

Zusammenfassung

Affinitätsbasierte Diagnostik ist abhängig von biologischen Reagenzien (z. B. Antikörpern, Antikörperfragmenten, Rezeptoren oder Aptameren). Diese affinitätsbasierten biologischen Reagenzien sind extrem effektiv, da sie Biomarker aus komplexen Medien, z.B. aus Assays oder LC-MS Analysen, erkennen und binden können. Neben den genannten Vorteilen haben diese Reagenzien die Nachteile, erstens schwer verfügbar und zweitens sehr teuer zu sein. Ein weiteres Problem stellt die mögliche Denaturierung der Reagenzien während der Probenvorbereitung dar. Solche Probleme behindern die Entwicklung von diagnostischen Methoden zur Erforschung von neurodegenerativen Erkrankungen und Krebs. Ziel ist es, molekular geprägte Polymere (MIPs) zu entwickeln, die in der Lage sind, Peptid-Biomarker aus nicht-physiologischen Medien (z.B. Acetonitril-Puffergemische oder denaturierende Medien) zu selektieren. Die Peptid-MIPs werden als Aufnehmerphase für die Festphasenextraktion (SPE) von biologischen Proben verwendet.

Derivate eines diagnostischen Nonapeptid-Biomarkers, mit der Biomarkersequenz NLLGLIEAK, welche aus dem Verdau eines Proteins des kleinzelligen Lungenkrebs ProGRP resultiert, wurde als Templat verwendet. Das Ziel war es ein Polymer zu finden, welches als stationäre Phase dienen kann und somit den Biomarker NLLGLIEAK aus den Matrixkomponenten bindet und aufkonzentriert. Dazu wurde eine kombinatorische Polymerbibliothek synthetisiert. Diese kombinatorische Bibliothek für das MIP NLLGLIEAK wurde mittels high-throughput-synthesis von MIPs auf verkleinertem Maßstab (mini- MIPs) generiert. Mittels dieser Methode können insgesamt 96 Polymere hergestellt werden. Diese bestehen aus MIPs (molekular geprägte Polymere) und NIPs (nicht geprägte Polymere). Eine sorgfältige Optimierung der Synthese molekular geprägter Polymere wurde gestartet. Die optimierten Parameter sind unter anderem die Auswahl der templat-funktionalisierten Monomere, Vernetzer, Prozentsatz der Vernetzung und Porogen.

Um diese Polymere zu testen, wurde als erstes ein Bindungstest mit einer definierten Peptidmenge durchgeführt. Das MIP und das NIP wurden verglichen und das Polymer mit dem größtem „imprinting Faktor“ zum „scale-up“ mittels „bulk“- Polymerization verwendet. Die in dieser Arbeit entwickelten MIPs bewährten sich als Rezeptoren für die Zielbiomarker. Die MIPs konnten das ProGRP Signalpeptid selektiv aus dem Verdauen des Proteins herausfiltern, was zur Folge hat, dass die Nachweisgrenze in einem LC-MS- basierten Assay reduziert werden konnte.

Verschiedene Parameter die die Effektivität der Extraktion des Polymers steigern sollten wurden ausgewertet, um die selektive Anreicherung des NLLGLIEAK aus wässrigen Proben zu testen und unspezifische Wechselwirkungen zu reduzieren. Das MIP und das NIP wurden für den Gebrauch als SPE-Sorptionsmittel evaluiert. Es konnten mehr als 80% des Peptids aus einer wässrigen Lösung zurückgewonnen werden. Es konnte ein Linearitätsbereich für NLLGLIEAK zwischen 1,5 und 50 mg/mL durch die Beladung mit 1 mL wässrige Probe erhalten werden (in HEPES-Puffer; pH 7,0). Der Intraday-Variationskoeffizient (CV) und der Interday CV lagen unter 7% .

Am Ende wurde das „bulk“-Format der MIPs auf ein „grafting“-Format zur Herstellung von dünnen MIP-Filmen übertragen. Diese Filme zeigten eine hervorragende Affinität und Selektivität gegenüber NLLGLIEAK und waren daher geeignet für die Anwendung in SPE. Eine Arbeitsanweisung zur Entwicklung von MIPs für Biomarkerpeptide ist entstanden. Diese erläutert wie MIPs, welche das Arbeiten unter denaturierenden Bedingungen und in organischen Lösungsmitteln erlauben, hergestellt werden können. Dies verspricht einen Ausbau der Anwendungsbereiche in der Technologie, in der Proteomik und in der Diagnostik.