

Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie
Lehrstuhl für Hydrogeologie, Hydrochemie und Umweltanalytik
der Technischen Universität München

Entwicklung von immunanalytischen, chromatographischen und
massenspektrometrischen Methoden zur Bestimmung
cyanobakterieller Hepatotoxine (Microcystine und Nodularine)

Anne Zeck

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Buchner
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. R. Nießner
2. Univ.-Prof. Dr. B. Hock
3. Univ.-Prof. Dr. M. Schuster

Die Dissertation wurde am 26.09.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 20.11.2001 angenommen.

Diese Arbeit entstand in der Zeit von Februar 1998 bis September 2001 am Lehrstuhl für Hydrogeologie, Hydrochemie und Umweltanalytik der Technischen Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Nießner. Sie wurde durch ein Projekt des BMBF finanziell gefördert.

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. R. Nießner für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas, für die gewährten Freiheiten bei der inhaltlichen Gestaltung und für die Möglichkeit meine Arbeit auf Fachtagungen vor- und zur Diskussion zu stellen. Seine Bemühungen um die Gestaltung optimaler Rahmenbedingungen für die Forschung trugen sehr zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Michael G. Weller bedanken. In zahllosen Diskussionen, zu denen er jederzeit bereit war, hat er wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit geleistet. Besonders schätzen gelernt habe ich seine Bemühungen, die Arbeitsgruppe auch im Bereich der Computertechnik auf dem neuesten Stand zu halten. Die Datenauswertung, und -archivierung, jedoch auch die Kommunikation innerhalb und außerhalb des Institutes wurden dadurch wesentlich erleichtert. Bedanken möchte ich mich ebenfalls für seine Bereitschaft auch selber Hand anzulegen, beispielsweise wenn die Vakuumpumpen des Massenspektrometers ausfielen oder wenn nach einer besonders heißen Periode im Sommer rasch eine Probenahme von Cyanobakterien in bayerischen Seen erfolgen mußte.

Meiner Laborkollegin Isabel Schaupt danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit auf engem Raum, das angenehme Arbeitsklima und die fachlichen Diskussionen, die mir neue Anregungen für die Arbeit gaben.

Anja Eikenberg, die in ihrer Diplomarbeit einen der entwickelten Microcystinantikörper charakterisierte, danke ich für ihre stets tatkräftige und fröhliche Hilfe, wann immer diese gebraucht wurde.

Den Projektpartnern Dr. J. Morrall, Dr. C. Haskard, Dr. B. Nicholson, Dr. D. Steffensen und Prof. Dr. D. Bursill vom Australian Water Quality Centre (Adelaide, Australien) danke ich für die überwiegend per E-mail geführten Diskussionen, die lyophilisierten Cyanobakterienproben und den angenehmen Gastaufenthalt in Adelaide.

Für die Überlassung des monoklonalen Antikörpers M8H5 danke ich Dr. S. Nagata vom National Institute of Health (Bethesda, Maryland, USA) und Prof. Dr. Y. Ueno von der Science University of Tokyo (Tokyo, Japan).

Meinen Praktikanten Lina Lässig, Markus Hoffmann und Christian Hirsch möchte ich für ihre engagierte Mitarbeit danken.

Allen Kolleginnen und Kollegen danke ich für ihr stets offenes Ohr und das überaus angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima, besonders Herbert Fink, Thomas Franze, Larissa Kasarian, Tim Scharnweber, Thomas Schmid und Mario Seiss und den Mitgliedern des "AG-Weller-Teams" Marcus Diemer, Carola Wersching, Barbara Fall und Bertram Knecht.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern, Schwiegereltern und Freunden für ihre Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit bedanken. Ein besonders herzlicher Dank gilt meinem Mann Günther, der das Korrekturlesen übernahm und in vielen Diskussionen durch Aufmunterung und Geduld wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

INHALT

I.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.....	1
II.	THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	3
1	CYANOBAKTERIEN UND DEREN TOXINE	3
1.1	<i>Cyanobakterien</i>	3
1.1.1	Klassifizierung, Eigenschaften und Vorkommen.....	3
1.1.2	Faktoren, die Wachstum, Dominanz und Toxizität von Cyanobakterien beeinflussen.....	5
1.1.3	Vergiftungen aufgrund von Cyanobakterien.....	6
1.1.4	Cyanobakterien in Deutschland	7
1.1.5	Richtlinien und Grenzwerte für Cyanobakterien	8
1.2	<i>Cyanobakterielle Toxine</i>	9
1.2.1	Einteilung der cyanobakteriellen Toxine	9
1.2.2	Struktur, Eigenschaften und Synthese der cyclischen Hepatotoxine	11
1.2.3	Toxikologie	14
1.2.4	Stabilität und Abbau der Microcystine.....	17
1.2.5	Grenzwerte und Trinkwassermanagement	18
2	ANALYTIK VON MICROCYSTINEN.....	20
2.1	<i>Probenahme und Probenvorbereitung</i>	20
2.2	<i>Trennmethoden</i>	22
2.2.1	Umkehrphasen-Chromatographie	22
2.2.2	Andere HPLC-Methoden	24
2.2.3	Gaschromatographie (GC)	24
2.2.4	Kapillarelektrophorese (CE) und Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MECC).....	24
2.2.5	Dünnschichtchromatographie (DC)	25
2.3	<i>Bioanalytische Methoden</i>	25
2.3.1	Biologische Tests	25
2.3.2	Enzym-Inhibitionsassays.....	26
2.3.3	Immunoassays	30
2.4	<i>Massenspektrometrische Methoden</i>	32

3	IMMUNOLOGISCHE METHODEN	38
3.1	<i>Antikörper</i>	38
3.1.1	Struktur von Antikörpern	38
3.1.2	Antigen-Antikörper-Wechselwirkung.....	39
3.1.3	Bildung von Antikörpern	41
3.1.4	Gewinnung von polyklonalen Antikörpern.....	42
3.1.5	Synthese von Immunkonjugates.....	42
3.1.6	Immunisierungsprotokoll	43
3.1.7	Monoklonale Antikörper	44
3.1.8	Andere Antikörperquellen und künstliche Antikörper.....	46
3.2	<i>Immunoassays</i>	48
3.2.1	Historische Entwicklung und Anwendungsgebiete.....	48
3.2.2	Prinzip und Durchführung.....	49
3.2.3	Messung und Auswertung von ELISAs	55
3.2.4	Bestimmung der Affinitätskonstanten.....	57
3.2.5	Kreuzreaktivität.....	58
3.2.6	Optimierung kompetitiver Immunoassays	59
4	MASSENSPEKTROMETRIE IN DER PEPTID- UND PROTEINANALYTIK.....	61
4.1	<i>Einführung</i>	61
4.2	<i>Ionisierungsprinzip (Ionenquellen)</i>	62
4.2.1	Prinzip der Elektrospray-Ionisation (ESI).....	62
4.2.2	Prinzip der Matrix-unterstützten Laser-Desorption (MALDI).....	64
4.3	<i>Massenanalysatoren</i>	65
4.3.1	Prinzip des Flugzeit-Massenanalysators	66
4.4	<i>Aspekte der bioanalytischen Massenspektrometrie</i>	69
4.4.1	Massenkalibrierung	69
4.4.2	Quantifizierung und Matrixeffekte.....	70
4.4.3	Sequenzierung von Peptiden mittels Massenspektrometrie.....	72
5	IMMUNOLOGISCHE DETEKTION IN DER CHROMATOGRAPHIE.....	75
III.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	78
1	HPLC MIT UV-DETEKTION	78
1.1	<i>Microcystine und ihre UV-Absorption</i>	78
1.2	<i>Optimierung des Laufmittelgradienten</i>	81
1.3	<i>Auswahl des Säulenmaterials</i>	83
1.4	<i>Bestimmung der Nachweisgrenze</i>	88
1.5	<i>Monitoring der enzymatischen Spaltung von Microcystinen mittels HPLC</i>	88

1.6	<i>Monitoring der chemischen Hydrolyse von Microcystinen mittels HPLC</i>	89
1.7	<i>Messung von Realproben mittels HPLC-UV</i>	91
1.8	<i>Zusammenfassung und Schlußfolgerungen</i>	94
2	ELISA MIT MONOKLONALEN M8H5-ANTIKÖRPERN ZUR BESTIMMUNG VON MICROCYSTINEN	96
2.1	<i>Antikörper M8H5</i>	96
2.2	<i>Herstellung des Tracers</i>	96
2.3	<i>Optimierter direkter ELISA</i>	99
2.4	<i>Kreuzreaktionen</i>	101
2.5	<i>Einfluß von Störungen (Salzgehalt, Tenside, Huminstoffe, pH-Wert)</i>	103
2.6	<i>Messung von Wasserproben</i>	105
2.7	<i>Zusammenfassung und Schlußfolgerungen</i>	107
3	HERSTELLUNG VON MONOKLONALEN MICROCYSTIN-LR-ANTIKÖRPERN	108
3.1	<i>Auswahl der Haptenstruktur und des Trägerproteins</i>	108
3.2	<i>Synthese und Charakterisierung des Immunkonjugats</i>	110
3.3	<i>Verlauf der Immunisierungen</i>	117
3.3.1	<i>Immunisierung mit Microcystin-LR-KLH-Konjugat</i>	117
3.3.2	<i>Immunisierung mit Microcystin-LR-cOVA-Konjugat</i>	118
3.4	<i>Fusion und Screening zur Gewinnung eines monoklonalen Antikörpers</i>	120
3.5	<i>Optimierter direkter kompetitiver ELISA für Microcystin-LR</i>	121
3.6	<i>Bestimmung der Affinitätskonstante</i>	122
3.7	<i>Kreuzreaktionen</i>	123
3.8	<i>Einfluß von Störungen (Salzgehalt, Tenside, Huminstoffe, pH-Wert)</i>	124
3.9	<i>Messungen von Wasserproben</i>	126
3.10	<i>Zusammenfassung und Schlußfolgerungen</i>	127
4	HERSTELLUNG EINES MONOKLONALEN ADDA-ANTIKÖRPERS.....	128
4.1	<i>Auswahl des Haptens und der Kopplungsstelle</i>	128
4.2	<i>Synthese des Immunogens und des Enzymtracers</i>	129
4.3	<i>Verlauf der Immunisierungen</i>	133
4.4	<i>Fusion und Screening zur Gewinnung eines monoklonalen Adda-Antikörpers</i>	135
4.5	<i>Optimierter direkter kompetitiver ELISA</i>	137
4.6	<i>Kreuzreaktionen</i>	138

4.7	<i>Messungen von Wasserproben</i>	140
4.8	<i>Zusammenfassung und Schlußfolgerungen</i>	141
5	PROTEINPHOSPHATASE-INHIBITIONSASSAY	142
6	MEHRDIMENSIONALE ELISA-DETEKTION IN DER HPLC	144
6.1	<i>Motivation</i>	144
6.2	<i>Experimentelle Durchführung</i>	144
6.3	<i>Optimierung der mehrdimensionalen HPLC-ELISA-Kopplung</i>	145
6.4	<i>Quantifizierung von Microcystinen</i>	148
6.5	<i>Bestimmung der Nachweisgrenze mit Antikörper MC10E7</i>	150
6.6	<i>Bestimmung von Kreuzreaktionen</i>	151
6.7	<i>Messung von Realproben</i>	152
6.8	<i>Zusammenfassung und Schlußfolgerungen</i>	154
7	ÜBERTRAGUNG DES MICROCYSTIN-IMMUNOASSAYS IN EIN SENSORTAUGLICHES FORMAT	155
8	MASSENSPEKTROMETRISCHE DETEKTION DER MICROCYSTINE	159
8.1	<i>Auswahl eines geeigneten Massenspektrometers</i>	159
8.2	<i>Aufbau und Funktionsweise des Massenspektrometers</i>	160
8.3	<i>Optimierung der Bedingungen</i>	162
8.4	<i>Detektion von Microcystinen mittels ESI-TOF</i>	165
8.5	<i>Messung von Realproben</i>	171
8.6	<i>Fragmentierung von Microcystinen</i>	173
8.7	<i>Analytik von Microcystinen mittels HPLC-ESI-MS-Kopplung</i>	177
8.8	<i>Molmassenbestimmung von Proteinen und Hapten-Protein-Konjugaten mittels ESI-TOF</i>	181
8.9	<i>Zusammenfassung und Schlußfolgerungen</i>	185
9	ON-LINE-SPE-HPLC-MS-UV-METHODE ZUR MESSUNG VON MICROCYSTINEN	186
9.1	<i>Aufbau der Apparatur</i>	186
9.2	<i>Optimierung der Parameter</i>	188
9.2.1	<i>Auswahl der Anreicherungskartusche</i>	188
9.2.2	<i>Optimierung der Festphasenextraktion</i>	189
9.2.3	<i>Kopplung der Festphasenextraktion an die chromatographische Trennung</i>	193
9.2.4	<i>Messung von Realproben</i>	196

