danach abzentrifugiert. Das Filtrat wurde 1:1 mit H_2O verdünnt und die BPA-Konzentration mittels HPLC-FL bestimmt. Danach wurde die Einheit mit BB/ACN inkubiert und die Lösung abzentrifugiert, um gebundenes BPA zu eluieren. Die BPA-Konzentration des Eluats wurde ebenfalls mittels HPLC-FL bestimmt. Die ACN-Konzentration wurde schrittweise erhöht, bis das gesamte zugegebene BPA eluiert war.

4.5.1 Bindungsversuch mit dem biotinylierten Aptamer

In zwei Ultrafiltrationseinheiten wurden je 4 ml BPA-Standard ($c=50$ ng/ml, entspricht in etwa einer Menge von 1 nmol pro Einheit) in BB gegeben. Eine der beiden Einheiten wurde außerdem mit 1 nmol des biotinylierten Aptamers versetzt. Die Einheiten wurden 30 min unter Schütteln inkubiert, abzentrifugiert, die Lösung 1:1 mit H_2O verdünnt und die BPA-Konzentration mittels HPLC-FL bestimmt. Aus der Konzentration wurde auf die Menge des in der Lösung enthaltenen BPAs geschlossen. Danach wurden 4 ml BB/ACN (95:5, v/v) aufgegeben, um etwaige unspezifisch gebundene Komponenten zu entfernen. Die Einheiten wurden weitere 10 min geschüttelt, abzentrifugiert und die BPA-Menge im Eluat bestimmt. Dieser Schritt wurde auch mit BB/ACN (90:10, v/v), BB/ACN (80:20, v/v) sowie reinem ACN wiederholt. In Abbildung 49 sind die Ergebnisse dieses Versuchs dargestellt. Die sehr hohe unspezifische BPA-Adsorption der Filtrationseinheiten erschwerte die Interpretation des Ergebnisses. Trotzdem ist gut sichtbar, dass im Ansatz, bei dem das Aptamer zugesetzt wurde, nicht mehr BPA zurückgehalten wurde als im Ansatz ohne Aptamer.

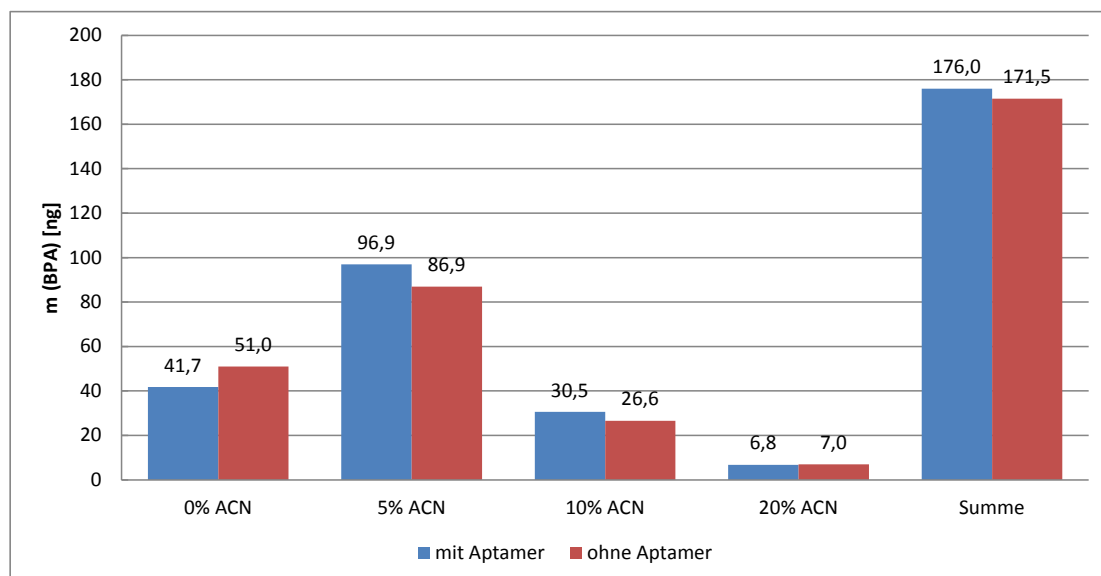


Abbildung 49: Ergebnisse des Bindungsversuchs mit biotinyliertem Aptamer in einer Ultrafiltrationseinheit. Gezeigt sind die Mengen an BPA, die in den Eluatens bestimmt wurden, sowie die Summe an wiedergefundenem BPA.

4.5.2 Bindungsversuche mit dem nicht-modifizierten Aptamer

Der oben beschriebene Versuch wurde auch mit dem nicht-modifizierten Aptamer durchgeführt, um ausschließen zu können, dass das an das Aptamer gebundene Biotin die Bindung zu BPA beeinträchtigt.

4.5.2.1 Inkubation in Filtrationseinheiten

Im Wesentlichen wurde die Versuchsanordnung von Abschnitt 4.5.1 beibehalten, nur dass statt dem biotinylierten Aptamer das nicht-modifizierte Aptamer eingesetzt wurde, und dass als Lösungsmittel für den aufgegebenen BPA-Standard BB/ACN (95:5, v/v) verwendet wurde, um die auftretende unspezifische Bindung von BPA an die Ultrafiltrationseinheiten etwas zu verringern.

Die Abbildung 50 zeigt, dass erneut keine Abnahme der BPA-Menge durch Bindung an das nicht-modifizierte Aptamer zu beobachten war. Eine Wechselwirkung zwischen dem Aptamer und BPA konnte nicht nachgewiesen werden. Allerdings war auch beim Ansatz mit 5 % ACN die unspezifische Bindung von BPA an die Filtrationseinheit ein erhebliches Problem.

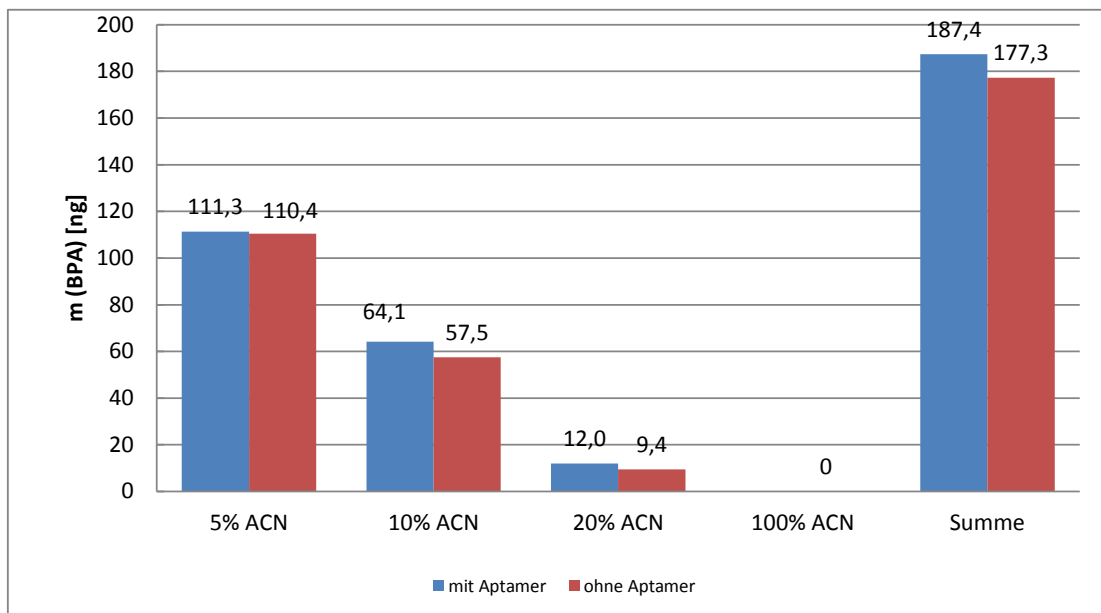


Abbildung 50: Ergebnisse des Bindungsversuchs mit unmodifiziertem Aptamer in einer Ultrafiltrationseinheit. Gezeigt sind die Mengen an BPA, die in den Eluatens bestimmt wurden, sowie die Summe an wiedergefundenem BPA.

4.5.2.2 Inkubation in Polypropylen-Röhrchen

Da im ersten Versuch trotz Zugabe von 5 % ACN die unspezifische Adsorption von Bisphenol A an die Filtrationseinheiten ein großes Problem war, wurde der Versuch wiederholt, der erste Inkubationsschritt jedoch in einem Polypropylen-Röhrchen durchgeführt. Je 4 ml eines BPA-Standards (50 ng/ml in BB/ACN, 95:5, v/v) wurden in zwei Polypropylen-Röhrchen gegeben, ein Röhrchen wurde zusätzlich mit 1 nmol Aptamer versetzt. Beide Mischungen wurden 30 min am Schüttler inkubiert, danach wurden sie in Ultrafiltrationseinheiten transferiert und abzentrifugiert. Anschließend wurden auf die Einheiten je 4 ml BB/ACN (90:10, v/v) aufgegeben und erneut abzentrifugiert. Die BPA-Konzentration der Fraktionen wurde mittels HPLC-FL bestimmt. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 51 dargestellt. Auch aus ihnen konnte nicht auf eine Wechselwirkung zwischen dem Aptamer und BPA geschlossen werden.

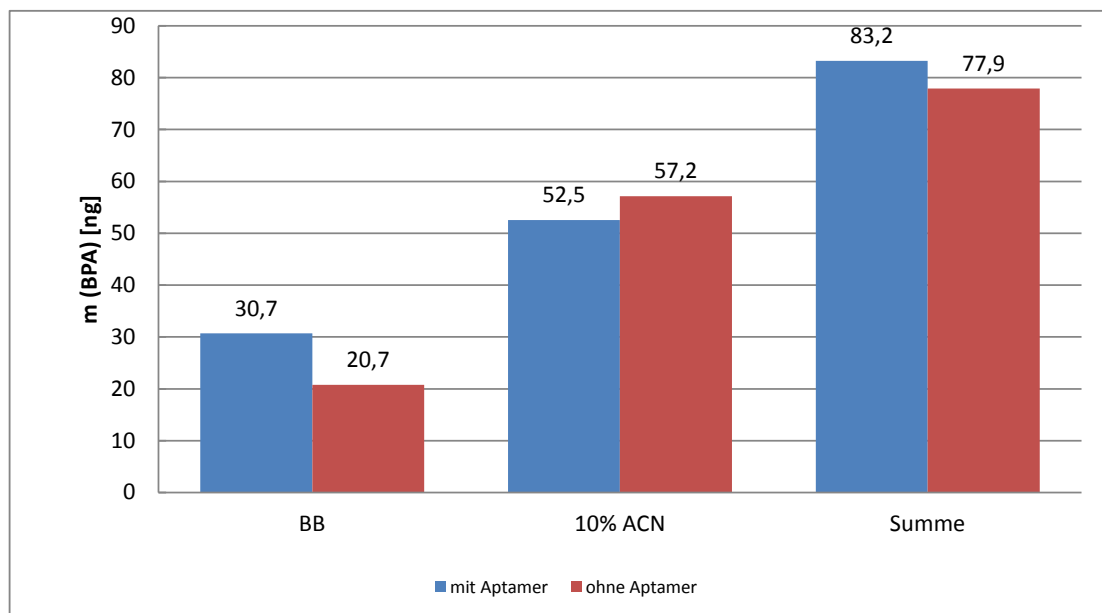


Abbildung 51: Ergebnisse des Bindungsversuchs mit unmodifiziertem Aptamer in PP-Röhrchen. Gezeigt sind die Mengen an BPA, die in den Eluatn bestimmt wurden, sowie die Summe an wiedergefundenem BPA.