9.3 Zusammenfassung und Schlußfolgerungen	198
IV. ZUSAMMENFASSUNG.....	200
V. AUSBLICK.....	204
VI. EXPERIMENTELLER TEIL.....	205
1 VERWENDETE GERÄTE.....	205
2 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	206
2.1 <i>Verwendete Chemikalien</i>	206
2.2 <i>Standardsubstanzen</i>	208
2.3 <i>Verzeichnis der Antikörper und Tracer</i>	209
2.4 <i>Puffer- und Stammlösungen</i>	209
3 VORSCHRIFTEN ZUR IMMUNISIERUNG UND HERSTELLUNG VON MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN	212
3.1 <i>Herstellung des monoklonalen MC10E7-Antikörpers</i>	212
3.1.1 <i>Immunisierung</i>	212
3.1.2 <i>Fusion und Reklonierung</i>	212
3.1.3 <i>Screening der Zellkulturüberstände</i>	212
3.2 <i>Herstellung des monoklonalen AD4G2-Antikörpers</i>	213
3.2.1 <i>Immunisierung</i>	213
3.2.2 <i>Fusion und Reklonierung</i>	213
3.2.3 <i>Indirekter kompetitiver ELISA zum Testen der Seren von N-Acetyl-Adda-KLH-immunisierten Mäusen</i>	214
3.2.4 <i>Screening der Zellkulturüberstände</i>	214
4 STANDARDPROZEDUREN	214
4.1 <i>Ansetzen von Analytstandards</i>	214
4.2 <i>Direkter kompetitiver ELISA für die Antikörper M8H5, MC10E7 und AD4G2</i>	215
4.3 <i>Bestimmung von Realproben im ELISA</i>	216
4.4 <i>Optimierung der Antikörper- und Tracerkonzentration und Bestimmung der Affinitätskonstanten</i>	217
4.5 <i>Proteinphosphatase-Inhibitionsassay für HPLC-Kopplung</i>	217

5	SYNTHESEN UND SPALTUNGSEXPERIMENTE.....	218
5.1	<i>Synthesen von Microcystin-LR-Immunogenen und -Tracern</i>	218
5.1.1	Herstellung des Microcystin-LR-POD-Tracers	218
5.1.2	Herstellung des Microcystin-LR-KLH-Konjugates	218
5.1.3	Synthese von kationisiertem Ovalbumin (cOVA)	219
5.1.4	Synthese des löslichen Microcystin-LR-cOVA-Konjugates.....	219
5.1.5	Synthese des unlöslichen Microcystin-LR-cOVA-Konjugates.....	220
5.2	<i>Synthese von Adda-Derivaten, -Immunogenen und -Tracern</i>	220
5.2.1	Synthese von <i>N</i> -Acetyl-Adda.....	220
5.2.2	Synthese des aktivierten NHS-Esters von <i>N</i> -Acetyl-Adda	221
5.2.3	Synthesen der <i>N</i> -Acetyl-Adda-KLH-, -BSA- und -POD- Konjugate	221
5.3	<i>Enzymatische Spaltexperimente von Microcystin-LR</i>	222
5.4	<i>Kopplung von Microcystin-LR an aminomodifizierte Glasträger</i>	222
6	CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN	223
6.1	<i>Off-line-Festphasenextraktion gefriergetrockneter Cyanobakterien</i>	223
6.2	<i>HPLC-UVD, HPLC-ELISA und HPLC-MS</i>	223
7	MASSENSPEKTROMETRIE (MS)	225
7.1	<i>MS-Parameter und Massenkalisierung</i>	225
7.2	<i>On-line-SPE-HPLC-MS</i>	227
7.2.1	Probenvorbereitung	227
7.2.2	Anreicherungsprogramm.....	227
7.2.3	Elutionsprogramm.....	228
VII.	ABKÜRZUNGEN.....	229
VIII.	LITERATUR.....	231

Einige Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder befinden sich im Druck:

A. Zeck, A. Eikenberg, M. G. Weller, R. Niessner: *Highly Sensitive Immunoassay Based on a Monoclonal Antibody Specific for [4-Arginine]Microcystins*, Anal. Chim. Acta **441** (2001) 1-12.

A. Zeck, M. G. Weller, D. Bursill, R. Niessner: *Generic Microcystin Immunoassay Based on Monoclonal Antibodies Against Adda*, Analyst, im Druck.

A. Zeck, M. G. Weller, R. Niessner: *Multidimensional Biochemical Detection of Microcystins in Liquid Chromatography*, Anal. Chem., im Druck.

M. G. Weller, A. Zeck, A. Eikenberg, S. Nagata, Y. Ueno, R. Niessner: *Development of a Microcystin Immunoassay of Broad Specificity Based on Monoclonal Antibody M8H5*, Anal. Sci., im Druck.

Erst wenn der letzte Baum gefällt,
der letzte Fluß vergiftet
und der letzte Fisch gefangen ist,
werdet ihr merken,
daß man Geld nicht essen kann.

Prophezeiung der Cree-Indianer

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Weltweit wird immer häufiger über das Massenaufreten von toxischen Cyanobakterien ("Blaualgae") in Binnen- und Küstengewässern berichtet. Verantwortlich dafür wird die zunehmende Eutrophierung der Gewässer und die globale Klimaerwärmung gemacht. Die Folgen sind Vergiftungen von Menschen, Vieh, Wild, Wasservögeln und Fischen. Immer wieder müssen Badestrände und -seen wegen auftretenden Cyanobakterienblüten gesperrt werden. Trinkwasser muß speziell vorbehandelt werden, wenn die Trinkwasserspeicher vergiftet sind. Die ökonomischen Auswirkungen können ebenfalls beträchtlich sein, wenn es z. B. zu einem Fischsterben kommt, wenn Menschen nach dem Verzehr von Muscheln, die Algentoxine angereichert haben, erkranken oder Strände von Badeorten gesperrt werden müssen.

Cyanobakterielle Toxine gehören zu den giftigsten Naturstoffen. Einige von ihnen wirken akut neurotoxisch und können innerhalb von wenigen Minuten zum Tod führen. Andere wirken sowohl akut als auch chronisch lebertoxisch. Letztere führen innerhalb einiger Stunden zum Tod, wenn sie in tödlicher Dosis aufgenommen werden. Die cyanobakteriellen Lebergifte (Hepatotoxine) zeichnen sich durch eine enorme strukturelle Vielfalt aus. Über 90 verschiedene Strukturvarianten wurden bereits charakterisiert. Allen ist eine cyclische Peptidstruktur mit einem hohen Anteil an ungewöhnlichen Aminosäuren gemeinsam. Die große strukturelle Variabilität, die eingeschränkte Verfügbarkeit dieser Naturstoffe als chemische Standards und die geringen Konzentrationen, die nachgewiesen werden müssen, stellen eine besondere Herausforderung für die Analytik dar. Nicht alle Strukturvertreter der Microcystine und Nodularine, wie die cyclischen Hepatotoxine genannt werden, sind gleichermaßen toxisch. Deshalb besteht die Anforderung an die Analytik, entweder Einzelkomponenten nachzuweisen oder die Toxizität mit biologischen Tests zu bestimmen. Toxizitätstests (z. B. Maustests) sind in der Regel zu wenig empfindlich und sind auch aus Tierschutzgründen nicht die Methoden der Wahl. Einzelkomponenten-Analytik wiederum ist schwierig, da nur sehr wenige Microcystine als Standards verfügbar sind. Bioanalytische Meßverfahren, wie z. B. Immunoassays, bieten hierfür einen Ausweg.

Immunoassays beruhen auf der hochselektiven Erkennung der Analyten durch einen Antikörper. Sie ermöglichen einen sehr empfindlichen Analytnachweis. Bindet der Antikörper alle Vertreter der Substanzklasse gleich gut, so erfolgt keine Diskriminierung einzelner Strukturvertreter durch das Meßverfahren und ein Summenwert kann erhalten werden. Unbekannte Microcystine oder Nodularine sind hierin enthalten. Wird der Summenwert mit der Toxizität der giftigsten Strukturvariante gewichtet, so kann eine maximale Toxizität der Probe errechnet werden. Immunoassays sind nicht nur hochempfindlich und hochselektiv, sondern auch schnell und kostengünstig. Eine Vielzahl von Proben kann in Mikrotiterplatten parallel vermessen werden. Ein weiterer Vorteil ist die geringere Anfälligkeit gegenüber Störkomponenten (Matrix) verglichen mit konventionellen Methoden, wie z. B. HPLC oder GC. Durch Verdünnen der Proben und durch Verwendung spezieller Puffer kann der Einfluß der Matrix minimiert werden. Aufwendige und zeitintensive Probenvorbereitung kann somit auf ein Minimum reduziert werden. Eine Schwierigkeit der Immunoassays stellen jedoch die Querempfindlichkeiten (Kreuzreaktionen) der Antikörper dar. Bisher ist es nur selten

gelingen, Antikörper herzustellen, die alle Vertreter einer Stoffklasse gleich gut binden. Die Herstellung eines Antikörpers mit breiter Erkennung der Microcystine, eines sog. Breitbandantikörpers, war deshalb ein Ziel dieser Arbeit. Um dieses Ziel zu erreichen, sollten Mäuse mit einer gemeinsamen Teilstruktur der Microcystine immunisiert werden, antikörperproduzierende Zellen isoliert und monoklonale Antikörper hergestellt werden. Die Strategie zur Herstellung von Breitbandantikörpern durch Immunisierung von gemeinsamen Teilstrukturen ist nur dann möglich, wenn die chemische Struktur der Analyten eine charakteristische Teilstruktur enthält, die allen Vertretern der Stoffklasse gemeinsam ist.

Neben der Herstellung eines gruppenselektiven Antikörpers für Microcystine sollten weitere, monoklonale Antikörper mit möglichst unterschiedlichen Querempfindlichkeiten hergestellt werden. Durch Verwendung mehrerer Antikörper mit unterschiedlichen Selektivitäten gelingt eine Identifizierung und Quantifizierung von Subklassen der ursprünglichen Substanzklasse. Je mehr unterschiedliche Antikörper zur Messung einer Probe eingesetzt werden, um so besser kann diese charakterisiert werden. Antikörper mit unterschiedlichen Querempfindlichkeiten werden am ehesten durch Immunisierung unterschiedlicher Strukturen erhalten. Dies kann z. B. erreicht werden, wenn das Analytmolekül dem Immunsystem in verschiedenen Orientierungen präsentiert wird. Hierzu ist die Entwicklung unterschiedlicher Syntheserouten für die Herstellung der Immunogene notwendig.

Trotz der vielen Vorteile von Immunoassays ist eine Einzelkomponentenanalytik mit dieser Methode meist nicht möglich. Dazu wird eine Kombination mit Trennverfahren, wie z. B. der Chromatographie (HPLC), benötigt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es deshalb, ein analytisches Verfahren zu entwickeln, das die Vorteile von Chromatographie und Immunoassays verbindet. Immunoassays sollten zur Detektion der mittels HPLC getrennten Microcystine eingesetzt werden. Die Kopplung dieser beiden Methoden erlaubt einen sehr empfindlichen Einzelkomponentennachweis für Microcystine.

Eine weitere Möglichkeit, einzelne Microcystine in einer Probe zu identifizieren, ist die Massenspektrometrie. Die Weiterentwicklung dieser Methode in den letzten Jahrzehnten ermöglicht nun die Erzeugung gasförmiger Ionen aus schwerflüchtigen Molekülen. Damit eröffnen sich der Massenspektrometrie neue Anwendungen im Bereich der Analytik von Biomolekülen, Peptiden und Proteinen. Ziel dieser Arbeit war es, die Möglichkeiten der Massenspektrometrie für die Analytik von Microcystinen zu untersuchen. Hierzu sollte die Identifizierung, die Quantifizierung und die Fragmentierung der Microcystine mit einem Elektrospray-Flugzeit-Massenanalysator optimiert werden. Da die Massenspektrometrie wesentlich stärker als die Immunoassays durch Matrixsubstanzen beeinflusst wird, sollte weiterhin eine Methode zur on-line-Festphasenextraktion-HPLC mit massenspektrometrischer Detektion entwickelt werden. Diese Methode ist als Referenzmethode für den immunanalytischen Nachweis von Microcystinen gut geeignet.

Insgesamt sollte mit dieser Arbeit die Analytik von Microcystinen verbessert werden und es sollten Methoden entwickelt werden, die für Routinelaboratorien wie z. B. Wasserüberwachungsbehörden zugänglich sind. Der theoretische Teil dieser Arbeit umfaßt eine Literaturstudie zu bisher veröffentlichten Analysemethoden für Microcystine sowie die Beschreibung der verwendeten analytischen Verfahren.

II. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

1 Cyanobakterien und deren Toxine

1.1 Cyanobakterien

1.1.1 Klassifizierung, Eigenschaften und Vorkommen

Cyanobakterien, früher auch Blaualgen oder Cyanophyceae genannt, sind prokaryontische, photoautotrophe Organismen, die keinen membranumhüllten Zellkern oder andere membran-gebundene Zellorganellen wie Chloroplasten oder Mitochondrien besitzen [1, S. 3-7, 2]. Sie sind gram-negativ und ähneln eukaryontischen Algen in ihrer Fähigkeit sauerstoffbildende Photosynthese zu betreiben. Wie diese besitzen sie das für die Lichtabsorption wichtige Pigment Chlorophyll a, sowie zusätzliche Phycobiline, die im gelben und grünen Spektralbereich (Phycocyanin bzw. Phycoerythrin) Licht absorbieren. Phycobiline treten nur bei Cyanobakterien und Rotalgen auf und tragen zu deren charakteristischer Färbung bei. Da Cyanobakterien auch in ihrer Größe anderen Algen ähneln, wurden sie früher fälschlicherweise zu den Algen gezählt. Erst nach der Einführung des Elektronenmikroskops konnte gezeigt werden, daß "Blaualgen" keinen membranumhüllten Zellkern besitzen und deshalb zu den Prokaryonten gehören [3]. In neueren Veröffentlichungen werden sie deshalb auch als Cyanoprokaryonten bezeichnet [2].

Fossile Funde belegen, daß Cyanobakterien bereits vor 3.3 bis 3.5 Milliarden Jahren die Erde besiedelten und damit zu den ältesten Organismen gehören, die zu einer sauerstoffbildenden Photosynthese fähig sind. Sie haben damit wesentlich zu der Bildung der heutigen, sauerstoffhaltigen Atmosphäre beigetragen.

Eine andere, seit langem bekannte Eigenschaft einiger Arten von Cyanobakterien ist ihre Fähigkeit atmosphärischen Stickstoff zu fixieren und in Formen umzuwandeln, die Pflanzen und Tieren zugänglich sind. Diese Eigenschaft wurde und wird auch heute zur Düngung landwirtschaftlich genutzter Flächen ausgenutzt. Vor allem beim Reisanbau werden Cyanobakterien als Düngemittel dem Boden zugesetzt. Allerdings haben Cyanobakterien nicht nur nützliche Eigenschaften, sondern auch negative Auswirkungen. Unter günstigen Wachstumsbedingungen tritt eine Massenentwicklung, sog. "Wasserblüten", auf, bei denen giftige Substanzen gebildet und freigesetzt werden.

Cyanobakterien kommen weltweit vor und haben sich an die unterschiedlichsten Lebensräume angepaßt. Einige Gattungen bevorzugen salzhaltiges Meerwasser, wie z. B. *Nodularia*, während andere (z. B. *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Microcystis*) in Süßwasser leben. Sie bevorzugen gemäßigt bis subtropisches Klima, wurden jedoch mittlerweile auch in der Antarktis gefunden [4]. Aufgrund der zunehmenden Eutrophierung von Binnengewässern, der Einleitung von nicht aufbereitetem Abwasser in die Meere, der globalen Klimaänderung und der weltweiten Verbreitung infolge des Transports und Wechsels von Ballastwasser für Schiffe, gibt es Hinweise einer weltweiten Zunahme von Cyanobakterien [5, 6].

In gemäßigttem Klima durchlaufen Cyanobakterien einen Wachstumszyklus, der im Frühjahr beginnt und von Ende des Sommers bis Herbst seinen Höhepunkt erreicht. In dieser Zeit kommt es am häufigsten zu Massenentwicklungen [7]. Durch starke Eutrophierung verlängert und verstärkt sich die Periode des Algenwachstums. Mit Hilfe von Gasvakuolen können Cyanobakterien die Wassertiefe einstellen, in der sie optimale Verhältnisse (Licht und Nährstoffe) vorfinden. Dies erschwert unter anderem die repräsentative Probenahme in Seen oder Küstengewässern. Kommt es zu der Ausbildung von Wasserblüten, so treiben "Algen"-Teppiche auf der Oberfläche von Gewässern und werden vom Wind an das Ufer getrieben. Dort stellen sie z. B. eine Gefahr für Weidevieh oder spielende Kinder dar. Am Ende der Wachstumsphase gehen einige der cyanobakteriellen Zellen in Dauerzellen (Akineten) über und überwintern.

Die Einteilung (Taxonomie) der Cyanobakterien in Familien erfolgt nach morphologischen Kriterien und nach der Vermehrungsweise [2, 8]. So können Cyanobakterien einzellig, in Zellgruppen (Kolonien) oder als Zellfäden (Filamente) auftreten (vgl. Abb. 1). Sie vermehren sich durch Zwei- oder Mehrfachteilung oder durch wiederholte Abgliederung endständiger Zellen. Fadenbildende Formen vermehren sich durch Freisetzung kurzer, beweglicher Zellfäden (Hormogonien). Es werden vier Familien (*Chroococcales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales* und *Stigonematales*) unterschieden, die jeweils in Gattungen unterteilt sind. Beispielsweise gehört die toxinproduzierende Gattung *Microcystis* zu der Familie der *Chroococcales*, die in Zellgruppen auftritt und sich durch Zwei- oder Mehrfachteilung vermehrt. Da gute Bestimmungsbücher für Cyanobakterien kaum verfügbar sind, ist die Identifizierung schwierig und erfordert viel Erfahrung. Besonders im Falle von gemischten Cyanobakterienvorkommen stellt die Identifizierung eine Herausforderung dar.

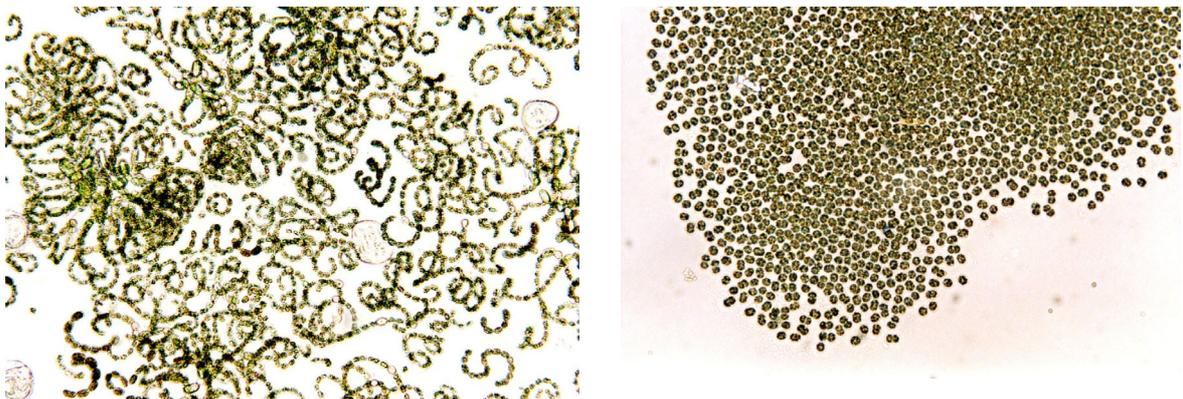


Abb. 1: Beispiele zweier Cyanobakterien aus bayerischen Oberflächengewässern. Links: *Anabaena flos-aquae*, rechts: *Microcystis aeruginosa*.

1.1.2 Faktoren, die Wachstum, Dominanz und Toxizität von Cyanobakterien beeinflussen

Einzelne Umweltfaktoren können abhängig von Randbedingungen unterschiedliche Auswirkungen auf das Wachstum, die Dominanz oder die Toxizität von Cyanobakterien haben. Beispielsweise muß ein Wachstumsfaktor nicht zwingend zu einer Dominanz von Cyanobakterien im Phytoplankton führen, da er u. U. anderen Organismen ebenfalls bessere Wachstumsbedingungen liefert. Umgekehrt kann ein limitierter Faktor zu einer Dominanz von Cyanobakterien führen, wenn diese bessere Speicher- oder Aufnahmemöglichkeiten besitzen. Ebenso ist keine strikte Korrelation zwischen Wachstumsfaktoren und Faktoren, die die Toxinproduktion von Cyanobakterien stimulieren, vorhanden.

Allgemein werden Lichtintensität, Trübung, Wassertemperatur sowie der Phosphor- und Stickstoffgehalt als wesentliche Einflußparameter angesehen. Cyanobakterien haben gegenüber den meisten dieser Parameter eine relativ große Toleranz entwickelt. So bewirkt eine hohe Lichtintensität eine hohe Photosynthese-Geschwindigkeit und damit die Produktion von Kohlenhydraten, die die Zellen absinken lassen. Dadurch werden diese vor zu hoher Lichtintensität geschützt. Unter eingeschränkten Lichtverhältnissen, z. B. in 3 m Wassertiefe, haben Cyanobakterien einen Selektionsvorteil gegenüber anderen photosynthetischen Organismen, da sie mit Hilfe der Phycobiline zusätzlich grünes sowie gelb-oranges Licht verwerten können. Im Vergleich zu Algen wachsen Cyanobakterien bei hohen Lichtintensitäten langsamer und bei geringen Lichtintensitäten schneller [9]. Auch unter normalen Bedingungen (20 °C und Lichtsättigung) wachsen Cyanobakterien langsamer als Algen. Aus diesem Grund kann es nur bei langen Wasserverweilzeiten, stehenden oder langsam fließenden Gewässern, zu Massenentwicklungen kommen.

Die Wassertrübung, hervorgerufen durch massives Algenwachstum, ist ein Parameter, der Cyanobakterien aus oben genannten Gründen einen Selektionsvorteil gegenüber Algen bringt und zu ihrer Dominanz führen kann. Erhöhter Gesamt-Phosphorgehalt ($> 10 \mu\text{g/L}$) verstärkt diesen Effekt zusätzlich [10]. Der Gesamt-Phosphorgehalt, für sich genommen, ist weniger kritisch für das Wachstum von Cyanobakterien, da diese über eine erhöhte Phosphor-Affinität und -Speicherkapazität verfügen [9]. Nichtsdestotrotz konnte bei Sanierungsmaßnahmen an Berliner Gewässern gezeigt werden, daß bei Gesamt-Phosphorgehalten unter $30 \mu\text{g/L}$, wesentlich geringere Zelldichten erreicht werden [11] und eine Massenentwicklung unwahrscheinlich ist.

Die optimale Wassertemperatur für das Wachstum von Cyanobakterien liegt mit 25 °C etwas höher als für Grün- oder Kieselalgen [9]. Dies erklärt ihre Dominanz im Spätsommer und Frühherbst in gemäßigten Klimazonen.

Kontrovers werden in der Literatur die Faktoren diskutiert, die die Toxizität von Cyanobakterien beeinflussen. STEINBERG [10] führt unterschiedliche Toxizitäten ein- und derselben Cyanobakterienart auf die Sukzession verschiedener Stämme, die unterschiedliche Mengen an Endotoxinen (z. B. Lipopolysacchariden) produzieren, zurück. RAPALA [12] hingegen konnte zeigen, daß zwei *Anabaena*-Gattungen die Toxinproduktion erhöhten, wenn erhöhte Phosphatkonzentrationen vorlagen. Hohe Temperaturen ($> 25 \text{ °C}$) und hohe Lichtintensitäten ($> 50 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$) verringerten die Toxinproduktion. Unterschiedliche Strukturvarianten der Toxine zeigten unterschiedliche Korrelationen mit Umweltfaktoren. Daß oben genannte Zusammen-

hänge nicht verallgemeinert werden können, zeigten LEHTIMAKI et al. [13], die die Toxinproduktion von *Nodularia spumigena* untersuchten. Sie konnten zeigen, daß die intrazellulären Nodularin-Konzentrationen unter optimalen Wachstumsbedingungen (erhöhte Temperatur, Lichtintensität und Phosphatgehalt) am höchsten waren. Möglicherweise ist ein besseres Verständnis der Biosynthese von cyanobakteriellen Toxinen notwendig, um diese Zusammenhänge besser zu verstehen.

Eine interessante Hypothese betreffend die Dominanz toxischer gegenüber untoxischer Cyanobakterienblüten wurde von SEDMAK und KOSI [14] aufgestellt. Sie postulierten, daß Microcystine als Wachstumsfaktoren für Cyanobakterien wirken und deshalb toxinproduzierenden Cyanobakterien-Spezies einen Selektionsvorteil gegenüber untoxischen Spezies ermöglichen. Als ein Argument für die Hypothese werteten die Autoren die Tatsache, daß die Mehrzahl der von Cyanobakterien gebildeten Wasserblüten toxisch sind. Ein weiteres Argument wäre die Tatsache, daß Microcystine Enzyminhibitoren von Proteinphosphatasen sind. Letztere sind wichtige Enzyme der Regulation der Zellteilung. Die Autoren konnten zeigen, daß Microcystine besonders unter schwachen Lichtbedingungen die Zellteilung der Cyanobakterien beschleunigen. Mit der dargestellten Hypothese kann nicht nur die Dominanz toxischer Cyanobakterienblüten erklärt werden, sondern auch die Produktion der Toxine vorwiegend gegen Ende des Wachstumszyklus und auch die Massenentwicklung anderer Algenarten nach dem Absterben von Blaualgenblüten.