4.5.2.3 Kurzzeiterhitzung des Aptamers

Nachdem in den vorhergegangenen Versuchen keine Bindung des Aptamers an BPA nachweisbar war, wurde nach weiteren Ursachen dafür gesucht. Theoretisch könnten die starken intra- bzw. intermolekularen Wechselwirkungen des Aptamers eine Bindung von BPA verhindern. Daher wurde das Aptamer vor der Verwendung für 3 min auf 95 °C erhitzt, um die DNA zu denaturieren und eventuelle Konglomerate zu spalten. Danach wurden, wie oben beschrieben, zwei Filtrations-einheiten mit je 4 ml BPA-Standard (50 ng/ml BB/ACN, 95:5, v/v) befüllt und in eine Einheit 1 nmol Aptamer zugegeben. Beide Mischungen wurden 30 min am Schüttler inkubiert, abzentrifugiert und die in den Filtraten enthaltene BPA-Menge mittels HPLC-FL bestimmt. Danach wurde mit BB/ACN (90:10, v/v) sowie reinem ACN eluiert. Die genaue Durchführung ist in Abschnitt 5.8.3 beschrieben. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 52 dargestellt. Auch nach einer Kurzzeiterhitzung des Aptamers konnte keine Wechselwirkung mit BPA beobachtet werden.

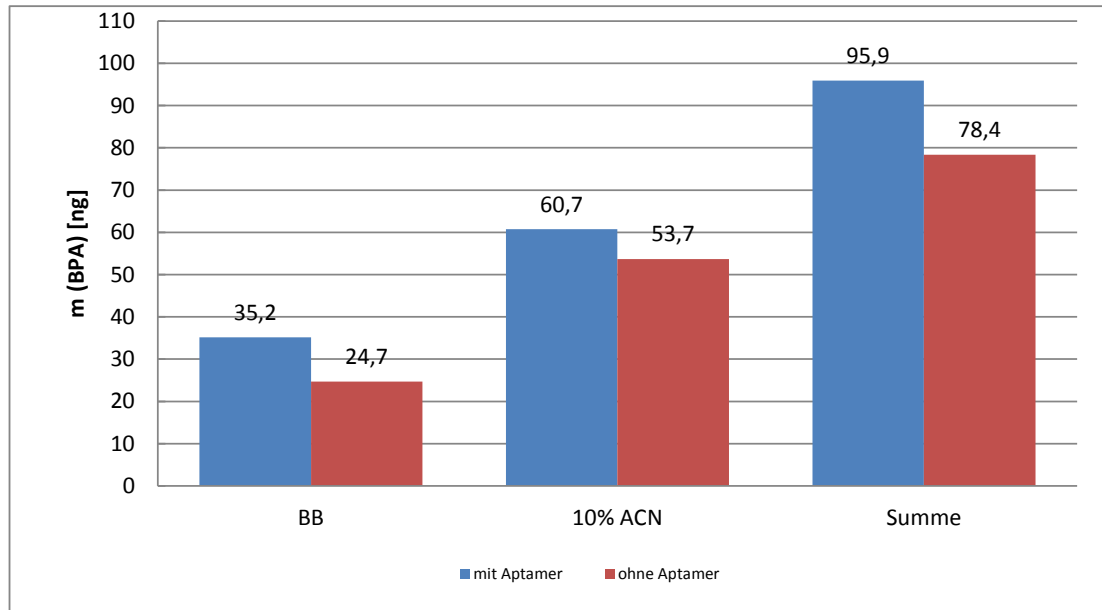


Abbildung 52: Ergebnisse des Bindungsversuchs mit hitzebehandeltem Aptamer in einer Ultrafiltrationseinheit. Gezeigt sind die Mengen an BPA, die in den Eluaten bestimmt wurden, sowie die Summe an wiedergefundenem BPA.

4.5.2.4 Bindungsversuche mit Avidin und Streptavidin

Zur Aufklärung der beobachteten unspezifischen Bindung von BPA (vgl. 4.4.2.5) wurde auch ein Bindungsversuch mit Streptavidin und Avidin durchgeführt. Aufgrund ihrer Größe (67,2 kDa bzw. 66 kDa) werden beide Proteine von der Membran der Ultrafiltrationseinheit zurückgehalten. Die Versuche wurden wie in Abschnitt 4.5.1 beschrieben durchgeführt. Die experimentellen Details sind in Abschnitt 5.8.3 beschrieben.

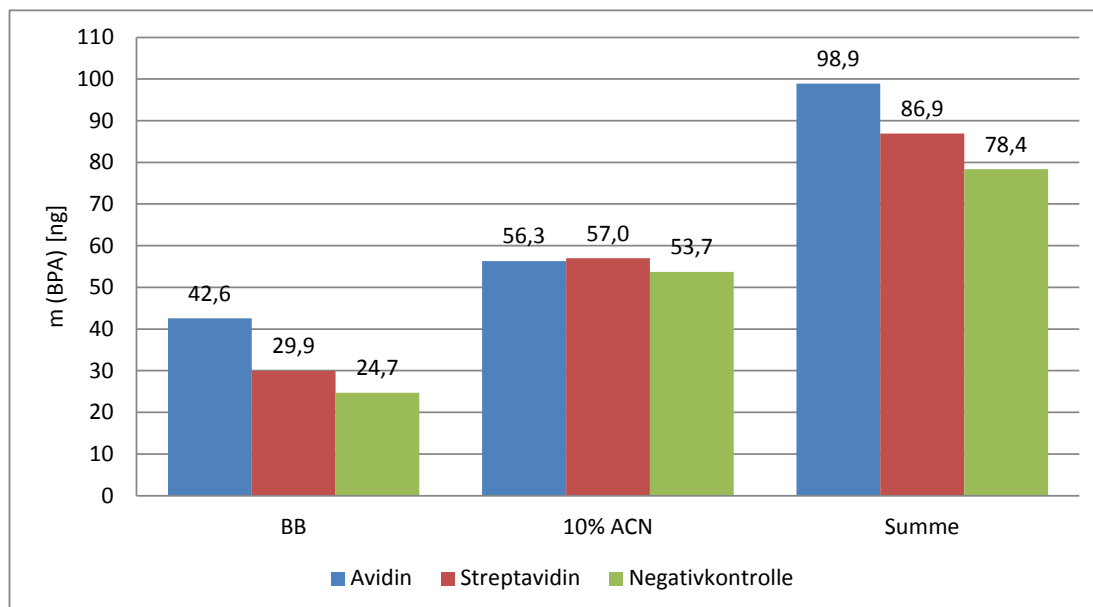


Abbildung 53: Bindungsversuch mit Avidin und Streptavidin in Ultrafiltrationseinheiten. Gezeigt sind die Mengen an BPA, die in den Filtraten und Eluaten bestimmt wurden, sowie die Summe an wiedergefundenem BPA. Bei der Negativkontrolle wurde der Ultrafiltrationseinheit nur der BPA-Standard zugegeben.

Aus diesem Versuch konnte auf keine Wechselwirkung zwischen Avidin bzw. Streptavidin und BPA geschlossen werden.

4.5.3 Schlussfolgerung

Die negativen Ergebnisse der Bindungsversuche zeichnen insgesamt das Bild, dass Aptamer und BPA nicht aneinander binden. Das ist insofern verwunderlich, da diese Bindung unter genau den von uns verwendeten Bedingungen (Bindungspuffer, Sol-Gel Methode) publiziert und patentiert wurde, und auch einzelne Ergebnisse (siehe z.B. Abschnitt 4.4.1) von uns durchaus darauf hingedeutet haben, dass das Aptamer BPA bindet. Diese Ergebnisse können aber zum Teil durch unspezifische Bindungen von BPA erklärt werden, die, wie auch das Beispiel der Ultrafiltrationseinheiten zeigt, oft und stark ausgebildet werden.

5 Experimenteller Teil

5.1 Verwendete Lösungen

Aptamer-Urlösungen:

100 μ M Aptamer (nicht-modifiziert, 5'-Biotin-modifiziert oder 5'-Phosphat-modifiziert) in H_2O .

Direkt nach Erhalt des Aptamers wurde dieses entsprechend der Angabe des Herstellers in einem bestimmten Volumen ultrareinem (UP) H_2O gelöst. Die so hergestellten Urlösungen wurden aliquotiert und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Avidinlösung:

1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Avidin in HEPES-Puffer.

2 mg Avidin wurden in 20 ml HEPES-Puffer gelöst. Die so erhaltene Urlösung (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurde bei Bedarf 1:100 verdünnt.

Bindungspuffer (BB):

25 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 25 mM KCl und 10 mM MgCl_2 in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (95:5, v/v), pH 8,0

Herstellung: 7,57 g Tris-HCl, 14,6 g NaCl, 4,66 g KCl und 5,08 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ wurden mit 125 ml DMSO versetzt und in 2,4 l bidest. H_2O gelöst. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 8,0 eingestellt.

Bindungspuffer M (BB_M):

PBS 1x, 1 mM MgCl_2 , 0,01 % Tween 20, pH 7,4

Herstellung: 1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 12,46 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8,5 g NaCl, 0,2 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und 100 mg Tween 20 wurden in 1 l bidest. H_2O gelöst, der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

Bisphenol A Urstandardlösung:

1 mg/ml BPA in ACN

Herstellung: 20 mg BPA wurden eingewogen und in 20 ml ACN gelöst.

Carbonatpuffer (CB):

50 mM, pH 9,6

Herstellung: 1,59 g Na_2CO_3 und 2,93 g NaHCO_3 wurden in 1 l bidest. H_2O gelöst, der pH wurde auf 9,6 eingestellt.

Caseinlösung zum Blocken:

2 % Casein, gelöst im jeweils verwendeten Bindungspuffer

Herstellung: Zu 2 g Casein wurden 100 ml Bindungspuffer gegeben und 30 min gerührt. Anschließend wurde die Lösung durch einen Schwarzbandfilter filtriert.

Elutionsbuffer (EB):

10 mM Tris-HCl und 1 mM EDTA in H_2O /Methanol (80:20, v/v), pH 9

Herstellung: 605 mg Tris-HCl und 186 mg $\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ wurden in 500 ml bidest. H_2O gelöst, der pH wurde mit NaOH auf 9,0 eingestellt. Zu dieser Lösung wurden 125 ml Methanol zugegeben.

HEPES-Puffer

25 mM HEPES, 4 mM NaCl, pH 7,4

Herstellung: 5,96 g HEPES und 223 mg NaCl wurden in 1 l bidest. H_2O gelöst, der pH wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

Imidazolpuffer (ImB):

0,2 M Imidazol in H_2O

Herstellung: 68 mg Imidazol wurden eingewogen und in 5 ml bidest. H_2O gelöst.

Mobile Phase für die HPLC:

50 % Acetonitril (ACN), 50 % H_2O

Herstellung: 500 ml ACN und 500 ml bidest. H_2O wurden gemischt und im Ultraschallbad ca. 10 min entgast.

PBS-Puffer (PBS):

10 mM NaH_2PO_4 , 70 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl , pH 7,6

1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 12,46 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 5,8 g NaCl wurden in 1 l bidest. H_2O gelöst, der pH wurde auf 7,6 eingestellt.

Primer-Lösungen für die Real-time PCR:

100 μM DNA-Primerlösung

Die Primer („forward“ P_F bzw. „backward“ P_B) wurden entsprechend der Angabe des Herstellers in einem bestimmten ultrareinem H_2O gelöst. Die so erzeugten Urlosungen (100 μM) wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Substratlösung:

Herstellung: 0,375 g Tetramethylbenzidin (TMB) wurden in 5 ml DMSO und 20 ml Methanol gelöst, die TMB-Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

Vor der Verwendung wurden 25 ml Substratpuffer mit 500 μl TMB-Lösung sowie 100 μl einer 1 %igen H_2O_2 -Lösung versetzt.