1.1.3 Vergiftungen aufgrund von Cyanobakterien

Die vermutlich erste Beschreibung der Auswirkungen einer Algenblüte befindet sich im Alten Testament (ca. 1000 v. Chr.):

"... und alles Wasser im Strom wurde in Blut verwandelt. Und die Fische im Strom starben und der Strom wurde stinkend, so daß die Ägypter das Wasser aus dem Nil nicht trinken konnten; und es war Blut in ganz Ägyptenland." [15].

Hier wird eine untoxische, blütenbildende Algenart beschrieben, die ein so dichtes Wachstum zeigte, daß der dadurch erzeugte Sauerstoffmangel zu einem Fischsterben führte. Die Verringerung des Sauerstoffgehalts in Gewässern mit auftretenden Algenblüten wird auf die erhöhte Atmungsaktivität der Algen bei Nacht, vor allem jedoch auf den Sauerstoffverbrauch der algenabbauenden Bakterien während des Absterbens der Algenblüte zurückgeführt [5]. Vereinzelt wird auch in späterer Zeit von vergifteten Gewässern berichtet [6]. So wird von massivem Algenwachstum im Jahr 77 im Dnjepr, im Jahr 1188 im See Llangorse in Wales und im Jahr 1175 in Schottland berichtet. Die australischen Aborigines und die kanadischen Indianer erkannten und vermieden ebenfalls das vergiftete, vom Algenwachstum betroffene Wasser.

Die erste ausführliche Beschreibung einer giftigen Cyanobakterienblüte (*Nodularia spumigena*) und deren Auswirkungen stammt aus Australien vom Ende des 19. Jahrhunderts [16]. Es wurde von einem Viehsterben innerhalb eines Tages nach dem Trinken aus vergifteten Gewässern berichtet. Schon damals fiel auf, daß der Tod von Kühen, die normalerweise das stinkende, algenhaltige Wasser meiden, nicht direkt vom Genuß desselben

herrühren kann. Vermutlich wurden durch das Absterben der Algen genügende Mengen toxischer Substanzen freigesetzt, die auch klares, geruchsfreies Wasser flußabwärts vergifteten.

Mittlerweile sind Vergiftungen aufgrund von Cyanobakterien gut dokumentiert und in Übersichtsartikeln, oft nach Ländern oder Regionen gegliedert, zusammengefaßt [17-19]. Je ein Beispiel für akute und chronische Vergiftungen wird im weiteren vorgestellt.

Eine nachweislich auf cyanobakterielle Toxine (Microcystine) zurückführbare, tödliche Katastrophe für Menschen ereignete sich 1996 in einem Hämodialysezentrum in Brasilien [20, 21]. Hier starben 55 von 126 Patienten. In den ersten Wochen wurden neurotoxische Symptome (Übelkeit, Schwindel, Sehstörungen, Hörverlust), starke Leberblutungen (Leber-Hämorrhagie) und Leberversagen festgestellt. In dieser Zeit starben 23 Patienten. Bei den Überlebenden klangen die neurotoxischen Symptome ab und weitere Patienten starben infolge von Lebervergiftung oder den sich daraus ergebenden Komplikationen. Microcystin-LR, ein cyanobakterielles Hepatotoxin, konnte im Serum eines Patienten mittels HPLC-UV, Enzym-Inhibitionsassay, Immunoassay und LC-MS nachgewiesen werden. Der Versuch, die Microcystinkonzentration im Serum der Patienten durch Hämo-perfusion mit Kohle zu verringern, zeigte Erfolg. Allerdings stellte sich heraus, daß die Microcystinkonzentration anschließend wieder anstieg, was auf die Speicherwirkung von Organen wie der Leber zurückgeführt wurde. Die Wasserversorgung des Hämodialysezentrums war aus einem Wasserspeicher erfolgt, in dem schon einige Jahre zuvor regelmäßig Cyanobakterienblüten auftraten. Während das Wasser des betroffenen Dialysezentrums nur mit Flockungsmitteln versetzt wurde, wurde das Wasser für das zweite Dialysezentrum der Stadt zusätzlich filtriert und mit Chlor behandelt. In letzterem wurden keine Erkrankungen festgestellt.

Das zweite Fallbeispiel zeigt die chronischen Auswirkungen cyanobakterieller Toxine. Da in einigen Provinzen Chinas die Häufigkeit von primärem Leberkrebs in der Bevölkerung überdurchschnittlich hoch war, wurde nach chronischen Vergiftungswegen gesucht, die dafür verantwortlich sein könnten. Nachdem Aflatoxine als alleinige Verursacher ausgeschlossen werden konnten, wurden die Trinkwasserspeicher, Brunnen und Flüsse untersucht [22, 23]. Cyanobakterielle Toxine konnten in belasteten Trinkwasserspeichern in Konzentrationen von 0.06 bis 0.16 µg/L nachgewiesen werden. Gegenwärtig vermutet man, daß die Ursache der hohen primären Leberkrebsrate in China in einem Zusammenwirken von Aflatoxinen, die über die Nahrung aufgenommen werden, cyanobakteriellen Toxinen aus dem Trinkwasser und gehäuftem Auftreten des Hepatitis-B-Virus in der Bevölkerung liegt [24]. Als Vorsorge-maßnahme wird versucht, alle drei Risikofaktoren zu vermindern.

1.1.4 Cyanobakterien in Deutschland

Eine ausführliche Dokumentation der Vorkommen und Auswirkungen von Cyanobakterien in Deutschland erfolgte erst in jüngerer Zeit. Schäden an Menschen und Vieh wurden noch nicht registriert. Als Vergiftungsweg für Vieh kann das Trinken von belastetem Wasser und die Aufnahme über Futtermittel (Fisch- und Algenmehl) in Frage kommen. Die Aufnahme über Trinkwasser ist vermutlich aufgrund der stark industrialisierten Landwirtschaft und der daraus

folgenden Praxis der Viehtränke wenig akut. Der zweite Vergiftungsweg über Futtermittel ist bisher kaum untersucht worden, könnte aber aufgrund des Verbots von Tiermehl an Bedeutung gewinnen.

Relativ frühe Berichte über Massenentwicklungen von Algen in Trinkwasserspeichern existieren von der Wahnbachtalsperre bei Bonn [25]. Anfang der achtziger Jahre machten auch HENNING und KOHL auf Blaualgenblüten in einigen Seen der damaligen Deutschen Demokratischen Republik aufmerksam [26]. 1984 wird von einer massenhaften Vermehrung der Blaualge *Anabaena flos-aquae* im Ammersee (Bayern) berichtet [27].

Mittlerweile gibt es eine gute Erfassung der Cyanobakterienvorkommen in Oberflächengewässern der Umgebung von Berlin und Leipzig [28-33]. Aus Übersichtsstudien, die das Vorkommen von Microcystinen in deutschen Gewässern beschreiben, konnte geschlossen werden, daß ein Drittel der getesteten Gewässer von *Microcystis spp.*, *Planktothrix agardhii* oder *Planktothrix rubescens* dominiert wurden [34, 35]. *Anabaena*-Gattungen hingegen waren selten dominierend. Ebenso wurde das Phytoplankton nur in 7 % der Fälle von mehreren toxinproduzierenden Cyanobakterien gleichzeitig dominiert. Von den Gewässern, die von oben genannten Cyanobakterien dominiert wurden, waren nahezu 100 % Microcystin-belastet und damit toxisch. Jedoch wurden auch in Gewässern, die von anderen Cyanobakterien oder anderen Phytoplanktonarten dominiert wurden, Microcystine nachgewiesen. Diese Studien zeigen, daß bei vermehrtem Phytoplanktongehalt der Oberflächengewässer grundsätzlich immer mit Cyanobakteriengiften gerechnet werden muß.

Während die Studie hauptsächlich die Gewässer Ostdeutschlands und einige Gewässer Südwestdeutschlands erfaßt, gibt es über das Bundesland Bayern bisher kaum Studien zu der Relevanz der Cyanobakterien. Die Nährstoffbelastung der großen bayerischen Seen und Flüsse wurde durch Einführung von Ringkanalisationen und durch spezielle Reinigungsstufen in Kläranlagen reduziert [36]. Trotzdem werden in 10 % der natürlichen bayerischen Seen regelmäßige oder sporadische Blaualgenblüten registriert, während 30 % der künstlichen Seen davon betroffen sind [37].

Diese Daten zeigen, daß Cyanobakterien auch in Deutschland durchaus eine Gefahr für die Gesundheit darstellen, auch wenn diese Gefahr bisher hauptsächlich von der Nutzung der Gewässer als Badeseen ausgeht. Das Bundesgesundheitsamt (BGA) hat zum Zweck der Überwachung der Badegewässer Richtlinien herausgegeben, nach denen deren Belastung und die von ihnen ausgehende Gefahr eingeschätzt werden können und Vorsorgemaßnahmen getroffen werden können [11, 38].

1.1.5 Richtlinien und Grenzwerte für Cyanobakterien

Bisher gibt es wenige Überwachungsbehörden für Oberflächengewässer, die in der Lage sind, von Cyanobakterien produzierte Toxine analytisch nachzuweisen. Aus diesem Grund wurden in Deutschland Richtlinien zur Einschätzung des Gefährdungspotentials der Gewässer erarbeitet, die auf Erfahrungswerten beruhen [11, 38]. Zu der Überwachung der Gewässer gehört neben der regelmäßigen Messung des Nährstoffgehalts (Phosphor- und Stickstoffgehalt), der

Überprüfung des Sauerstoffgehalts und des pH-Wertes, auch die regelmäßige Messung der Sichttiefe. Liegt diese unter zwei Metern, so sind weitere Untersuchungen erforderlich. Dazu gehört die Messung des Chlorophyll-a-Gehalts, sowie die Speziescharakterisierung des Phytoplanktons. Oft wird ein Grenzwert von 15 000 bis 20 000 Zellen/mL [7, 39] bzw. 6 500 Zellen/mL [40] als noch akzeptabel für die Gesundheit angenommen. Die Messung der Zelldichte läßt sich neben den etablierten Verfahren wie der Chlorophyllbestimmung auch mit moderneren, selektiveren Verfahren durchführen. So läßt sich durch Vervielfachung des Erbmaterials mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Markierung der sequenzspezifischen Oligonukleotide die Zelldichte von toxinproduzierenden Cyanobakterien der Gattung *Microcystis* bis zu einer Nachweisgrenze von 100 Zellen/mL messen [41].

Da intakte Algenzellen in Trinkwasser kaum vorhanden sein sollten, gelten die oben genannten Richtlinien und Grenzwerte nur für Badegewässer. Sie können allerdings zu Fehleinschätzungen führen, wenn eine Algenblüte abstirbt, da in diesem Fall die Zahl der intakten Zellen gering sein kann, während die Konzentration des freigesetzten Toxins hoch ist. Die Richtlinien für Trinkwasser werden später beschrieben.

1.2 Cyanobakterielle Toxine

1.2.1 Einteilung der cyanobakteriellen Toxine

Strukturell gehören die cyanobakteriellen Toxine, auch Cyanotoxine genannt, drei unterschiedlichen Stoffklassen an: den cyclischen Peptiden, den Alkaloiden und den Lipopolysacchariden (LPS). Das Zielorgan der cyclischen Peptide ist die Leber, weshalb sie auch Hepatotoxine genannt werden. Alkaloide können neurotoxisch, cytotoxisch, dermatotoxisch wirken oder die Proteinsynthese hemmen. Lipopolysaccharide wirken reizend, ihr genauer Wirkmechanismus ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt.

Zu den wichtigsten Neurotoxinen gehören die Alkaloide Anatoxin-a, Anatoxin-a(s) und die Saxitoxine, die im englischsprachigen Raum auch Paralytic Shellfish Poisons (PSPs) genannt werden (s. Abb. 2).