Substratpuffer:

5 mM Kaliumdihydrogencitrat, 1 mM Sorbinsäure, pH 4,5

Herstellung: 1,5 g Kaliumdihydrogencitrat und 0,1 g Sorbinsäure wurden in 1 l bidest. H_2O gelöst, der pH-Wert wurde auf 4,5 eingestellt.

5.2 Verwendete Chemikalien

Tabelle 8: Liste der verwendeten Chemikalien

Substanz	erworben von:
Acetonitril (ACN)	VWR
Aptamer, unmodifiziert	Sigma-Aldrich
Aptamer, 5'-Biotin modifiziert	Sigma-Aldrich
Aptamer, 5'-Phosphat modifiziert	Sigma-Aldrich
Aptamer-Primer B,F	Sigma-Aldrich
Avidin	Thermo Scientific
Bisphenol A	Sigma-Aldrich
BPA-Valeriansäure	Sigma-Aldrich
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
CarboxyLink Immobilisation Kit	Thermo Scientific
Casein	Sigma-Aldrich
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
EvaGreen Supermix	Bio-Rad
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
HEPES	Sigma-Aldrich
Glycerin	Roth
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich
Meerrettichperoxidase (HRP)	Thermo Scientific
Imidazol	Sigma-Aldrich
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Sigma-Aldrich
Na ₂ CO ₃	Sigma-Aldrich
NaCl	Fluka
NaHCO ₃	Merck
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Sigma-Aldrich
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	Sigma-Aldrich
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogencitrat	Sigma-Aldrich
KCl	Sigma-Aldrich
Ovalbumin	Sigma-Aldrich
Sorbinsäure	Sigma-Aldrich
Streptavidin	Thermo Scientific
Streptavidin-HRP Konjugat	Thermo Scientific
Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich
Tetramethylorthosilikat (TMOS)	Fluka
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
Wasser, bidestilliert	Institut für Analytische Chemie, Universität Wien
Wasser, ultrarein	Sigma-Aldrich

5.3 Verwendete Geräte

Real-time PCR:

Bio-Rad ICycler Thermo Cycler, IQ 5 Optical Module, IQ 5 Software

HPLC-Apparatur:

Merck Hitachi L-6200 Intelligent Pump, Merck Hitachi F-1080 Fluorescence Detector, Stratos Chromatography Software 4.6

Waschapparatur für Mikrotiterplatten:

Bio-Rad Immunowash Model 1575

Photometer:

Bio-Rad 680 XR Microplate Reader

Ultrafiltrationseinheiten:

MilliPore, Ultrafiltrationseinheiten aus Zellulose, max. Volumen 4 ml, Ausschlussgröße 10kDa

5.4 Validierung des Aptamers mittels Real-time PCR

Aus der Aptamer-Urlösung (Lösung A, $100 \mu\text{M} = 3,3479 \text{ mg/ml}$) wurde mit UP- H_2O eine Verdünnungsreihe im Konzentrationsbereich $2,24\text{-}2,22 \cdot 10^{-4} \text{ ng/ml}$ erstellt.

Die Primer-Urlösungen wurden für die Messung 1:10 ($2 \mu\text{l}$ Primer-Urlösung + $18 \mu\text{l}$ ultrareines H_2O) verdünnt.

Der Mastermix für die PCR wurde wie folgt hergestellt:

Tabelle 9: Herstellung des Mastermix für die Real-time PCR

Lösung	V[μl]
UP- H_2O	108
Primer F 1:10	6
Primer B 1:10	6

Für die PCR wurde folgendes Pipettierschema verwendet (Angabe pro well):

Tabelle 10: Pipettierschema für die Real-time PCR

Lösung	V[μ l]
Aptamer-Standard	2,5
Mastermix	10,0
EvaGreen Supermix	12,5

Die Bedingungen des PCR Laufs sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Die Fluoreszenzmessung ($\lambda_{\text{Anregung}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}} = 521 \text{ nm}$) erfolgte jeweils am Ende des Annealing-Schritts. Im Anschluss an den letzten PCR Zyklus wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Tabelle 11: Laufprotokoll für die Real-time PCR

Zyklus Nr.	Zeit [min:sec]	T [°C]	Wiederholungen	
1	03:00	95	1	Denaturierung
2	00:10	95	45	Denaturierung
	00:40	57		Annealing, Fluoreszenz-Messung
	00:10	68		Elongation
3	00:10	95	1	Denaturierung
4	00:30	55-95	81	Schmelzkurvenanalyse

5.5 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenz-Detektion (HPLC-FL)

Während meiner Arbeit wurde die BPA-Konzentration diverser Fraktionen und Eluate mittels HPLC-FL bestimmt. Die verwendete Apparatur ist in Abschnitt 5.3 aufgeführt. Die Parameter für die chromatographische Trennung sowie die Detektion sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Parameter der HPLC-FL Bestimmung von BPA

HPLC:

mobile Phase:	H ₂ O/ACN (50:50, v/v)
Fließgeschwindigkeit:	1 ml/min
Injektionsvolumen:	100 µl
Säule:	Phenomenex Polar-RP 80A Säule, 250 x 4,60 mm

Detektion:

λ _{Anregung} :	220 nm
λ _{Emission} :	300 nm

Das HPLC-FL System musste von Zeit zu Zeit für den Messbereich kalibriert werden. Dazu wurden fünf BPA-Standardlösungen im Konzentrationsbereich von 1-100 ng/ml injiziert.

5.6 Immobilisierung des Aptamers

5.6.1 Immobilisierung mit der Sol-Gel Methode

5.6.1.1 Herstellung des Sol-Gel Materials

Herstellung der Sol-Gel Gläser mit je 1 µg Aptamer pro Ansatz:

Herstellung der 1 µg/ml Aptamer-Lösung: 1,8 µl der Aptamer-Urlösung (33479 µg/ml) wurden mit 6 ml PBS gemischt.

Herstellung des Sol-Gel Glases: 0,3 ml HCl (0,04 M), 1,125 ml H₂O und 5,1 ml TMOS wurden in ein Becherglas pipettiert und 30 min auf Eis im Ultraschallbad behandelt. Dann wurde in fünf zuvor abgewogene Bechergläser je 1 ml der Aptamer-Lösung und 1 ml hydrolysiertes TMOS pipettiert, schnell gemischt und die Bechergläser erneut gewogen. Anschließend wurden die Bechergläser stehen gelassen, bis der gewünschte Massenverlust des Sol-Gel Glases (30-70 %) erreicht war. War das gewünschte Gewicht erreicht, wurde das Sol-Gel Glas mit einem Mörser zerkleinert, in ein Zentrifugenröhrchen transferiert und mit 5 ml PBS versetzt, um die Kondensationsreaktion zu stoppen. Nach einer Stunde am Schüttler wurden die Glaspartikel abzentrifugiert (3 min, 1000 x g), der Überstand entnommen, erneut 5 ml PBS zugegeben und 30 min geschüttelt. Nach erneutem Abzentrifugieren und Entnahme des Überstands wurde das Material in 5 ml PBS resuspendiert und bis zur Verwendung bei 4 °C in gelagert.

Analog dazu wurde ein Sol-Gel Glas ohne Aptamer hergestellt (statt Aptamer-Lösung 1 ml PBS, Massenverlust 50 %).

Herstellung der Sol-Gel Gläser mit je 25 μg Aptamer pro Ansatz:

Das Sol-Gel Material wurde wie oben beschrieben hergestellt, nur dass eine größere Menge des Aptamers zugegeben wurde (29,9 μl der Aptamer-Urlösung auf 4 ml PBS). Der Massenverlust der hergestellten Gläser lag im Bereich von 60-70 %.

Herstellung der Sol-Gel Gläser mit je 200 μg Aptamer pro Ansatz:

Das Sol-Gel Material wurde wie oben beschrieben hergestellt, nur dass eine größere Menge des Aptamers zugegeben wurde (59,7 μl der Aptamer-Urlösung auf 1 ml PBS). Der Massenverlust der hergestellten Gläser lag bei 70 %.

5.6.1.2 Ausblutungstest

Die Aptamerkonzentration der nach der Herstellung der Sol-Gel-Gläser entnommenen Überstände (siehe Abschnitt 5.6.1.1) wurden mittels Real-time PCR bestimmt. Dazu wurde wie in Abschnitt 5.4 beschrieben verfahren. Je 2,5 μl der Überstände wurden für die Messung eingesetzt, ihre Aptamerkonzentration wurde mittels der erstellten Kalibrierfunktion berechnet.

5.6.1.3 Bestimmung der Bindungskapazität im Batchversuch

1. Versuch:

In PBS gelagerte Sol-Gel Gläser (0,8 g, 0,7 g bzw. 0,6 g) mit einem Massenverlust von 60 %, 65 % bzw. 70 % und 25 μg Aptamer/Glas wurden abzentrifugiert (1000 x g, 2 min) und der Überstand wurde entnommen. Die Partikel wurden in je 2 ml einer BPA Standardlösung (10 ng/ml in BB) resuspendiert und 30 min geschüttelt. Danach wurde erneut abzentrifugiert (1000 x g, 2 min), die Überstände wurden entnommen. Dieses Verfahren wurde fünf Mal wiederholt. Am Schluss wurde das Säulenmaterial mit Wasser/ACN (50:50, v/v) gewaschen, erneut abzentrifugiert (1000 x g, 2 min) und das Säulenmaterial in 5 ml PBS resuspendiert. Die BPA-Konzentration der Überstände wurde mittels HPLC-FL bestimmt.

2. Versuch:

Das Säulenmaterial aus dem 1. Versuch wurde in 5 ml Glassäulen transferiert, um

das Sol-Gel Material vom Puffer abzutrennen. Nach Entfernen des PBS-Puffers wurde das Material zuerst mit 3 ml EB und danach je fünf Mal mit 3 ml BB gewaschen. Nun wurde das Material in Zentrifugenröhrchen transferiert, und mit je 3 ml einer 5 ng/ml BPA-Standardlösung in BB geschüttelt. Nach 60 min wurde das Säulenmaterial kurz abzentrifugiert (1000 x g, 1 min) und 0,5 ml des Überstands zur HPLC-Analyse entnommen. Nach weiteren 2,5 h Schütteln wurde abzentrifugiert und der Überstand für die BPA-Bestimmung entnommen. Das Säulenmaterial wurde in 5 ml BB resuspendiert.

5.6.1.4 Bestimmung der Bindungskapazität in Säulenversuchen

In BB:

Das Sol-Gel Glas mit 70 % Massenverlust und 200 μ g immobilisiertem Aptamer wurde in eine 5 ml Glassäule transferiert und fünf Mal mit je 2 ml BB gewaschen. Dann wurden acht Mal je 1 ml einer 50 ng/ml BPA-Standardlösung in BB aufgetragen und diese langsam durchtropfen gelassen. Die Fraktionen wurden gesammelt. Am Schluss wurde mit 5 ml BB/ACN (50:50, v/v) eluiert. Die BPA-Konzentration der ersten beiden Fraktionen sowie des Eluats wurde mittels HPLC-FL bestimmt.

In Rotwein:

Spiken des Rotweins: 10 ml Rotwein („Gran Dominio Reserva Rioja“, 2004) wurden mit 10 ml einer 0,5 ng/ml BPA-Standardlösung gemischt und 10 min im Ultraschallbad entgast.