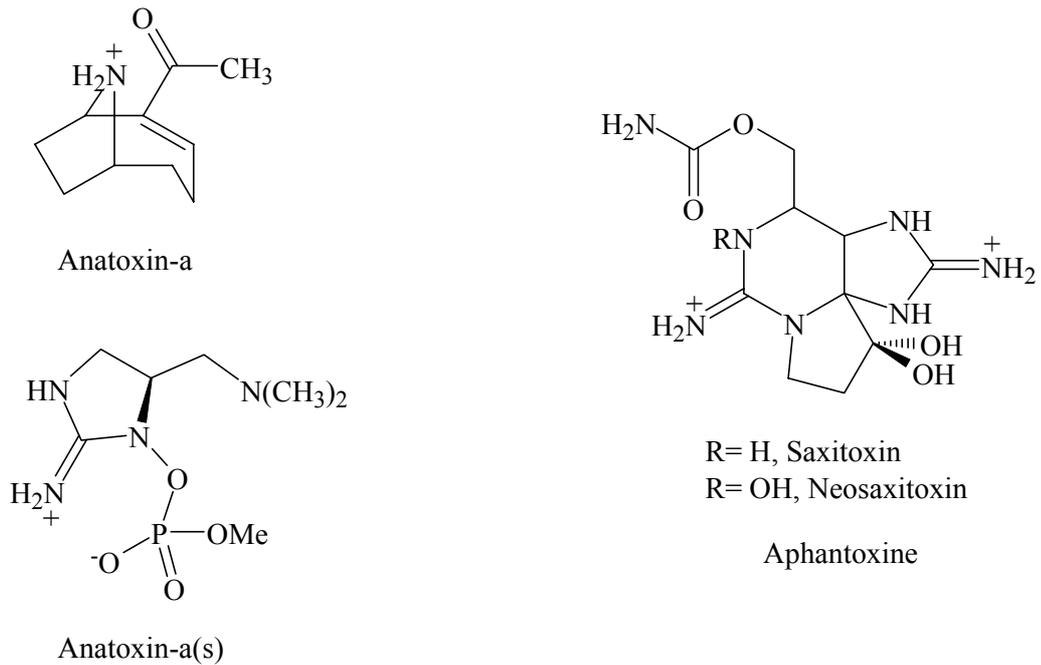


Abb. 2: Die chemischen Strukturen von *Anatoxin-a*, *Anatoxin-a(s)* und von *Aphantoxinen*, wichtigen Vertretern der Neurotoxine.

Anatoxin-a wird vorwiegend von *Anabaena*-, *Oscillatoria*- und *Aphanizomenon*-Gattungen produziert und hat eine lethale Dosis (LD_{50}) von 200-250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht [42]. Anatoxin-a(s) wird ebenfalls von *Anabaena*-Gattungen produziert und hat eine 10mal höhere Toxizität ($LD_{50} = 20 \mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.). Saxitoxine werden von Geißelalgen (Dinoflagellaten) und von einigen Cyanobakterien der Gattungen *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Lyngbya* und *Cylindrospermopsis* produziert. Sie blockieren die Natriumkanäle der Nervenzellen. Im Gegensatz zu den Hepatotoxinen besitzen die Neurotoxine keine chronische Toxizität. Allerdings reichern sie sich häufig in der Nahrungskette an, was ihr Gefahrenpotential steigert.

Ein cytotoxisches Alkaloid, das hauptsächlich in den tropischen und subtropischen Gewässern Australiens auftritt, ist *Cylindrospermopsin* (vgl. Abb. 3). Es greift vorwiegend die Leber an und hat einen LD_{50} von 2.1 mg/kg Körpergewicht in 24 Stunden. Nach ungefähr einer Woche sinkt der LD_{50} jedoch auf 0.2 mg/kg Körpergewicht [42].

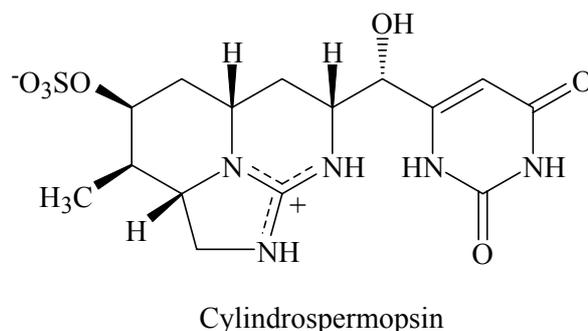


Abb. 3: Chemische Struktur von *Cylindrospermopsin*.

Obwohl einige der Cyanobaktérienspezies (*Cylindrospermopsis raciborskii*, *Umezakia nantans*, *Aphanizomenon ovalisporum*), die *Cylindrospermopsis* produzieren können, auch in Europa auftreten, scheinen sie in gemäßigten Klimazonen selten Wasserblüten zu bilden.

1.2.2 Struktur, Eigenschaften und Synthese der cyclischen Hepatotoxine

Zu den cyclischen Hepatotoxinen gehören Pentapeptide (Nodularine) und Heptapeptide (Microcystine). Nodularine werden vorwiegend von *Nodularia spumigena* hergestellt, einer Spezies, die in Meerwasser vorkommt. Die chemische Struktur von Nodularin-R ist cyclo-(D-MeAsp¹-L-Arg²-Adda³-D-Glu⁴-Mdhb⁵), wobei D-MeAsp für D-erythro-β-Methylasparaginsäure und Mdhb für 2-(Methylamino)-2-dehydrobuttersäure steht (vgl. Abb. 4). Wie Microcystine besitzen Nodularine die charakteristische β-Aminosäure Adda ((2S,3S,8S,9S)-3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4E,6E-diensäure).

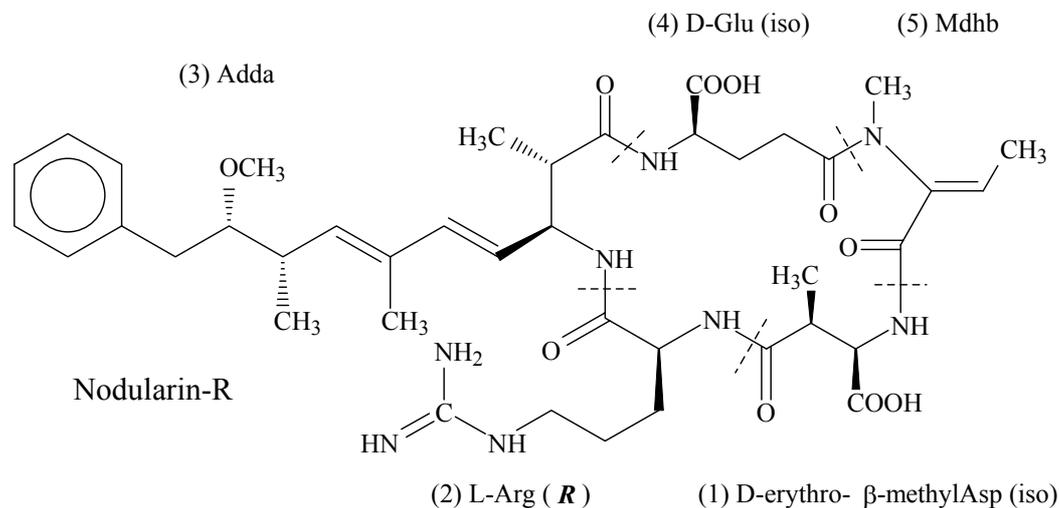


Abb. 4: Struktur von Nodularin-R. Mdhb steht für 2-(Methylamino)-2-dehydrobuttersäure und Adda für (2S,3S,8S,9S)-3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4E,6E-diensäure.

Es gibt nur wenige Strukturvarianten von Nodularin. Diese unterscheiden sich durch Methylierung, Desmethylierung oder in der Konfiguration der Doppelbindung der Adda-Seitenkette von Nodularin-R. Eine weitere Strukturvariante enthält statt der polaren L-Aminosäure Arginin (R) die hydrophobe Aminosäure L-Valin (V) in Position 2. Nodularin-V, auch Motuporin genannt, wurde in einem Meeresschwamm (*Theonella swinhoei*) gefunden [43]. Da dieser Meeresschwamm symbiontisch mit Cyanobakterien zusammenlebt, ist es wahrscheinlich, daß auch Motuporin cyanobakteriellen Ursprungs ist. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit der Argininvariante gearbeitet, die Nodularin oder Nodularin-R genannt wird.

Die strukturelle Vielfalt der Microcystine ist weitaus größer als diejenige der Nodularine. Über 90 Varianten wurden bisher charakterisiert [42, 44, 45]. Abb. 5 zeigt ihre allgemeine Struktur, cyclo-(D-Ala¹-L-X²-D-Asp³-L-Y⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-dehydroAla⁷). Microcystine werden

von den Cyanobakterien-Gattungen *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Planktothrix* und *Microcystis* produziert.

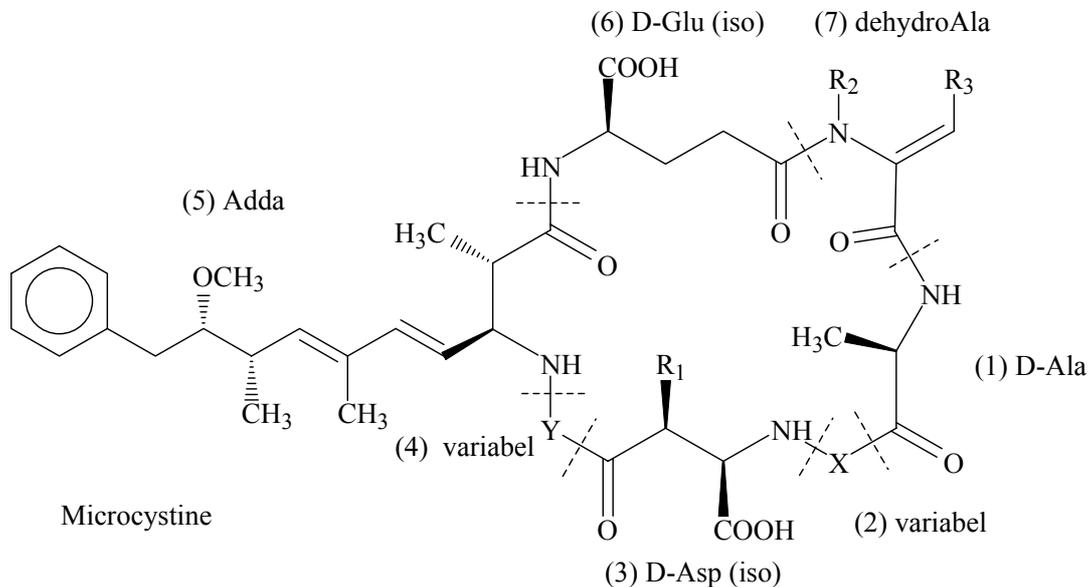


Abb. 5: Allgemeine Struktur der Microcystine: *cyclo-(D-Ala¹-L-X²-D-Asp³-L-Y⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-dehydroAla⁷)*. In Position 2 (X Einbuchstaben-Code) wurden folgende Aminosäuren gefunden: Alanin A, Arginin R, Glutaminsäure E, Leucin L, Methionin M, Phenylalanin F, Tryptophan W, Tyrosin Y, Valin V, sowie Homoisoleucin Hil, Homophenylalanin Hph, Homotyrosin Hty und Glutaminsäuremethylester E(OMe); In Position 4 (Y Einbuchstaben-Code) wurden folgende Aminosäuren gefunden: Alanin A, Arginin R, Leucin L, Phenylalanin F, Tryptophan W, Tyrosin Y, sowie Homoarginin Har, Glutaminsäuremethylester E(OMe) und Methioninsulfoxid M(O). R₁, R₂, R₃ können entweder Methyl oder Wasserstoff sein.

Die Nomenklatur der Microcystine erfolgt durch Anhang des Einbuchstaben-Codes der variablen Aminosäuren in Position 2 und 4 an den Namen *Microcystin*. Weitere Änderungen gegenüber der normalen Struktur werden in eckigen Klammern unter Angabe des Dreibuchstaben-Codes und der Position dem Namen *Microcystin* vorangestellt. Als normale Struktur gilt *cyclo(-D-Ala¹-L-X²-D-erythro-β-methylisoAsp³-L-Y⁴-Adda⁵-D-iso-Glu⁶-N-methyldehydroAla⁷)*. Neben der hohen Variabilität der Aminosäuren X und Y tragen Methylierungen oder Desmethylierungen der Seitenketten, Veresterung der Carbonsäuren und Acetylierung statt Methylierung des Sauerstoffs der Adda-Seitenkette zu der großen strukturellen Vielfalt der Microcystine bei.

Auffällig an der Struktur der Microcystine ist der geringe Anteil an proteinogenen Aminosäuren. Einzig die variablen Aminosäuren X und Y treten in der natürlichen L-Konformation auf. Die anderen fünf Aminosäuren sind entweder D-Aminosäuren, β-Aminosäuren oder besitzen aufgrund von Dehydrierung kein Stereozentrum. Zwei der Aminosäuren (Asparaginsäure und Glutaminsäure) sind über die Seitenketten in das Peptidgerüst eingebunden (*iso*-Form).

Am auffälligsten ist jedoch die C₂₀-Aminosäure Adda. Sie besitzt eine lange, hydrophobe Seitenkette mit vier Stereozentren, zwei konjugierten Doppelbindungen, einem Phenylring und einer Methoxygruppe. Die Adda-Seitenkette ist für einige wichtige Eigenschaften dieser cyclischen Peptide verantwortlich: Die konjugierte Doppelbindung liefert den Chromophor für die UV-Detektion (238 nm), die hydrophobe Seitenkette bestimmt maßgeblich die Polarität der Cyclopeptide und die α -Spaltung am Sauerstoff liefert in der Massenspektrometrie charakteristische Fragmentationen. Für andere Eigenschaften, wie z. B. die gute Löslichkeit von Microcystinen und Nodularinen in polaren Lösungsmitteln (z. B. Wasser), sind die sauren bzw. basischen Aminosäuren des Peptidgerüsts verantwortlich. Microcystine sind in Methanol bis zu einer Konzentration von ungefähr 20 g/L löslich. Die Löslichkeit sinkt in der Reihenfolge Wasser, DMSO, Acetonitril und Ethanol [46].

Die erste Strukturaufklärung eines Microcystins, damals Cyanoginosin genannt, erfolgte 1984 mittels NMR-Spektrometrie [47]. Vier Jahre später wurde die Stereochemie von Adda, sowie die Struktur des ersten cyclischen Pentapeptids dieser Verbindungsklasse (Nodularin-R) mittels NMR aufgeklärt [48]. Die Strukturaufklärung weiterer Microcystine erfolgte kurz danach. 1996 waren bereits 40 Microcystine charakterisiert [46].

Die erste stereoselektive Synthese von Adda gelangen NAMIKOSHI et al. kurz nach der Aufklärung der Stereochemie [49]. Weitere stereoselektive Synthesen von Adda und Adda-Dipeptiden folgten auf unterschiedlichen Syntheserouten [50-55]. 1996 gelang die erste Totalsynthese von Microcystin-LA durch HUMPHREY, AGGEN und CHAMBERLIN [56]. Drei Jahre später erfolgte die Synthese zweier Motuporin-(Nodularin-V)-Varianten durch TOOGOOD und Mitarbeiter [57]. Die Synthese dieser Naturstoffe ist für ein besseres Verständnis der Struktur-Wirkungsbeziehungen notwendig. Synthetische Analoga können beispielsweise durch ihre veränderte Wirkung von medizinischem Interesse sein. Außerdem kann ein synthetisches Zwischenprodukt zur Herstellung von Antikörpern mit allgemeiner Bindungskapazität für diese Verbindungsklasse dienen, wie in dieser Arbeit gezeigt werden soll. Die Syntheseausbeuten der bisher durchgeführten Totalsynthesen reichen allerdings nicht aus, die Verfügbarkeit der Microcystine und Nodularine zu verbessern. Nach wie vor wird die überwiegende Mehrzahl der analytisch eingesetzten Standards aus Cyanobakterien isoliert, was zur Folge hat, daß nur wenige Microcystine kommerziell erhältlich sind und dies zu einem relativ hohen Preis.

Die Kristallstruktur der cyclischen Hepatotoxine als Komplex mit dem Rezeptor und die Struktur in Lösung wurden mittels Röntgenbeugung bzw. NMR bestimmt [58-60]. In Lösung nimmt sowohl Microcystin als auch Nodularin eine starre Wannenkongformation ein. Einzig die Seitenketten von Adda und Arginin besitzen eine höhere Flexibilität. Diese Seitenketten stehen im Mittel fast senkrecht zueinander (s. Abb. 6).

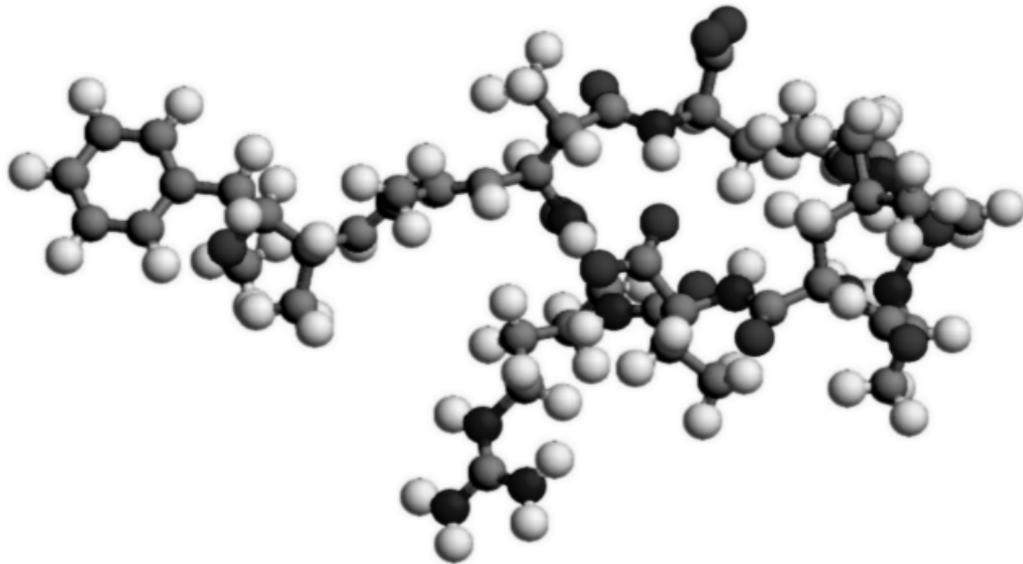


Abb. 6: Struktur von Microcystin-LR, Röntgenstruktur (Brookhaven-Datenbank).

Die Kenntnis der Konformation der Microcystine in Lösung erlaubt eine gezieltere Planung der Synthese von Immunkonjugaten für die Generierung von Antikörpern. Beispielsweise könnte die Arginin-Seitenkette als Kopplungsstelle für ein Trägerprotein dienen, da sie senkrecht zur Adda-Seitenkette und zum Peptidgerüsts steht.

1.2.3 Toxikologie

Akute Toxizität

Die akute Toxizität wird meist als LD_{50} -Wert ausgedrückt. Dieser Wert gibt die innerhalb eines Zeitraums tödliche Dosis eines Wirkstoffes für 50 % der Versuchstiere wieder. In Tabelle 1 sind die LD_{50} -Werte einiger Microcystine und Nodularine bei Injektion in die Bauchhöhle (intraperitoneal, i.p.) von Mäusen aufgelistet. Mit LD_{50} -Werten von 50-300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht gehören diese Toxine zu den giftigsten Naturstoffen überhaupt. Als Vergleich kann die tödliche Dosis von Kaliumcyanid von 50 mg, entsprechend ca. 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$, dienen [61]. Symptome für Vergiftungen sind Diarrhöe, Erbrechen, Schwächeanfälle und Blässe. Das Zielorgan ist die Leber, wo die Toxine durch einen carriervermittelten Membrantransport in die Zellen gelangen [62, 63] und angereichert werden. Die gezielte Schädigung von Leberzellen kann damit erklärt werden, daß Microcystine und Nodularine allgemein nicht zellpermeabel sind und eine Aufnahmemöglichkeit nur für Leberzellen über einen speziellen Membrantransport besteht. Ursprünglich wurde vermutet, daß Microcystine über denselben Membrancarrier in die Leberzellen gelangen wie Gallensäuren. Inzwischen ist bekannt, daß der Membrantransport der Microcystine einer zusätzlichen Regulation unterliegt, die für Gallensäuren nicht gilt [63]. Innerhalb der Leberzellen bewirken Microcystine eine Schädigung des Cytoskeletts. Dadurch können die Zellen ihre Form nicht mehr beibehalten, was zum Eindringen von Blut in die Leber führt. Der Tod tritt durch haemorrhagischen Schock (innere Verblutung) 1-3 Stunden nach der Verabreichung der tödlichen Menge ein.

Tabelle 1: Toxizitäten einiger Microcystine und Nodularine basierend auf der lethalen Dosis für 50 % der Mäuse bei Injektion in die Bauchhöhle (intraperitoneal) oder intravenös [42, 64-66].

Toxin	LD ₅₀ [µg/kg]	Toxin	LD ₅₀ [µg/kg]
Nodularin	50	[ADMAdda ⁵]Microcystin-LR	60
[D-Asp ¹]Nodularin	75	[ADMAdda ⁵]Microcystin-LHar	60
[DMAdda ³]Nodularin	150	[L-MeAla ⁷]Microcystin-LR	85
[L-MeAbu ⁵]Nodularin	150	[DMAdda ⁵]Microcystin-LR	90-100
[D-MeAbu ⁵]Nodularin	150	[D-MeAla ⁷]Microcystin-LR	100
[D-Glu-OCH ₃ ⁴]Nodularin	>1200	[L-MeSer ⁷]Microcystin-LR	150
[(6Z)-Adda ³]Nodularin	>2000	[D-Asp ³ ,ADMAdda ⁵]Microcystin-LR	160
Microcystin-LR	50	[Dha ⁷]Microcystin-RR	180
Microcystin-LA	50	[D-Asp ³]Microcystin-HtyR	160-300
[D-Asp ³]Microcystin-LR	50	[L,D-MeAla-Cys ⁷]Microcystin-YR	217
Microcystin-YM(O)	56	[Dha ⁷]Microcystin-LR	250
Microcystin-YR	70	[L,D-MeAla-Cys ⁷]Microcystin-LR	267
Microcystin-LY	90	[L,D-MeAla-GSH ⁷]Microcystin-YR	304
Microcystin-HtyR	80-100	[D-Asp ³ ,Dha ⁷]Microcystin-RR	300-500
Microcystin-HilR	100	[L,D-MeAla-GSH ⁷]Microcystin-LR	630
Microcystin-WR	150-200	[L-MeLan ⁷]Microcystin-LR	1000
Microcystin-AR	250	[D-Glu-OCH ₃ ⁶]Microcystin-LR	>1000
Microcystin-FR	250	[D-Glu-OC ₂ H ₃ (CH ₃)OH ⁶]Microcystin-LR	>1000
[D-Asp ³]Microcystin-RR	250	[(6Z)-Adda ⁵]Microcystin-LR	>1200
Microcystin-RR	600	[(6Z)-Adda ⁵]Microcystin-RR	>1200
Microcystin-M(O)R	700-800		

Abkürzungen: ADMAdda, O-Acetyl-O-desmethylAdda; Dha, Dehydroalanin; DMAdda, O-desmethylAdda; MeLan *N*-Methylanthionin; MeSer, *N*-Methylserin; MeAla-GSH Glutathion Konjugat durch Addition von Glutathion an die α,β -ungesättigte Carbonylfunktion von *N*-Methyldehydroalanin; MeAla-Cys analoges Cysteinkonjugat.

Auf molekularer Ebene wirken Microcystine und Nodularine durch Inhibition bestimmter Enzyme, der Serin/Threonin-Proteinphosphatasen (PP1, PP2a). Diese regulieren gemeinsam mit den Proteinkinasen den Phosphorylierungsgrad von Proteinen. Kinasen phosphorylieren, während die Phosphatasen dephosphorylieren. Werden die Proteinphosphatasen inhibiert, so kommt es zu einem Übergewicht phosphorylierter Proteine. Dies wirkt sich unter anderem auf das dynamische Gleichgewicht von Auf- und Abbau der Mikrofilamente des Cytoskeletts aus. Der Abbau von Untereinheiten wird dominant, was zu einem Zerfall des Cytoskeletts führt. Wie RUNNEGAR und Mitarbeiter zeigen konnten, wirkt sich eine Inhibition der Proteinphosphatasen auch auf den Membrantransport von Microcystin aus [63]. Die Aufnahme von Microcystin durch die Zellmembran wird inhibiert, wenn die Proteinphosphatasen durch Microcystin oder andere Substanzen inhibiert werden.

Da Microcystine normalerweise nicht durch Injektionen, sondern eher über die Haut, über Inhalation oder oral aufgenommen werden, zeigt Tabelle 2 eine Übersicht der LD₅₀-Werte für Microcystin-LR, die bei unterschiedlichen Aufnahmewegen erhalten wurden. Hieraus ist ersichtlich, daß die Toxizität von Microcystin-LR durch Inhalation vergleichbar mit der Aufnahme über intraperitoneale Injektion ist. Allerdings sind Microcystine als geladene Peptide praktisch nicht flüchtig, so daß sie lediglich als Aerosole, gebildet beispielsweise bei starkem Wellengang und entsprechenden Windverhältnissen, ein Risiko darstellen. Die orale Aufnahme ist 30-100mal weniger toxisch als über intraperitoneale Injektion. Die Aufnahme durch Hautkontakt ist vermutlich gering, da Microcystine nicht zellpermeabel sind. Allerdings kann Hautkontakt Hautreizungen hervorrufen.

Tabelle 2: Lethale Dosis (50 %) für Microcystin-LR bei verschiedenen Aufnahmewegen [67, 68].

Aufnahmeweg	LD ₅₀ [µg/kg Körpergewicht]
intraperitoneal oder intravenös	36-122
Inhalation	43
oral	5000
dermal	-

Therapiemöglichkeiten für Microcystin-Vergiftungen gibt es kaum, da der Leberschaden schnell, irreversibel und stark ist. Effektive Vorbeugung ist schwierig. Die verschiedenen Ansätze sind darauf ausgerichtet, den Transport durch die Zellmembran zu verhindern oder Microcystine durch Konjugatbildung zu entgiften. Das Blockieren des Membrantransports kann entweder inhibitorisch oder kompetitiv geschehen. In Tierexperimenten wurden Inhibitoren und Kompetitoren des Gallensäure-Membrantransports verabreicht. Auch andere membranaktive Substanzen wie das Antioxidationsmittel Vitamin E, das Antibiotikum Rifampin oder Cyclosporin A zeigten vorbeugende Wirkung [63, 68]. Eine Schutzwirkung wurde auch bei Konjugatbildung mit Glutathion (γ -Glutamylcysteinglycin) beobachtet. Dieses Tripeptid, das an Entgiftungs-, Transport- und Stoffwechselprozessen teilnimmt, wird auch als natürlicher Entgiftungsweg von Microcystinen in Erwägung gezogen [69]. Beispielsweise hat Microcystin-LR gegenüber Fischeiern eine relativ niedrige akute Toxizität. Hier kommt es zu einer Aktivierung der Glutathion-S-Transferase und zur Bildung von Microcystin-LR-Glutathion-Konjugaten [10]. Die LD₅₀-Werte der Glutathion-Konjugate von Microcystin-LR und -YR in Tabelle 1 zeigen jedoch, daß die Konjugatbildung die Toxizität lediglich um den Faktor 6-12 vermindert. Sie könnte folglich einen ersten Schritt im Metabolismus der Microcystine darstellen.