Auf die mit BB regenerierte Säule wurde 20 Mal je 1 ml des gespikten Rotweins aufgegeben und langsam durchtropfen gelassen, wobei die Fraktionen gesammelt wurden. Danach wurde fünf Mal mit je 1 ml BB gewaschen, und mit 5 ml BB/ACN (50:50, v/v) eluiert. Die Säule wurde mit 20 Mal 1 ml BB regeneriert und bei 4° gelagert. Die BPA-Konzentration des Eluats wurde mittels HPLC-FL bestimmt.

5.6.2 Kovalente Immobilisierung

5.6.2.1 Herstellung der Säulen

Ein CarboxyLink Immobilisierungskit der Firma Thermo Scientific wurde gekauft und das Aptamer anhand der mitgelieferten Gebrauchsanweisung immobilisiert.

5.6.2.1.1 Immobilisierung des nicht-modifizierten Aptamers

1. Immobilisierung:

Herstellung der Aptamerlösung: 20 μl der Aptamer-Urlösung (100 μM) wurden mit 20 μl Imidazolpuffer (ImB) gemischt.

Herstellung der EDC-Lösung: 3,4 mg EDC wurden eingewogen, und in 114 μl H_2O und 114 μl ImB gelöst.

Nach dem Schütteln wurden 40 μl der Suspension entnommen und in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen transferiert. Dieses wurde 2 min bei 1000 x g zentrifugiert und danach der Überstand entnommen. Das Sediment wurde drei Mal mit je 80 μl H_2O gewaschen, und anschließend mit 40 μl Aptamerlösung sowie 80 μl EDC-Lösung versetzt, kurz durch Vortexen gemischt und dann 3 h geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde 3 min bei 1000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Säulenmaterial wurde drei Mal mit je 80 μl H_2O gewaschen, dann mit 400 μl BB überschichtet und bei 4 °C gelagert.

2. Immobilisierung:

Die Immobilisierung wurde wie oben beschrieben durchgeführt, nur dass eine größere Menge des Trägermaterials (500 μl der Suspension) verwendet wurde und die Volumina des ImB und der EDC-Lösung dementsprechend angepasst wurden.

5.6.2.1.2 Immobilisierung des 5'-Phosphat-modifizierten Aptamers

Herstellung der Aptamerlösung: 100 μl der Urlösung des phosphorylierten Aptamers (100 μM) wurden mit 900 μl ImB gemischt.

Herstellung der EDC-Lösung: 30 mg EDC wurden eingewogen und in 1 ml H_2O und 1 ml ImB gelöst.

Nach dem Schütteln wurden 2 ml der Suspension entnommen und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen transferiert. Nach Zentrifugation (2 min, 1000 x g) wurde der Überstand abgehoben. Das Sediment wurde zwei Mal mit je 2 ml H_2O sowie zwei Mal mit je 2 ml ImB gewaschen, und anschließend mit der hergestellten Aptamerlösung (1 ml) und der EDC-Lösung (2 ml) versetzt, kurz durch Vortexen gemischt und dann 3 h geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde 3 min bei 1000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Säulenmaterial wurde drei Mal mit je 2 ml BB gewaschen, dann mit 400 μl BB überschichtet und bei 4 °C gelagert.

5.6.2.2 Bindungstests

5.6.2.2.1 Versuche mit dem unmodifiziertem Aptamer

Die im **ersten Immobilisierungsansatz** erzeugten Säulenmaterialien (mit bzw. ohne Aptamer) wurden durch Zentrifugieren (2 min, 1000 x g) sedimentiert und die Überstände verworfen. 1 ml einer BPA-Standardlösung (10 ng/ml in BB) wurden zugegeben, durch Vortexen mit dem jeweiligen Säulenmaterial gemischt und 30 min am Schüttler inkubiert. Danach wurde das Säulenmaterial erneut durch Zentrifugation sedimentiert, die Überstände entnommen, 1:1 mit ACN verdünnt und ihre BPA-Konzentration mittels HPLC-FL bestimmt. Danach wurde der Vorgang (Zugabe der Standardlösung, Inkubation und Sedimentation) wiederholt. Anschließend wurde das Material zwei Mal für je 10 min mit je 1 ml BB gewaschen, und schließlich wurde das Säulenmaterial 5 min mit H₂O/ACN (50:50, v/v) geschüttelt, um eventuell gebundenes BPA zu eluieren. Nach der Sedimentation wurde die BPA-Konzentration des Überstands mittels HPLC-FL bestimmt. Das im **zweiten Immobilisierungsansatz** hergestellte Säulenmaterial wurde analog zum ersten Ansatz einem Bindungstest unterzogen, nur dass diesmal 20 min als Inkubationszeit gewählt wurden.

5.6.2.2.2 Versuche mit dem 5'-Phosphat-modifizierten Aptamer

Die BPA-Bindungskapazität des Säulenmaterials, an welches phosphoryliertes Aptamer immobilisiert worden war, wurde sowohl in einem „Batch“- , als auch in einem Säulenversuch getestet.

Für ersteren wurde zuerst das Säulenmaterial durch Zentrifugieren sedimentiert und der Überstand verworfen. Danach wurden 2 ml einer BPA-Standardlösung (150 ng/ml in BB) zugegeben, das Säulenmaterial durch kurzes Vortexen suspendiert und die Suspension 30 min geschüttelt. Nach erneuter Sedimentation wurde die BPA-Konzentration des Überstands mittels HPLC-FL bestimmt. Dieser Vorgang wurde zwei Mal wiederholt. Anschließend wurde das Material drei Mal in je 3 ml BB suspendiert und erneut sedimentiert, wobei die Überstände verworfen wurden. Anschließend wurden 5 ml BB/ACN (50:50, v/v) zugegeben, die Suspension wurde 30 s durch Vortexen gemischt, das Säulenmaterial erneut abzentrifugiert und die BPA-Konzentration des Überstands mittels HPLC-FL bestimmt. Das Säulenmaterial wurde mit 5 ml BB gewaschen, in 5 ml BBB resuspendiert und bei 4 °C gelagert.

Für den Säulenversuch wurde das Säulenmaterial zunächst vollständig in eine 5 ml

Glassäule transferiert, und zwei Mal mit je 2 ml BB gewaschen. Auf die Säule wurden sieben 1 ml-Portionen einer BPA-Standardlösung (5 ng/ml in BB) aufgetragen, langsam durchtropfen gelassen und die Fraktionen gesammelt. Anschließend wurde die Säule mit 10 ml BB gewaschen, und schließlich mit 5 ml EB eluiert. Die BPA-Konzentrationen der Fraktionen sowie des Eluats wurden mittels HPLC-FL bestimmt.

5.7 ELAA

5.7.1 Herstellung der Konjugate

Die Herstellung der Konjugate erfolgte nach einer Vorschrift aus einer Publikation von Krapivin et al.⁴⁴

5.7.1.1 BPA-Trägerprotein Konjugate

50 mg BPA-Valerat, 45 mg NHS und 72 mg DCC wurden eingewogen und durch 3 h Rühren in 1 ml DMFA gelöst. Die Suspension wurde durch Zentrifugation (1000 x g, 2 min) sedimentiert und 0,5 ml des Überstands wurden tropfenweise unter Rühren einer Lösung von 50 mg Trägerprotein (je nach Ansatz BSA oder Ovalbumin) in 3,5 ml CB zugegeben. Nach 3 h Rühren wurde die Lösung über Nacht bei 4 °C stehen gelassen und anschließend drei Tage gegen PBS dialysiert. Das erhaltene Konjugat wurde aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Proteinkonzentration des Konjugats wurde mittels der Bradford-Methode bestimmt, jedoch sahen wir bei weiteren Versuchen davon ab, da bei dieser Methode auch nicht an BPA gebundenes Protein miterfasst wird und die Aussagekraft der Ergebnisse somit relativ gering ist.

5.7.1.2 BPA-HRP Konjugat

50 mg BPA-Valerat, 45 mg NHS und 72 mg DCC wurden eingewogen und durch 3 h Rühren in 1 ml DMFA gelöst. Die Suspension wurde durch Zentrifugation (1000 x g, 2 min) sedimentiert und 0,5 ml des Überstands wurden tropfenweise unter Rühren einer Lösung von 50 mg HRP in 3,5 ml CB zugegeben. Nach 3 h Rühren wurde die Lösung in eine Ultrafiltrationseinheit (Ausschlussgröße 10kDa) gegeben, abzentrifugiert (20 min, 4000 x g) und der Rückstand drei Mal mit kaltem

PBS gewaschen. Das Konjugat wurde in 2 ml PBS und 2 ml Glycerin gelöst, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

5.7.2 Indirekt-kompetitiver Assay

5.7.2.1 „Coating“ der Mikrotiterplatte

Am Vorabend des jeweiligen Versuchs wurden je 200 μ l Konjugatlösung (Konzentrationen siehe Tabelle 13) in jedes well einer Mikrotiterplatte pipettiert und die Platte über Nacht bei 4 °C gelagert.

Tabelle 13: Übersicht über die während der Masterarbeit eingesetzten Konzentrationen an BPA-Protein Konjugat im indirekt-kompetitiven ELAA

Beschreibung des Versuchs	Trägerprotein	c (Konjugat)
Einfluss der Konjugatkonzentrationen (Abb. 29)	BSA	5, 10 μ g/ml
Einfluss der BPA-BSA Konjugatkonzentration (Abb. 30a)	Ovalbumin	1:50, 1:100, 1:250, 1:500

5.7.2.2 Blocken der freien Bindungsstellen

Nach dem maschinellen Waschen der Platten mit BB_M wurden diese 60 min mit 300 μ l Caseinlösung (Herstellung siehe Abschnitt 5.1) pro well inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren.

5.7.2.3 Kompetitiver Schritt

Nach dem Waschen der Platte wurden in die wells je 100 μ l BPA-Standardlösung (Konzentrationsbereich $1 \cdot 10^{-4}$ -10000 ng/ml) sowie 100 μ l einer Lösung des biotinylierten Aptamers (1 nM) pipettiert, und 30 min am Schüttler inkubiert.

5.7.2.4 Enzymreaktion und photometrische Messung

Nach dem Waschen der Platte wurden 200 μ l/well einer Streptavidin-HRP Konjugatlösung ($C = 1 \mu$ g/ml) zugegeben und abgedeckt 30 min unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Platte erneut gewaschen, dann wurden 200 μ l/well Substratlösung zugegeben. Die Platte wurde am Schüttler inkubiert, bis eine für die photometrische Messung ausreichend intensive Blaufärbung erhalten wurde. Dann wurde H₂SO₄ (100 μ l/well, 1 N) zugegeben, um die Reaktion zu stoppen. Die Extinktion der wells wurde im Photometer bei 450 nm gemessen.

5.7.3 Direkt-kompetitiver Assay

5.7.3.1 Avidinzugabe

In die Mikrotiterplatte wurden 200 μl /well Avidinlösung (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pipettiert, anschließend wurde die Platte 30 min am Schüttler inkubiert.

5.7.3.2 Blocken der freien Bindungsstellen

Nach dem Waschen der Platte, je nach verwendetem Bindungspuffer mit BB bzw. BB_M, wurden diese 45 min mit 300 μl Caseinlösung (Herstellung siehe 5.1) pro well inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren.

5.7.3.3 Aptamerzugabe

Nach dem Waschen der Platte wurden 200 μl /well eine Lösung des biotinylierten Aptamers zugegeben und 30 min am Schüttler inkubiert. Die Aptamerkonzentration variierte von Versuch zu Versuch. Tabelle 14 zeigt eine Übersicht über die während der Masterarbeit eingesetzten Konzentrationen.