Chronische Toxizität

Die chronische Toxizität ist für die Herleitung von Grenzwerten für Trinkwasser entscheidend. Unter Berücksichtigung eines Sicherheitsfaktors kann aus der niedrigsten, regelmäßig eingenommenen Dosis, die keine Langzeitschäden zeigt, ein Trinkwassergrenzwert

bestimmt werden. FAWELL und Mitarbeiter haben in einer Langzeitstudie bei einer oralen täglichen Dosis von 40 µg Microcystin-LR pro Kilogramm Körpergewicht bei Mäusen keine negativen Effekte festgestellt. Microcystin-LR wurde durch künstliche Ernährung über eine Magensonde zugeführt. Die Autoren errechneten aus den Ergebnissen einen Trinkwassergrenzwert von 1 µg/L Microcystin-LR [67]. Dieser Wert wurde als vorläufiger Grenzwert von der Weltgesundheitsorganisation WHO übernommen [70]. HEINZE et al. fanden hingegen bei einer täglichen Dosis von 50 µg/kg Microcystin-LR im Trinkwasser von Ratten eine Zunahme des Lebergewichts und eine Veränderung der Enzymaktivitäten der Leber [71]. UENO und Mitarbeiter fanden keine chronische Toxizität und keine Anreicherung von Microcystin-LR in Mäusen bei Langzeitkonsum von Trinkwasser mit 20 µg/L Microcystin-LR [72]. Sie leiteten einen Trinkwassergrenzwert von 0.01 µg/L ab. Dieser Grenzwert könnte auch aufgrund der Tumorpromotor-Wirkung von Microcystinen und Nodularinen gerechtfertigt sein. Diese Wirkung wurde bei der Herleitung des vorläufigen Grenzwertes von der WHO nicht berücksichtigt. Daß Microcystine das Wachstum von Lebertumoren beschleunigen, ist schon länger bekannt [73]. Nodularin hat eine stärkere Tumorpromotor-Wirkung als Microcystin-LR und kann Tumore auch auslösen [74]. Der Mechanismus der Tumorpromotion ist äußerst komplex [75] und soll hier nicht weiter diskutiert werden.

1.2.4 Stabilität und Abbau der Microcystine

Microcystine und Nodularine sind relativ stabile chemische Verbindungen. Bei neutralem pH-Wert, Raumtemperatur und Dunkelheit sind sie über Monate stabil. Die reaktiveren Teilstrukturen dieser Substanzen sind einerseits die konjugierte Doppelbindung der Adda-Seitenkette und andererseits die Enamid-Struktur der Aminosäure 7 (*N*-Methyldehydroalanin). Da die Adda-Seitenkette eine wichtige Rolle bei der Erkennung durch die Rezeptoren (Proteinphosphatasen) ausübt, führen Änderungen der Konformation oder Struktur meist zu einer Verminderung der Toxizität. Oxidative Prozesse und UV-Strahlung greifen die konjugierte Doppelbindung der Adda-Seitenkette an. Diese Prozesse werden in der Trinkwasseraufbereitung häufig eingesetzt und sind eingehend untersucht worden. Als Oxidationsmittel wurden Chlor, Natriumhypochlorid, Calciumhypochlorid, Wasserstoffperoxid, Kaliumpermanganat und Ozon eingesetzt. Ozon hat die höchste Effektivität in der Zerstörung von gelösten Microcystinen und Nodularinen [76]. Chlor und Calciumhypochlorid sind bei neutralen bis sauren pH-Werten ebenfalls geeignet [77]. Allerdings muß der Anteil an gelöstem Chlor höher sein als die Microcystinkonzentration. Außerdem ist zu beachten, daß durch Vorhandensein organischer Amine das unreaktive Chloramin entsteht. Ein Reaktionsprodukt der Behandlung mit Chlor wurde als Dihydroxymicrocystin identifiziert, wobei eine Doppelbindung der Adda-Seitenkette hydriert wurde [78]. Wasserstoffperoxid ist wenig effektiv in der Zersetzung von Microcystinen.

UV-Strahlung im Bereich des Absorptionsmaximums und Photokatalyse mit Titandioxid haben zwei photochemische Reaktionen zur Folge. Einerseits werden die Doppelbindungen isomerisiert, andererseits wird eine [2+2]-Cycloaddition zwischen dem Phenylring und einer Adda-Doppelbindung beobachtet [79]. Die Änderung der all-trans-Konformation der Adda-Doppelbindung durch UV-Strahlung führt zu einer drastischen Verminderung der Toxizität.

Allerdings wird durch diese Reaktion ein Gleichgewichtszustand zwischen Z- und E-Konformation erreicht, der dazu führt, daß ein vollständiges Abreagieren zu einer untoxischen Variante unmöglich wird. Um Microcystine vollständig zu zersetzen, sind Strahlungsintensitäten nötig, die in der Trinkwasseraufbereitung normalerweise nicht eingesetzt werden [80]. Die photokatalytische Zersetzung von Microcystin mit Titandioxid als Katalysator führt u. a. zu der Oxidation einer der beiden Adda-Doppelbindungen [81].

Ähnlich der Photochemie bei künstlicher Bestrahlung, können Microcystine auch unter natürlichen Lichtbedingungen bei Vorhandensein von Farbpigmenten isomerisieren. Aus Japan wird berichtet, daß bei toxischen Cyanobakterienblüten normalerweise 5-15 % der Microcystine als geometrische Isomere der all-trans-Konformation der Adda-Seitenkette auftreten [82]. Ohne die Energieübertragung durch Farbpigmente sind Microcystine bei Sonnenlicht über lange Zeit stabil. Auf einen durch cyanobakterielle Pigmente katalysierten Abbau von Microcystin-LR deutet die Beobachtung von LAHTI et al. hin, daß gelöstes Microcystin wesentlich langsamer abgebaut wird als Microcystin in absterbenden Zellen [83].

Auch gegenüber pH-Wert und Temperatur sind Microcystine sehr stabil. Sie werden durch Erhitzen auf 100 °C nicht zerstört. Erst bei einem pH-Wert von 1 und 40 °C sind nach 80 Tagen 90 % des Microcystin-LR zerstört. Ein pH-Wert von 9 und 40 °C führt in derselben Zeit zu ca. 20 % der ursprünglichen Toxinmenge [84]. Bei neutralen pH-Werten wird nur eine geringe, nicht temperaturabhängige Zersetzung über einen Zeitraum von 80 Tagen beobachtet. Interessanterweise wurde sowohl bei saurer als auch bei basischer Behandlung eine Spaltung des Peptidrings an der Enamidbindung des *N*-Methyldehydroalanins beobachtet. Die Adda-Seitenkette scheint durch diese Behandlung nicht angegriffen zu werden.

Die enzymatische Hydrolyse der Microcystine und Nodularine wird nur selten beobachtet. Dies liegt einerseits an der cyclischen Struktur der Peptide und damit dem Fehlen von N- oder C-terminalen Aminosäuren und andererseits an dem Vorhandensein von fünf bzw. vier nicht proteinogenen Aminosäuren. Microcystine und Nodularine werden deshalb von den üblichen Proteasen, wie z. B. Trypsin, nicht hydrolysiert. Unter natürlichen Bedingungen wurde ein Abbau von Microcystinen durch Bakterien allerdings schon beobachtet. BOURNE und Mitarbeiter isolierten ein Bakterium der Gattung *Sphingomonas*, das in der Lage war, die Adda-Arginin-Bindung von Microcystin-LR zu spalten [85]. Es wird vermutet, daß mehrere Enzyme an der Spaltung beteiligt sind. HERESZTYN und NICHOLSON konnten zeigen, daß Nodularin in Gewässern, die öfter cyanobakterielle Blüten haben, schneller abgebaut wird als in solchen, wo selten Blüten auftreten [86]. Da der Prozeß von Kupfersulfat inhibiert wurde, folgerten sie einen bakteriellen Abbau. Dieses Ergebnis würde bedeuten, daß im Falle einer Gewässerbehandlung mit Kupfersulfat, nicht nur mehr Toxine durch Absterben der Cyanobakterien freigesetzt werden, sondern auch der bakterielle Abbau inhibiert würde.

1.2.5 Grenzwerte und Trinkwassermanagement

Der vorläufige, von der Weltgesundheitsorganisation festgelegte Trinkwassergrenzwert für Microcystine beträgt 1 µg/L Microcystin-LR [70]. Dieser Grenzwert gilt für die Summe von zellgebundenem und freiem Microcystin-LR, auch wenn Trinkwasser keine Cyanobakterien-

zellen mehr enthalten sollte. Für andere Microcystine, Nodularine oder deren Summe wurde aufgrund ungenügender Daten kein Grenzwert festgelegt. Einzelne Länder haben eigene Grenzwerte festgelegt. So gilt z. B. in Australien ein Grenzwert von 1.3 µg/L Microcystin-LR-Toxizitätsäquivalenten für freies sowie zellgebundenes Toxin [40]. Die Toxizitätsäquivalente beziehen sich auf die UV-Detektion in der HPLC. Dabei wird davon ausgegangen, daß alle Microcystine ähnliche Extinktionskoeffizienten bei einer bestimmten Wellenlänge wie Microcystin-LR aufweisen. Für Deutschland wurde bisher noch kein Grenzwert festgelegt.

Die Eliminierung der Microcystine in der Trinkwasseraufbereitung kann neben den in Abschnitt 1.2.4 besprochenen chemischen Methoden auch durch physikalische Methoden erreicht werden. Hier sind insbesondere die Filtration und die Ausflockung von intakten Cyanobakterienzellen über beispielsweise Sandbänke bzw. mit Aluminiumsulfat, die Nanofiltration, Umkehrosmose und die Adsorption an Aktivkohle zur Entfernung von gelösten Microcystinen zu nennen. Einen Überblick über die Effektivität und die Anwendungsbereiche der verschiedenen Methoden liefern HRUDEY et al. [87] und SCHMIDT [88]. Die beste Variante ist allerdings die Vermeidung von Cyanobakterienblüten durch Reduktion des Düngemittelsatzes.

2 Analytik von Microcystinen

2.1 Probenahme und Probenvorbereitung

Prinzipiell ist zwischen einer diskontinuierlichen und einer kontinuierlichen Probenahme zu unterscheiden. Bei der diskontinuierlichen Probenahme werden in regelmäßigen Abständen an vorher festgelegten Stellen Proben über einen gewissen Zeitraum genommen. Alternativ können auch Stichproben genommen werden, beispielsweise wenn es zu unerwarteten Algenblüten in Seen kommt. Die kontinuierliche Probenahme und Analyse kann mit Sensoren durchgeführt werden, die an einer oder mehreren bestimmten Stellen aufgebaut sind. Für beide Arten der Probenahme stellt die überaus heterogene Verteilung der Cyanobakterien in Gewässern ein Problem dar. Cyanobakterien sind sowohl über die Fläche als auch über das Tiefenprofil von Gewässern inhomogen verteilt. Durch auftretenden Wind ändern sie ihre Position auf der Seeoberfläche, während das Temperaturprofil des Sees und das Gleichgewicht zwischen den gasgefüllten Vakuolen und Kohlenhydratballast das Tiefenprofil der Cyanobakterien regelt. Auf örtliche Änderungen kann das diskontinuierliche Probenahmeverfahren flexibler reagieren, während zeitliche Schwankungen besser mit dem kontinuierlichen Probenahmesystem überwacht werden können. Kriterien, die bei der Auswahl der Probenahmestellen, der Bestimmung der Häufigkeit der Probenahme und der Durchführung der Probenahme zu beachten sind, wurden in [89] beschrieben.