Tabelle 14: Übersicht über die während der Masterarbeit eingesetzten Aptamerkonzentrationen im direkt-kompetitiven ELAA

Beschreibung des Versuchs	c (Aptamer) [nM]
Direkt-kompetitiver Vorversuch (Tab. 7)	1; 5; 10; 20
Einfluss der BPA-HRP Konzentration (Abb. 31, 32)	1; 5
Erste Kalibrierfunktion (Abb. 33)	5
Optimierung der Konjugatkonzentration (Abb. 34)	5
Einfluss des Konjugatalters (Abb. 35)	2,5
Einfluss der Aptamerkonzentration 1 (Abb. 36a)	1; 2,5
Einfluss der Aptamerkonzentration 2 (Abb. 36b)	1; 1,5; 2; 2,5
Optimierung der Inkubationszeit (Abb. 37)	2,5
ELAAs in diversen Probenmatrizes (Abschnitt 4.4.2.4)	2,5
DNAse-Test (Abb. 44)	10
Einfluss der Aptamerkonzentration 3 (Abb. 45a)	0,25; 0,5; 1; 2,5
Einfluss der Aptamerkonzentration 4 (Abb. 45b)	0,025; 0,25; 2,5
Einfluss der Aptamerkonzentration 5 (Abb. 46)	0; 0,001; 0,01; 0,1
Einfluss des Fehlens verschiedener Komponenten (Abb. 48)	0; 2,5

5.7.3.4 Kompetitiver Schritt

Die Platte wurden erneut gewaschen. Dann wurden BPA-Standardlösungen (je 100 μl /well) im Konzentrationsbereich 0,001-1000 ng/ml sowie eine Lösung des BPA-HRP Konjugats zugegeben und die Platte zwischen 15 und 60 min am Schüttler inkubiert. In Tabelle 15 sind die Konzentrationen und Volumina der zugegebenen BPA-HRP-Konjugat Lösungen zusammengefasst.

Bei manchen Assays wurde keine Standard-Verdünnungsreihe eingesetzt, sondern nur eine Lösung mit hoher BPA-Konzentration (10000 ng/ml) in BB oder Matrix sowie reiner BB bzw. reine Matrix (BPA-Konzentration 0). Tabelle 16 zeigt, bei welchen Versuchen welcher Bindungspuffer verwendet wurde. Tabelle 17 beschreibt die Lebensmittelmatrizes, in denen die BPA-Standards gelöst wurden.

Tabelle 15: Übersicht über die während der Masterarbeit eingesetzten Konzentrationen bzw. Verdünnungen des BPA-HRP Konjugats im direkt-kompetitiven ELAA.

Beschreibung des Versuchs	Verdünnung des BPA-HRP Konjugats	V(Zugabe)[μl]
Direkt-kompetitiver Vorversuch (Tab. 7)	1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000, 1:10000	10
Einfluss der BPA-HRP Konzentration (Abb. 31, 32)	1:200, 1:400, 1:600, 1:800	10
Erste Kalibrierfunktion (Abb. 33)	1:100	10
Optimierung der Konjugatkonzentration (Abb. 34)	1:500, 1:2000, 1:1000, 1:4000	100
Einfluss d. Konjugatalters (Abb. 35)	1:1000	100
Einfluss der Aptamerkonzentration 1 (Abb. 36a)	1:500	50
Einfluss der Aptamerkonzentration 2 (Abb. 36b)	1:2000	100
Optimierung der Inkubationszeit (Abb. 37)	1:2000	100
ELAAs in diversen Probenmatrizes (Abschnitt 4.4.2.4)	1:1000-1:2000	100
DNase-Test (Abb. 44)	1:1000	100
Einfluss der Aptamerkonzentration 3 (Abb. 45a)	1:1200	100
Einfluss der Aptamerkonzentration 4 (Abb. 45b)	1:1000	100
Einfluss der Aptamerkonzentration 5 (Abb. 46)	1:1000	100
Einfluss des Fehlens verschiedener Komponenten (Abb. 48)	1:1000	100

Tabelle 16: Übersicht über die während der Masterarbeit verwendeten Bindungspuffer im direkt-kompetitiven ELAA

Beschreibung des Versuchs	Bindungspuffer
Direkt-kompetitiver Vorversuch (Tab. 7)	BB _M
Einfluss der BPA-HRP Konzentration (Abb. 31, 32)	BB _M
Erste Kalibrierfunktion (Abb. 33)	BB _M
Optimierung der Konjugatkonzentration (Abb. 34)	BB _M
Einfluss d. Konjugatalters (Abb. 35)	BB _M
Einfluss der Aptamerkonzentration 1 (Abb. 36a)	BB _M
Einfluss der Aptamerkonzentration 2 (Abb. 36b)	BB _M
Optimierung der Inkubationszeit (Abb. 37)	BB _M
ELAAs in diversen Probenmatrizes (Abschnitt 4.4.2.4)	BB _M , BB
Einfluss der Aptamerkonzentration 3 (Abb. 45a)	BB
Einfluss der Aptamerkonzentration 4 (Abb. 45b)	BB
Einfluss der Aptamerkonzentration 5 (Abb. 46)	BB
Einfluss des Fehlens verschiedener Komponenten (Abb. 48)	BB

Tabelle 17: Übersicht über die während der Masterarbeit verwendeten Lebensmittelmatrizes im direkt-kompetitiven ELAA

Beschreibung des Versuchs	Matrix	evtl. Vorbehandlung der Matrix
direkt-kompetitiver Vorversuch (Tab. 7)	BB _M	
Einfluss der BPA-HRP Konzentration (Abb. 31, 32)	BB _M	
ELAA in Milch (38a)	Vollmilch	
ELAA in Weißwein (Abb. 38b)	Weißwein	
Test auf ACN-Beeinflussung des Assays (Abb. 39a)	BB _M /ACN (90:10, v/v)	
ELAA in Weißwein 2 (Abb. 39b)	Weißwein/ACN (90:10, v/v)	
ELAA in Weißwein (Abb. 39c)	Weißwein/ACN (90:10, v/v)	neutralisiert auf pH 7 mit NaOH
ELAA Römerquelle „Emotion“ 1 (Abb. 39d)	Römerquelle „Emotion“ (Apfel-Ribisl)/ACN (90:10, v/v)	10 min entgast im Ultraschallbad
ELAA Römerquelle „Emotion“ 2 (Abb. 39e)	Römerquelle „Emotion“ (Apfel-Ribisl)/BB/ACN (20:70:10, v/v/v)	10 min entgast im Ultraschallbad, neutralisiert auf pH 7 mit NaOH
ELAA in diversen Probenmatrizes 1 (Abb. 40)	Verschiedene Verdünnungen von: Orangensaft, Römerquelle Emotion Apfel-Ribisl, Weißwein, Rotwein, außerdem H ₂ O bidest. sowie BB _M	
ELAA in diversen Probenmatrizes 2 (Abb. 41)	verschiedene Verdünnungen von Orangensaft und Weißwein, außerdem BB	neutralisiert auf pH 7 mit NaOH, zum Teil 2 min zentrifugiert bei 2000 g
ELAA in diversen Probenmatrizes 3	verschiedene Verdünnungen von Orangensaft, Weißwein und Mineralwasser (H ₂ CO ₃ -hältig) sowie BB mit je 10 % ACN (Abb. 42)	filtriert mit 10kDa-Ultrafiltrationseinheiten, neutralisiert auf pH 7,4 mit NaOH
Versuch mit Cola, Fanta (Abb. 43)	Coca-Cola, Fanta, Coca-Cola/ACN (90:10, v/v), Fanta/ACN (90:10, v/v), außerdem BB	
DNase-Test (Abb. 44)	verschiedene Verdünnungen von Weißwein, außerdem BB	filtriert mit 10kDa-Ultrafiltrationseinheiten, neutralisiert auf pH 7,4 mit NaOH, je eine Verdünnungsstufe außerdem für 30 min auf ca. 80°C erhitzt.

5.7.3.5 Enzymreaktion und photometrische Messung

Nach Waschen der Platte wurden 200 μ l/well einer Streptavidin-HRP Konjugatlösung ($C = 1 \mu\text{g/ml}$) zugegeben, die Platte mit Aluminiumfolie abgedeckt und 30 min unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Platte erneut ge-

waschen, dann wurden 200 μl /well Substratlösung zugegeben, die Platte wurde am Schüttler inkubiert, bis eine für die photometrische Messung ausreichend intensive Blaufärbung erhalten wurde. Dann wurde H_2SO_4 (100 μl /well, 1 N) zugegeben, um die Reaktion zu stoppen. Die Extinktion der wells wurde im Photometer bei 450 nm gemessen.

5.8 Bindungsversuche in einer Ultrafiltrationseinheit

5.8.1 Mit dem biotinylierten Aptamer und dem unmodifizierten Aptamer

In zwei Ultrafiltrationseinheiten (Porengröße des Filters 10kDa) wurden je 3,8 ml BB sowie je 200 μl 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BPA-Standardlösung pipettiert. Eine Einheit wurde zusätzlich mit 10 μl der Urlösung des biotinylierten Aptamers (100 μM) versetzt. Nach 30 min Inkubation am Schüttler wurden die Einheiten ca. 20 min bei 4000 x g zentrifugiert und die BPA-Konzentration der Filtrate sowie eines Vergleichsstandards (3,8 ml BB + 200 μl 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BPA-Standard) mittels HPLC-FL bestimmt. Danach wurden in die Filtrationseinheiten je 4 ml BB/ACN (95:5, v/v) gegeben, 15 min geschüttelt, ebenfalls abzentrifugiert und in das HPLC-System injiziert. Anschließend wurden die Filtrationseinheiten nach dem gleichen Prozedere mit BB/ACN (90:10, v/v), BB/ACN (80:20, v/v) und unverdünntem ACN behandelt.

5.8.2 In Polypropylen-Röhrchen

In zwei PP-Röhrchen ($V_{\text{max}}=50$ ml) wurden je 3,8 ml BB/ACN (95:5, v/v) sowie je 200 μl BPA-Standardlösung (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pipettiert. Eine Einheit wurde zusätzlich mit 20 μl Aptamer-Urlösung (100 μM) versetzt. Nach 45 min Inkubation am Schüttler wurden die Einheiten ca. 20 min bei 4000 g zentrifugiert und die BPA-Konzentration der Filtrate sowie eines Vergleichsstandard (3,8 ml BB + 200 μl 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BPA-Standard) mit HPLC-FL bestimmt.

Danach wurden in die Filtrationseinheiten je 4 ml BB/ACN (90:10, v/v) gegeben, 15 min geschüttelt, ebenfalls abzentrifugiert und die Filtrate in die HPLC injiziert. Genauso wurde mit unverdünntem ACN verfahren.

5.8.3 Mit hitzebehandeltem Aptamer, Avidin bzw. Streptavidin

Hitzebehandlung des Aptamers: 20 μl Aptamer-Urlösung (100 μM) wurden direkt vor der Verwendung im Thermocycler 3 min auf 90 °C erhitzt.

In vier Ultrafiltrationseinheiten wurden je 3,6 ml BB sowie je 400 μl BPA-Standardlösung (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pipettiert. Je eine Einheit wurde zusätzlich mit 20 μl der erhitzten Aptamer-Urlösung, 40 μl Avidin-Lösung (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bzw. 4 μl Streptavidin-Lösung (1 mg/ml) versetzt. Nach 45 min Inkubation am Schüttler wurden die Einheiten ca. 20 min bei 4000 g zentrifugiert und die BPA-Konzentration der Filtrate sowie eines Vergleichsstandard (3,6 ml BB + 400 μl 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BPA-Standard) wurde mittels HPLC-FL gemessen.

Danach wurden in die Filtrationseinheiten je 4 ml BB/ACN (90:10, v/v) gegeben, 15 min geschüttelt und abzentrifugiert. Die BPA-Konzentration des Eluats wurde mittels HPLC-FL bestimmt.

6 Zusammenfassung

Bisphenol A (BPA) ist eine Lebensmittelkontaminante, die aufgrund der gut dokumentierten Auswirkungen auf die Gesundheit des menschlichen Organismus und des breiten Anwendungsbereichs der Chemikalie in der letzten Jahren intensiv diskutiert wurde. Für die Überwachung des Einhaltens der gesetzlichen Grenzwerte sind leistungsstarke Analysenmethoden gefragt. Hier kommen u.a., vor allem aufgrund ihrer hohen Spezifität und den damit verbundenen Vorteilen in komplexen Probenmatrizes, immunanalytische Methoden zum Einsatz.

Aptamere sind Nukleinsäuren, die an bestimmte Zielmoleküle binden, und so u.a. auch in der analytischen Chemie eingesetzt werden. Gegenüber Antikörpern haben sie einige Vorteile, so sind sie z.B. chemisch synthetisierbar und daher billiger und in unbeschränkten Mengen verfügbar. Da sie aufgrund ihrer Affinität ähnliche Anwendungsgebiete haben wie die in der Analytik bereits etablierten Antikörper, ist es naheliegend, immunanalytische Methoden für die Anwendung von Aptameren zu adaptieren.

In dieser Masterarbeit wurde versucht, ein von Jo et al. publiziertes BPA-bindendes Aptamer⁴⁷ für die Entwicklung zweier analytischer Methoden zur Bestimmung von BPA zu verwenden.

Für die Entwicklung von **Aptamer-Affinitätssäulen** als Methode der Probenvorbereitung wurde zuerst das Aptamer mittels der Sol-Gel Methode immobilisiert. Aus dem Ergebnis einer darauf folgenden Bestimmung der Bindungskapazität konnte nicht geschlossen werden, dass das Aptamer eine Affinität für BPA aufweist. Also wurde versucht, das Aptamer (sowohl in nicht-modifizierter als auch in 5'-Phosphat-modifizierter Form) durch kovalente Bindung an Agarosepartikel zu immobilisieren. Doch auch mit den auf diese Art hergestellten Säulen konnte keine ausreichende Bindungskapazität bzw. keine Bindungsaffinität des Aptamers zu BPA nachgewiesen werden.

Bei der Entwicklung von **Enzyme-linked Aptamer Assays (ELAAs)** als direkte Screeningmethoden wurden zu Beginn der Arbeit durchaus positive Resulta-

te erzielt. Eine BPA-Konzentrationsabhängigkeit der erhaltenen Extinktionswerte konnte nachgewiesen werden und besonders für den direkt-kompetitiven ELAA wurden Kalibrierfunktionen mit gut auswertbarem sigmoiden Verlauf erhalten. Wurde der ELAA allerdings in Lebensmittelmatrizes angewandt, war ein Zusammenhang zwischen Extinktion und der Konzentration an zugesetztem BPA nicht mehr zu beobachten. Es wurden Versuche durchgeführt, um diesem Effekt auf den Grund zu gehen. Die anfängliche Vermutung, in den Lebensmitteln enthaltene DNAsen würden das Aptamer abbauen, konnte als Grund widerlegt werden. Optimierungsversuche, bei denen in Bindungspuffer ohne Zugabe des Aptamers eine BPA-Konzentrationsabhängigkeit der Extinktion sichtbar war, deuteten darauf hin, dass das Aptamer nicht in der Lage war, BPA zu binden.

Um das zu verifizieren, wurden Bindungstests in Ultrafiltrationseinheiten durchgeführt, durch die wir zum Schluss kamen, dass das Aptamer in unseren Versuchsanordnungen tatsächlich keine Bindungsaffinität zu BPA zeigte.

Um herauszufinden, welche Komponente in der ELAA-Versuchsanordnung an BPA band, und damit für den konzentrationsabhängigen Verlauf der Kalibrierfunktionen verantwortlich war, wurden weitere Bindungstests, u.a. mit Avidin und Casein, durchgeführt, in denen allerdings keine Bindung von BPA durch die getesteten Komponenten zu beobachten war.

Das eigentliche Ziel der Masterarbeit, nämlich die Entwicklung von Methoden zur Bisphenol A - Analyse mit Hilfe von Aptameren, konnte also nicht erreicht werden. Bei ELAAs konnte in Matrizes, die keine biologischen Proben enthielten, zwar eine BPA-Abhängigkeit der Extinktion bei der photometrischen Messung dokumentiert werden, diese bleibt jedoch vor dem Hintergrund der nicht beobachteten Affinität des Aptamers zu BPA ein Rätsel.

7 Anhang

Abstract (Deutsch)

Bisphenol A (BPA) ist eine für die Erzeugung von Kunststoffen eingesetzte Massensubstanz. Aufgrund der Verwendung von BPA-haltigen Kunststoffen in Lebensmittelverpackungen und anderen Lebensmittelkontaktmaterialien kann es zur Migration von BPA in Lebensmittel und in weiterer Folge zur Exposition des Menschen gegenüber BPA kommen. BPA wirkt durch seine Affinität zu Östrogenrezeptoren als endokriner Disruptor, und wird für eine Reihe von negativen gesundheitlichen Effekten auf den Menschen verantwortlich gemacht. In der Folge sind leistungsstarke analytische Methoden gefragt, um die Einhaltung der gesetzlichen Grenzwerte für BPA kontrollieren zu können.

In der Lebensmittelanalytik werden häufig immunanalytische Methoden eingesetzt, weil diese eine hohe Selektivität aufweisen. Aptamere sind Nukleinsäuresequenzen, die durch einen *in vitro* Selektionsprozess (SELEX) so entworfen werden, dass sie spezifisch an Zielmoleküle binden können. Sie haben gegenüber Antikörpern einige Vorteile, u.a. sind sie chemisch synthetisierbar und daher billiger als Antikörper, sowie in unbegrenzten Mengen verfügbar. Ihre Anwendung in der analytischen Chemie ist ein junges Forschungsgebiet mit viel Potential.

In dieser Masterarbeit wurde mit Hilfe eines von einer koreanischen Gruppe publizierten BPA-bindenden Aptamers versucht, sowohl eine Methode der Probenvorbereitung als auch eine direkte Screeningmethode für Bisphenol A zu entwickeln. In den Versuchen, das Aptamer entweder kovalent oder mittels der Sol-Gel Methode an ein Trägermaterial zu immobilisieren, konnte allerdings keine Affinität des Aptamers zu BPA festgestellt werden. Die entwickelten Enzyme-linked Aptamer Assays (ELAAs) lieferten Anfangs vielversprechende Ergebnisse, die jedoch bei der Anwendung der ELAAs auf Lebensmittelmatrizes nicht wiederholt werden konnten. Als Grund dafür vermuteten wir u.a. einen Abbau des Aptamers durch DNAsen, eine Hypothese, die sich jedoch nicht bestätigte.

Schließlich wurden Bindungsversuche durchgeführt, durch die wir zum Schluss kamen, dass das Aptamer in unseren Versuchsanordnungen keine Affinität zu BPA zeigte. Der Grund für das Funktionieren des ELAA bei Abwesenheit von Lebensmittelmatrizes - auch ohne Zugabe von Aptamer - konnte nicht ermittelt werden.

Abstract (English)

Bisphenol A is a chemical substance used in the synthesis of a variety of plastics. Studies have shown that BPA can migrate from plastic containers and epoxy resins into foodstuffs. It is well known that humans are exposed to low concentrations of BPA, a matter that was intensively discussed over the last years as BPA is known to bind to estrogen receptors. Thus BPA is an endocrine disruptor, and many negative health effects caused by the exposition to BPA have been reported. Analytical methods are necessary in order to verify if the BPA concentration in foodstuffs is below the maximum levels established.

Due to their high selectivity, immunoanalytical methods play an important role in food analysis. Their high specificity helps with the problem of very complex sample matrices. Aptamers are nucleic acid sequences that are designed by an *in vitro* selection process, called SELEX, to specifically bind target molecules. They have certain advantages over antibodies, e.g. they are cheaper than antibodies because they can be chemically synthesised in unlimited amounts. Aptamers are assumed to have a high potential in analytical chemistry.

The master thesis aimed at the development of analytical methods for the determination of BPA by using a BPA-binding aptamer that was discovered by a Korean research group in 2011. Both a method for sample clean-up and a screening method for direct analysis of food matrices should be developed.

The first step in the development of a sample clean-up method was the immobilisation of the aptamer on a carrier material. Immobilisation was carried out either by covalent binding to agarose particles or by entrapment by the sol-gel method. Binding studies indicated, however, that the immobilised aptamer did not show an affinity for BPA. In contrast, promising results were obtained when using the aptamer in an enzyme-linked aptamer assay (ELAA) - at least at the beginning. When the ELAA was applied to various food matrices, these results could, however, not be repeated. Finally, we found out that a sigmoid calibration curve was obtained even when no aptamer was added. This phenomenon can only be explained by non-specific binding of BPA. We came to the conclusion, that the aptamer does not show an affinity under the experimental conditions applied.

The reason why the ELAA was working - even without adding aptamer - as long as no food matrix was present could not be found.

Abbildungsverzeichnis

1	Strukturformel von Bisphenol A	1
2	Synthese von Bisphenol A	2
3	Synthese von Polycarbonat	2
4	Synthese von Epoxidharz	3
5	Strukturformel von 17β -Östradiol	4
6	Skizze der ER-Signaltransduktion	5
7	Übersicht über die analytischen Methoden zur Bestimmung von BPA in Lebensmitteln	9
8	Struktur von DNA bzw. RNA	19
9	Der Selex-Prozess	21
10	Prozess und benötigte Zeit zur Herstellung eines Serum-stabilen Aptamers	27
11	Erhöhung der Aussagekraft des diagnostischen Verfahrens durch Kombination von PET und CT	28
12	Sequenz und Sekundärstruktur von Pegaptanib	29
13	Strukturformel von TMOS	31
14	Mechanismus der Sol-Gel Bildung	32
15	Mechanismus der kovalenten Immobilisierung	33
16	Mechanismus des indirekt-kompetitiven bzw. des direkt-kompetitiven ELAA	34
17	Elektrochemischer Aptamer-Sensor für Thrombin	37
18	Struktur und Sequenz des BPA-bindenden Aptamers	39
19	Überprüfung der Identität des Aptamers mittels Real-time PCR . .	41
20	Kalibrierfunktion für die Real-time PCR	42
21	Repräsentative HPLC-FL Kalibrierfunktion für die Bestimmung von Bisphenol A	43
22	Einfluss der Porengröße auf das Ausbluten des Aptamers	44

23	Bestimmung der Bindungskapazität der Aptamer Sol-Gel Gläser im Batchversuch	45
24	Bestimmung der Bindungskapazität der Aptamer Sol-Gel Gläser im Batchversuch	46
25	Ergebnisse des Batchversuchs zur Bestimmung der Bindungskapazität des an Säulenmaterial immobilisierten nicht-modifizierten Aptamers	49
26	Ergebnisse des Batchversuchs zur Bestimmung der Bindungskapazität des an Säulenmaterial immobilisierten nicht-modifizierten Aptamers	50
27	Ergebnisse des Batchversuchs zur Bestimmung der Bindungskapazität des an Säulenmaterial immobilisierten Phosphat-modifizierten Aptamers	52
28	Ergebnisse des Säulenversuchs zur Bestimmung der Bindungskapazität des an Säulenmaterial immobilisierten Phosphat-modifizierten Aptamers	53
29	Einfluss der BPA-BSA und Streptavidin-HRP Konjugat Konzentration auf die Kalibrierfunktion im indirekt-kompetitiven ELAA . . .	56
30	Indirekt-kompetitiver ELAA-Versuch mit variabler Coating-Konzentration	57
31	Einfluss der BPA-HRP Konzentration auf die Kalibrierfunktion . .	60
32	Einfluss der BPA-HRP Konzentration auf die Kalibrierfunktion . .	60
33	Erste Kalibrierfunktion für den direkt-kompetitiven ELAA	61
34	Einfluss der Konjugatkonzentration auf die Kalibrierfunktion	62
35	Einfluss des Alters des Konjugats auf die Kalibrierfunktion	63
36	Einfluss der Aptamerkonzentration auf die Kalibrierfunktion	65
37	Optimierung der Inkubationszeit	66
38	Anwendung des direkt-kompetitiven ELAA auf Milch bzw. Weißwein	68
39	Einfluss der Lebensmittelmatrix auf die Kalibrierfunktion	70
40	Anwendung des ELAA auf verdünnte Lebensmittelmatrizes	71
41	Anwendung des ELAA auf verdünnte Lebensmittelmatrizes (Orangensaft, Weißwein) nach Probenvorbereitung	72
42	Anwendung des ELAA auf verdünnte Lebensmittelmatrizes (Orangensaft, Weißwein, Mineralwasser) nach Probenvorbereitung	73

43	Anwendung des ELAA auf verdünnte Lebensmittelmatrizes (Coca-Cola, Fanta) nach Probenvorbereitung	74
44	ELAA in Weißwein mit verschiedenen Probenvorbereitungsschritten	75
45	Einfluss der Aptamerkonzentration (0,025-2,5 nM) auf die Kalibrierfunktion	76
46	Einfluss der Aptamerkonzentration (0-0,1 nM) auf die Kalibrierfunktion	77
47	Test auf unspezifische Adsorption von BPA an die Mikrotiterplatte	78
48	Einfluss des Fehlens von Avidin, Casein bzw. des Aptamers auf die Kalibrierfunktion	80
49	Ergebnisse des Bindungsversuchs mit biotinyliertem Aptamer in einer Ultrafiltrationseinheit	82
50	Ergebnisse des Bindungsversuchs mit unmodifiziertem Aptamer in einer Ultrafiltrationseinheit.	83
51	Ergebnisse des Bindungsversuchs mit unmodifiziertem Aptamer in PP-Röhrchen	84
52	Ergebnisse des Bindungsversuchs mit hitzebehandeltem Aptamer in einer Ultrafiltrationseinheit	85
53	Bindungsversuch mit Avidin und Streptavidin in Ultrafiltrationseinheiten	86

Tabellenverzeichnis

1	Auswahl dokumentierter Effekte, verursacht durch die östrogene Wirkung von BPA	6
2	Kommerziell erhältliche BPA-bindende Antikörper bei verschiedenen Herstellern	13
3	Verschiedene SELEX-Modifikationen (Auswahl)	25
4	Aptamere und zugehörige Dissoziationskonstanten für einige Analyten	30
5	Ergebnisse des Ausblutungstest	44
6	Ergebnis des Sol-Gel Säulen-Bindungsversuchs	47
7	Direkt-kompetitiver ELAA Vorversuch	59
8	Liste der verwendeten Chemikalien	90
9	Herstellung des Mastermix für die Real-time PCR	91
10	Pipettierschema für die Real-time PCR	92
11	Laufprotokoll für die Real-time PCR	92
12	Parameter der HPLC-FL Bestimmung von BPA	93
13	Übersicht über die während der Masterarbeit eingesetzten Konzentrationen an BPA-Protein Konjugat im indirekt-kompetitiven ELAA	99
14	Übersicht über die während der Masterarbeit eingesetzten Aptamerkonzentrationen im direkt-kompetitiven ELAA	100
15	Übersicht über die Verdünnungen des BPA-HRP Konjugats im direkt-kompetitiven ELAA	101
16	Übersicht über die verwendeten Bindungspuffer im direkt-kompetitiven ELAA	102
17	Übersicht über die verwendeten Lebensmittelmatrizes im direkt-kompetitiven ELAA	103

Abkürzungsverzeichnis

ACN Acetonitril

BSA Bovines Serum Albumin

BB Bindungspuffer

BB_M Bindungspuffer „M“

BPA Bisphenol A

CB Carbonatpuffer

CT Computertomographie

DADPA Diaminodipropylamin

DCC N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid

DMFA Dimethylformamid

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonukleinsäure

EB Elutionspuffer

EDC 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid

EFSA European Food Safety Authority

EI Elektronenstoß-Ionisation

ELAA Enzyme-linked Aptamer Assay

ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay

ER Östrogenrezeptor (engl. estrogen receptor)

ERR-Gamma Estrogen-related Receptor Gamma

ESI Elektrospray-Ionisation

ImB Imidazolpuffer

FDA US Food and Drug Administration

FL Fluoreszenzdetektion

GC Gaschromatographie

HRP Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase)

HPLC Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

IAC Immunaффinitätschromatographie

MS Massenspektrometrie

NHS N-Hydroxysuccinimid

PBS Phosphate buffered Saline

PC Polycarbonat

PCR Polymerase Kettenreaktion

PET Positronen-Emissions-Tomographie

PP Polypropylen

PVC Polyvinylchlorid

RIA Radioimmunoassays

RNA Ribonukleinsäure

RP Reversed Phase

SELEX Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment

SPE Festphasenextraktion

SPECT Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie

Strep Streptavidin

TDI Tolerably Daily Intake

TEOS Tetraethylorthosilikat

TMB Tetramethylbenzidin

TMOS Tetramethylorthosilikat

WHO World Health Organization

Literaturverzeichnis

- [1] *Bisphenol A*. PlasticsEurope's PC/BPA-group, Zugriff am 12.02.2013. URL: <http://www.bisphenol-a-europe.org>.
- [2] G. M. Gray, J. T. Cohen, G. Cunha, C. Hughes, E. E. McConnell, L. Rhomberg, I. G. Sipes und D. Mattison. „Weight of the evidence evaluation of low-Dose reproductive and developmental effects of bisphenol A“. *Human and Ecological Risk Assessment* 10 (2004), 875–921.
- [3] *Richtlinie 2011/8/EU der Kommission vom 28. Januar 2011 zur Änderung der Richtlinie 2002/72/EG hinsichtlich der Beschränkung der Verwendung von Bisphenol A in Säuglingsflaschen aus Kunststoff. Text von Bedeutung für den EWR*. EU Kommission, Zugriff am 12.02.2013. URL: <http://eur-lex.europa.eu/Notice.do?val=556264%3Acs&=de/>.
- [4] *Bisphenol A – Massenchemikalie mit unerwünschten Nebenwirkungen*. Umweltbundesamt Deutschland, Zugriff am 12.02.2013. 2010. URL: <http://www.umweltbundesamt.de/publikationen/fpdf-1/3782.pdf>.
- [5] „Scientific opinion on tetrabromobisphenol A (TBBPA) and its derivatives in food“. *EFSA Journal* 9 (2011), 2477.
- [6] N. C. Maragou, A. Makri, E. N. Lampi, N. S. Thomaidis und M. A. Koupparis. „Migration of bisphenol A from polycarbonate baby bottles under real use conditions“. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 25 (2008), 373–383.
- [7] C. Brede, P. Fjeldal, I. Skjevrak und H. Herikstad. „Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing“. *Food Additives and Contaminants* 20 (2003), 684–689.
- [8] E. M. Munguia-Lopez, S. Gerardo-Lugo, E. Peralta, S. Bolumen und H. Soto-Valdez. „Migration of bisphenol A (BPA) from can coatings into a fatty-food simulant and tuna fish“. *Food Additives and Contaminants* 22 (2005), 892–898.

- [9] Y. K. Erdem und F. Acar. „Migration of bisphenol-a into the natural spring water packaged in polycarbonate carboys“. *International Journal of Applied Science and Technology* 2 (2012), 152–156.
- [10] C. K. Osborne, R. Schiff und S. A. Fuqua. „Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation“. *Clinical Cancer Research* 7 (2001), 4338–4342.
- [11] R. V. Weatherman. „Sensing estrogen’s many pathways“. *ACS Chemical Biology* 3 (2008), 338–340.
- [12] A. Krishnan, P. Stathis, S. Permuth, L. Tokes und D. Feldman. „Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving“. *Endocrinology* 132 (1993), 2279–2286.
- [13] A. Matsushima, Y. Kakuta, T. Teramoto, T. Koshiba, X. Liu, H. Okada, T. Tokunaga, S. Kawabata, M. Kimura und Y. Shimohigashi. „Structural evidence for endocrine disruptor bisphenol A binding to human nuclear receptor ERR-Gamma“. *The Journal of Biochemistry* 142 (2007), 517–524.
- [14] C. C. Smith und H. S. Taylor. „Xenoestrogen exposure imprints expression of genes (Hoxa10) required for normal uterine development“. *The FASEB Journal* 21 (2007), 239–246.
- [15] K. Calhoun, E. Padilla-Banks, C. VandeVoort, P. Hunt und C. Williams. „In the fetal rhesus monkey uterus, in utero exposure to whom it may concern: bisphenol A (BPA) is associated with changes in gene expression and accelerated adenogenesis“. *Fertility and Sterility* 98 (2012), 32–33.
- [16] H. B. Adewale, W. N. Jefferson, R. R. Newbold und H. B. Patisaul. „Neonatal bisphenol-A exposure alters rat reproductive development and ovarian morphology without impairing activation of gonadotropin-releasing hormone neurons“. *Biology of Reproduction* 81 (2009), 690–699.
- [17] A. Nakagami, T. Negishi, K. Kawasaki, N. Imai, Y. Nishida, T. Ihara, Y. Kuroda, Y. Yoshikawa und T. Koyama. „Alterations in male infant behaviors towards its mother by prenatal exposure to bisphenol A in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) during early suckling period“. *Psychoneuroendocrinology* 34 (2009), 1189–1197.
- [18] K. Kubo, O. Arai, M. Omura, R. Watanabe, R. Ogata und S. Aou. „Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats“. *Neuroscience Research* 45 (2003), 345–356.

- [19] D. Li, Z. Zhou, D. Qing, Y. He, T. Wu, M. Miao, J. Wang, X. Weng, J. Ferber, L. Herrinton, Q. Zhu, E. Gao, H. Checkoway und W. Yuan. „Occupational exposure to bisphenol-A (BPA) and the risk of self-reported male sexual dysfunction“. *Human Reproduction* 25 (2010), 519–527.
- [20] T. Takeuchi, O. Tsutsumi, Y. Ikezuki, Y. Takai und Y. Taketani. „Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction“. *Endocrine Journal* 51 (2004), 165–169.
- [21] C. Briskin. „Endocrine disruptors and breast cancer“. *Chimia* 62 (2008), 406–409.
- [22] *Carcinogenesis bioassay of bisphenol A in F344 rats and B6C3F1 mice*. Techn. Ber. U.S. Department of Health und Human Services, 1982.
- [23] *BISPHENOL A (BPA) - Current state of knowledge and future actions by WHO and FAO*. WHO - International Food Safety Authorities Network (INFOSAN), Zugriff am 12.02.2013. URL: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/No_05_Bisphenol_A_Nov09_en.pdf.
- [24] B. Duan, X. Hu, H. Zhao, J. Qin und J. Luo. „The relationship between urinary bisphenol A levels and meningioma in chinese adults“. *International Journal of Clinical Oncology* (2012).
- [25] I. A. Lang, T. S. Galloway, A. Scarlett, W. E. Henley, M. Depledge, R. B. Wallace und D. Melzer. „Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults“. *Journal of the American Medical Association* 300 (2008), 1303–1310.
- [26] F. S. vom Saal und C. Hughes. „An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment“. *Environmental Health Perspectives* 113 (2005), 926–933.
- [27] R. E. Engler. „The complex interaction between marine debris and toxic chemicals in the ocean“. *Environmental Science and Technology* 46 (2012), 12302.
- [28] Q. Huang, C. Fang, Y. Chen, X. Wu, T. Ye, Y. Lin und S. Dong. „Embryonic exposure to low concentration of bisphenol A affects the development of *Oryzias melastigma* larvae“. *Environmental Science and Pollution Research* 19 (2012), 2506–2514.
- [29] J.-H. Kanga, F. Kondo und Y. Katayama. „Human exposure to bisphenol A“. *Toxicology* 226 (2006), 79–89.

- [30] *Bisphenol A*. EFSA, Zugriff am 12.02.2013. URL: <http://www.efsa.europa.eu/de/topics/topic/bisphenol.htm>.
- [31] A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio und D. Pérez-Bendito. „Analytical methods for the determination of bisphenol A in food“. *Journal of Chromatography A* 1216 (2009), 449–469.
- [32] A. Goodson, W. Summerfield und I. Cooper. „Survey of bisphenol A and bisphenol F in canned foods“. *Food Additives and Contaminants* 19 (2002), 796–802.
- [33] M. Cichna-Markl. „Selective sample preparation with bioaffinity columns prepared by the sol–gel method“. *Journal of Chromatography A* 1124 (2006), 167–180.
- [34] D. Podlipna und M. Cichna-Markl. „Determination of bisphenol A in canned fish by sol–gel immunoaffinity chromatography, HPLC and fluorescence detection“. *European Food Research and Technology* 224 (2007), 629–634.
- [35] Z. Brenn-Struckhoffova und M. Cichna-Markl. „Determination of bisphenol A in wine by sol–gel immunoaffinity chromatography, HPLC and fluorescence detection“. *Food Additives and Contaminants* 23 (2006), 1227–1235.
- [36] R. Braunrath, D. Podlipna, S. Padlesak und M. Cichna-Markl. „Determination of bisphenol A in canned foods by immunoaffinity chromatography, HPLC, and fluorescence detection“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005), 8911–8917.
- [37] M. del Olmo, A. Zafra, N. A. Navas und J. L. Vilchez. „Trace determination of phenol, bisphenol A and bisphenol A diglycidyl ether in mixtures by excitation fluorescence following micro liquid–liquid extraction using partial least squares regression“. *Analyst* 124 (1999), 385–390.
- [38] J.-H. Kanga, F. Kondo und Y. Katayama. „Importance of control of enzymatic degradation for determination of bisphenol A from fruits and vegetables“. *Analytica Chimica Acta* 555 (2006), 114–117.
- [39] K. Inoue, K. Kato, Y. Yoshimura, T. Makino und H. Nakazawa. „Determination of bisphenol A in human serum by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical detection“. *Journal of Chromatography B* 749 (2000), 17–23.
- [40] Y. Watabe, T. Kondo, H. Imai, M. Morita, N. Tanaka und K. Hosoya. „Reducing bisphenol A contamination from analytical procedures to determine ultralow levels in environmental samples using automated HPLC microanalysis“. *Analytical Chemistry* 76 (2004), 105–109.

- [41] J. D. Stuart, C. P. Capulong, K. D. Launer und X. Pan. „Analyses of phenolic endocrine disrupting chemicals in marine samples by both gas and liquid chromatography–mass spectrometry“. *Journal of Chromatography A* (2005), 136–145.
- [42] N. Kaddar, N. Bendridi, C. Harthe, M. R. de Ravel, A.-L. Bienvenu, C.-Y. Cuilleron, E. Mappus, M. Pugeat und H. Dechaud. „Development of a radioimmunoassay for the measurement of bisphenol A in biological samples“. *Analytica Chimica Acta* 645 (2009), 1–4.
- [43] B. DeMeulenaer, K. Baert, H. Lanckriet, V. van Hoed und A. Huyghebaert. „Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for bisphenol A using chicken immunoglobulins“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (2002), 5273–5282.
- [44] A. S. Krapivin, J. V. Samsonova, N. A. Uskova, N. L. Ivanova und A. M. Egorov. „Enzyme-linked immunosorbent assay for bisphenol A: assay optimization and its application for surface water analysis“. *Toxicological and Environmental Chemistry* 89 (2007), 161–172.
- [45] VIDIA spol. s r.o., Zugriff am 13.02.2013. URL: <http://www.vidia.cz>.
- [46] B. Strehlitz und R. Stoltenburg. In *Marco Maschini: Aptamers in bionanalysis*. WILEY-VCH, 2009, 31–49.
- [47] M. Jo, J.-Y. Ahn, J. Lee, S. Lee, S. W. Hong, J.-W. Yoo, J. Kang, P. Dua, D. ki Lee, S. Hong und S. Kim. „Development of single-stranded DNA aptamers for specific bisphenol A detection“. *Oligonucleotides* 21 (2011), 85–91.
- [48] R. Green, A. D. Ellington, D. P. Bartel und J. W. Szostak. „In vitro genetic analysis: selection and amplification of rare functional nucleic acids“. *Methods* 2 (1991), 75–86.
- [49] K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling und T. R. Cech. „Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena“. *Cell* 31 (1982), 147–157.
- [50] K Gardiner und N. R. Pace. „RNAse P of bacillus subtilis has a RNA component.“ *Journal of Biological Chemistry* 255 (1980), 7507–7509.
- [51] C. Turk und L. Gold. „Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase.“ *Science* 249 (1990), 505–510.
- [52] A. D. Ellington und J. W. Szostak. „In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands“. *Nature* 346 (1990), 818–822.

- [53] S. K. Piasecki, B. Hall und A. D. Ellington. *In Günther Mayer: Nucleic acid and peptide aptamers*. Humana Press, 2009, 3–18.
- [54] J. M. Carothers und J. W. Szostak. *In Sven Klussmann: The aptamer handbook*. WILEY-VCH, 2006, 3–23.
- [55] T. Hianik, V. Ostatna, M. Sonlajtnerova und I. Grman. „Influence of ionic strength, pH and aptamer configuration for binding affinity to thrombin“. *Bioelectrochemistry* 70 (2007), 127–133.
- [56] S. E. Butcher und J. M. Burke. „Structure-mapping of the hairpin ribozyme: magnesium-dependent folding and evidence for tertiary interactions within the ribozyme-substrate complex“. *Journal of Molecular Biology* 244 (1994).
- [57] B.-S. Weigand, A. Zerressen, J. C. Schlatterer, M. Helm und A. Jäschke. *In Sven Klussmann: The Aptamer Handbook*. WILEY-VCH, 2006, 211–224.
- [58] D. Proske, M. Blank, R. Buhmann und A. Resch. „Aptamers—basic research, drug development, and clinical applications“. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69 (2005), 367–374.
- [59] S. T. Cload, T. G. McCauley, A. D. Keefe, J. M. Healy und C. Wilson. *In Sven Klussmann: The Aptamer Handbook*. WILEY-VCH, 2006, 363–406.
- [60] S. Borkowski und L. M. Dinkelborg. *In Sven Klussmann: The Aptamer Handbook*. WILEY-VCH, 2006, 343–361.
- [61] C. L. Esposito, S. Catuogno, V. de Franciscis und L. Cerchia. „New insight into clinical development of nucleic acid aptamers“. *Discovery Medicine* 11 (2011), 487–496.
- [62] J. A. Cruz-Aguado und G. Penner. „Determination of ochratoxin A with a DNA aptamer“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (2008), 10456–10461.
- [63] M. N. Stojanovic, P. de Prada und D. W. Landry. „Aptamer-based folding fluorescent sensor for cocaine“. *Journal of the American Chemical Society* 123 (2001), 4928–4931.
- [64] R. Jenison, S. Gill und B. Polisky. „Oligonucleotide ligands that discriminate between theophylline and caffeine“. *PCR Strategies* (1995), 289–299.
- [65] E. Peyrin. *In Sven Klussmann: The Aptamer Handbook*. WILEY-VCH, 2006, 324–341.

- [66] N. Rupcich, R. Nutiu, Y. Li und J. D. Brennan. „Entrapment of fluorescent signaling DNA aptamers in sol-gel-derived silica“. *Analytical Chemistry* 77 (2005), 4300–4307.
- [67] A. D. Girolamo, M. McKeague, J. D. Miller, M. C. DeRosa und A. Visconti. „Determination of ochratoxin A in wheat after clean-up through a DNA aptamer-based solid phase extraction column“. *Food Chemistry* 127 (2011), 1378–1384.
- [68] L. Barthelmebs, J. Jonca, A. Hayat, B. Prieto-Simon und J.-L. Marty. „Enzyme-linked aptamer assays (ELAAs), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of ochratoxin A in wine“. *Food Control* 22 (2011), 737–743.
- [69] N. Hamaguchi, A. Ellington und M. Stanton. „Aptamer beacons for the direct detection of proteins“. *Analytical Biochemistry* 294 (2001), 126–131.
- [70] I. Willner und M. Zayats. In *Marco Maschini: Aptamers in bionanalysis*. WILEY-VCH, 2009, 63–81.
- [71] Y. Xiao, A. A. Lubin, A. J. Heeger und K. W. Plaxco. „Label-free electronic detection of thrombin in blood serum by using an aptamer-based sensor“. *Angewandte Chemie International Edition* 44 (2005), 5456–5459.
- [72] M. Minunni, S. Tombelli, A. Gullotto, E. Luzzi und M. Mascini. „Development of biosensors with aptamers as bio-recognition element: the case of HIV-1 Tat protein“. *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2004), 1149–1156.
- [73] P. S. Pendergrast und D. M. Epstein. In *Sven Klussmann: The Aptamer Handbook*. WILEY-VCH, 2006, 265–277.
- [74] B. Kang, J. H. Kim, S. Kim und K.-H. Yoo. „Aptamer-modified anodized aluminum oxide-based capacitive sensor for the detection of bisphenol A“. *Applied Physics Letters* 98 (2011).

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Georg Aichinger
Geburtsdatum: 05.01.1984
Geburtsort: Rum in Tirol
Staatsbürgerschaft: Österreich
E-Mail: scoaichinger@hotmail.com

Ausbildung:

1990-1992 Volksschule Angergasse, Innsbruck
1992-1994 Volksschule Oberperfuss
1994-2002 BRG Adolf-Pichler-Platz, Innsbruck
2002 Abschluss der Matura mit gutem Erfolg
2003-2006 Diplomstudium der Chemie an der Universität Innsbruck
2006-2008 Bachelor-Studium der Chemie an der Universität Wien
2008 Abschluss als Bakk. rer. nat.
2008-2013 Masterstudium der Biologischen Chemie an der Universität Wien

Berufliche Erfahrungen:

2002-2003: Zivildienst im Altenwohn- und Pflegeheim Unterperfuss
2003-2007: diverse Ferialpraktika (u.a. bei: Hypo Tirol Bank AG, FA Wattens Papier, Buderus)
ab 2007: geringfügig beschäftigt bei: Caritas der ED Wien (Nachtportier)
2012-2013: Wissenschaftliches Universitätspersonal, Tätigkeit als Tutor am Institut für Analytische Chemie („Lebensmittelanalytisches Praktikum für Ernährungswissenschaftler“)

Fremdsprachen:

Englisch: fließend
Italienisch: Grundkenntnisse