Weiterhin ist bei Probenahme und Probenvorbereitung zu beachten, daß zwischen intra- und extrazellulärem Microcystingehalt unterschieden werden kann. Wird der Summenwert benötigt, so kann die Zell-Lyse und Microcystinextraktion mit der gesamten Probe durchgeführt werden. Ist jedoch eine Aufschlüsselung in intra- und extrazellulären Microcystingehalt erwünscht, so sollte die Probe so rasch wie möglich filtriert werden, um eine Verfälschung der Werte durch Absterben von Cyanobakterien zu verhindern. Da der extrazelluläre Microcystingehalt um Größenordnungen kleiner ist, als der intrazelluläre (falls die Zellen nicht im Absterben begriffen sind), kann er ohne Anreicherung nur mit hochempfindlichen Analyseverfahren nachgewiesen werden. Aus diesem Grund beziehen sich die Mehrzahl der bisherigen Daten auf den intrazellulären Microcystingehalt oder den Summenwert aus intra- und extrazellulärem Microcystin. In diesem Fall wird der Microcystingehalt entweder auf die Gesamtbiomasse, die Cyanobakterienbiomasse oder auf das Probenvolumen bezogen. Die Biomasse läßt sich entweder aus der Zellzahl oder aus dem Chlorophyll-a-Gehalt abschätzen [90]. Sie kann auch nach Filtration (Filter mit 0.7-1.2 µm Porendurchmesser) durch Auswiegen der Filter bestimmt werden. Bei diesem Verfahren sollte zunächst durch ein Sieb der Maschenweite 1-2 mm vorfiltriert werden, um gröbere Partikel zu entfernen.

Für die Extraktion der Microcystine aus Zellen müssen diese zunächst lysiert und die Microcystine anschließend mit Lösungsmittel extrahiert werden, in denen polare wie unpolare Microcystine löslich sind. Für die Zell-Lyse wurden bisher physikalische und chemische Methoden eingesetzt. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen, Ultraschallbehandlung, mechanische Gewebezerkleinerung, Kochen und Mikrowellenaufschluß [91] wurden als physikalische

Methoden eingesetzt. Allerdings sind Cyanobakterienzellen physikalisch relativ stabil, so daß beispielsweise Ultraschallbehandlung mit gängigen Laborgeräten oder Zentrifugation bei 17 000 U/min keine effizienten Verfahren für die Zell-Lyse sind [92]. In der Praxis werden diese Verfahren meist mit chemischen kombiniert. Als Extraktionsmittel wurden 5%ige Essigsäure, Methanol, mit TFA angesäuertes Methanol, Methanol/Wasser-Mischungen oder *n*-Butanol/Methanol/Wasser-Mischungen eingesetzt [93]. Jedes dieser Extraktionsmittel hat seine Vor- und Nachteile. Extraktion mit 5%iger Essigsäure kann den Anteil an mitextrahierten Proteinen reduzieren und hat den Vorteil, daß mit der Extraktionslösung direkt eine Festphasenextraktion durchgeführt werden kann. Allerdings werden hydrophobe Microcystine mit wäßrigen Extraktionsmitteln kaum erfaßt. Methanol unterdrückt den Glycoproteinanteil im Extrakt fast vollständig, extrahiert dafür Farbpigmente mit. Bei Verwendung von angesäuertem Methanol als Extraktionsmittel muß auch beachtet werden, daß Methylester der Carbonsäuren entstehen können. Da die Ester der Glutaminsäure in Position 6 der Microcystine erheblich weniger toxisch sind als die freie Säure, kann dies zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse führen. Ternäre Mischungen haben sich als Extraktionsmittel nicht durchgesetzt, da die Vorteile nicht eindeutig waren und die Prozedur komplizierter ist.

Enzymatische Zell-Lyse der Cyanobakterien wurde bisher noch nicht erfolgreich durchgeführt. Dies mag unter anderem daran liegen, daß es sich um gram-negative Bakterien handelt, die aufgrund des hohen D-Aminosäure-Anteils der Peptidglycan-Zellwand lysozymstabil sind.

Bei einer on-line-Extraktion muß beachtet werden, daß Cyanobakterien sich oft auf der Gewässeroberfläche aufhalten und sich daher eher durch Abdekantieren als durch Sedimentieren oder Zentrifugieren abtrennen lassen. Organische Lösungsmittel sind für die on-line-Extraktion weniger geeignet, da einerseits die Aufarbeitung mittels Festphasenextraktion und andererseits bioanalytische Meßverfahren auf wäßrige Lösungsmittel angewiesen sind.

Die Probenvorbereitung dient zur Entfernung der Matrix und zur Anreicherung der Microcystine. Die Matrix enthält Zellinhaltsstoffe (z. B. Farbpigmente, Proteine, Peptide), wenn Microcystine in Cyanobakterien-Extrakten analysiert werden oder Wasserinhaltsstoffe (z. B. Huminstoffe, Salze, Chlor) im Falle der Analyse von Wasserproben. In beiden Fällen kann das Verhältnis von Analyt zu Matrix äußerst ungünstig sein. Eine weit verbreitete Methode der Probenvorbereitung ist die Festphasenextraktion mit C₁₈-Silica-Kartuschen nach LAWTON et al. [94]. Hier wird die Probe zunächst filtriert, das Filtrat mit Trifluoressigsäure (TFA) angesäuert, erneut filtriert und auf einer vorkonditionierten C₁₈-Kartusche angereichert. Es wird mit Wasser, 10, 20 und 30 %igem Methanol gespült und nach Trocknen der Kartuschen mit Methanol/TFA eluiert. Diese Methode wurde ursprünglich nur für Wasserproben (Trinkwasser und Seewasser) und nicht für cyanobakterielle Extrakte angewendet. Hydrophile Microcystine wie Microcystin-LR und -RR sowie Nodularin-R zeigen sehr gute Wiederfindungen. Je hydrophober die Microcystine sind, desto geringer und unreproduzierbarer sind jedoch die Wiederfindungen: 83 bis 118 % für Microcystin-LY; 61 bis 88 % für Microcystin-LF und 0 bis 60 % für Microcystin-LW. Dieses Ergebnis zeigt ein typisches Problem der Microcystin-Analytik. Die Substanzklasse der Microcystine deckt einen sehr weiten Polaritätsbereich ab, dem bei Anwendung von chromatographischen Verfahren Rechnung getragen werden muß.

Für andere Wasserproben und Cyanobakterien-Extrakte erwies sich die Festphasenextraktion an C₁₈-Silica-Material als nicht ausreichend, um koeluerende Substanzen zu entfernen [95]. Zusätzliche Reinigungsschritte wurden eingeführt. TSUJI et al. kombinierte die Umkehrphasenanreicherung mit Normalphasenanreicherung an Silicagel [96]. Häufiger jedoch ist Größenausschluß-Chromatographie an Sephadex G-25 oder LH-20, Superdex-Peptid oder Toyopearl HW-40F mit Umkehrphasen-Chromatographie kombiniert worden [97-101].

Eine Alternative zu der Festphasenextraktion auf Basis von Polarität oder Größe ist die Immunoaffinitätsanreicherung. Diese Methode ist aufgrund der Antikörper-Analyt-Wechselwirkung sehr selektiv und daher effizient. Immunoaffinitäts-Kartuschen, beladen mit polyklonalen oder monoklonalen Antikörpern, wurden zur Aufreinigung und Anreicherung von Microcystinen bereits erfolgreich eingesetzt [102-104]. Eine Einschränkung dieser Methode ist die Verfügbarkeit und der Preis von Antikörpern. Bisher sind Immunoaffinitäts-Kartuschen für Microcystine nicht kommerziell erhältlich. Um eine Anreicherung aller Microcystine zu gewährleisten, können entweder Antikörper mit einem breitem Erkennungsspektrum oder eine Kombination mehrerer Antikörper eingesetzt werden. Ein Vorteil dieser Methode ist ihre Komplementarität zu der Umkehrphasen-Chromatographie. Da die Elution von Immunoaffinitätskartuschen mit weitgehend wäßrigen Medien erfolgt, kann das Eluat direkt auf Umkehrphasen chromatographiert werden.

2.2 Trennmethoden

2.2.1 Umkehrphasen-Chromatographie

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie an Umkehrphasen (engl. reversed-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC) ist die am häufigsten angewandte Methode zur Analyse von Microcystinen und Nodularinen. Die Seitenkette der Aminosäure Adda verleiht diesen Peptiden genügend hydrophoben Charakter, um an Umkehrphasen zu adsorbieren. Tatsächlich hat die Aminosäure Adda und die hydrophilen Microcystine, wie Microcystin-LR, sehr ähnliche Retentionsverhalten auf C₁₈-Silica-Material, wie in dieser Arbeit gezeigt wird. Die Vorteile der Chromatographie gegenüber den empfindlicheren Bioassays sind die Trennung und damit Quantifizierbarkeit einzelner Microcystine. Die Detektion und Quantifizierung erfolgt meist bei dem Absorptionsmaximum der konjugierten Doppelbindung der Adda-Seitenkette, bei 238 nm. Microcystin-LR hat bei 238 nm einen molaren Extinktionskoeffizienten von 39 800 L/mol·cm in Methanol [105]. Dieser Wert erlaubt eine Detektion von Microcystinen mit Nachweisgrenzen von 10-20 ng absolut (0.2-0.4 mg/L bei 50 µL Injektionsvolumen) [95]. Oft wird die analytische RP-HPLC in Kombination mit Festphasenextraktion durchgeführt. Durch den zusätzlichen Anreicherungsschritt werden Nachweisgrenzen von einigen Nanogramm absolut (20-100 µg/L bei Injektionsvolumen von 50 µL) erreicht [94, 106]. Da die molare Absorption der Microcystine bei 238 nm sehr ähnlich ist, wird sie oft zum Quantifizieren unbekannter Microcystinpeaks herangezogen. Die Ergebnisse werden als Microcystin-LR-Äquivalentkonzentrationen angegeben. Auf dieser Methode

beruht das Verfahren zur Bestimmung des Gesamt-Microcystingehaltes in der australischen Trinkwasser-Richtlinie. Allerdings besteht hierbei die Gefahr, andere Substanzen, die bei 238 nm absorbieren, ebenfalls als Microcystine zu klassifizieren.

Während als Festphase meist mit Octadecyl-Silica gearbeitet wird, haben sich als mobile Phase Acetonitril/Wasser-Mischungen durchgesetzt. Als Additiv wird häufig Trifluoressigsäure (engl. trifluoroacetic acid TFA) zugesetzt. Diese protoniert die Carboxylgruppen der Peptide und unterdrückt als Ionenpaarreagenz die Wechselwirkungen der basischen Gruppen mit Silanolgruppen der Festphase. Weitere Vorteile sind die gute UV-Transparenz von TFA und die Flüchtigkeit. HPLC-Fractionen können, ohne Laufmittelrückstände zurückzulassen, eingedampft werden. Ein Nachteil bei Verwendung von TFA-Zusätzen ist die Tatsache, daß die UV-Absorption in Wasser und Acetonitril unterschiedlich ist. Dies beruht auf den unterschiedlichen Dielektrizitätskonstanten der Lösungsmittel, die sich auf die π - π^* -Elektronenübergänge der Trifluoressigsäure auswirken [107, 108]. Da der Unterschied der Absorptionen bei 238 nm besonders groß ist, erhält man bei Elutionsgradienten eine driftende Basislinie, wenn mit gleichen Anteilen TFA in Wasser und Acetonitril gearbeitet wird.

Neben Gradientenelutionen, wie beispielsweise von LAWTON et al. und HUMMERT et al. beschrieben [94, 101], werden auch isokratische Verfahren angewendet. HARADA et al. untersuchten Wasser/Methanol-Mischungen, wobei die wäßrige Phase alternativ 0.05 % (v/v) TFA, 50 mM Phosphatpuffer (pH 3) oder 50 mM Natriumsulfat enthielt [109]. Alle drei Elutionsmittel waren zu einer schnellen Trennung von Microcystin-LR und -YR auf einer C_{18} -Phase in der Lage. Diese Methoden sind insbesondere für die präparative HPLC von Interesse.

Alternativ zu der UV-Detektion von Microcystinen sind zwei Methoden der Vorsäulenderivatisierung und anschließenden Fluoreszenz- bzw. Chemilumineszenz-Detektion beschrieben worden. Bei der ersten Methode wird ein dienophiler Fluoreszenzfarbstoff über eine DIELS-ALDER-Reaktion an die konjugierte Doppelbindung der Adda-Seitenkette addiert. Es werden jeweils zwei Stereoisomere für ein Microcystin erhalten, die aufgrund von unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften unterschiedliche Nachweisgrenzen besitzen [110]. Das besser fluoreszierende Derivat von Microcystin-LR führt zu einer Nachweisgrenze von 0.1 ng und das von Microcystin-RR zu 0.065 ng absolut. Bei der zweiten Methode wird in einer zweistufigen Reaktion zunächst Cystein an die α,β -ungesättigte Carbonylgruppe des *N*-Methyldehydroalanins addiert. Anschließend erfolgt die Addition des Fluoreszenzfarbstoffes 5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonyl (Dansyl) an die Aminogruppe des Cysteins [111]. Mit Hilfe von Chemilumineszenz-Detektion werden hier Nachweisgrenzen kleiner 0.02 ng absolut erreicht. Dies würde im Falle eines Injektionsvolumen von 50 μ L 0.4 μ g/L Microcystin-LR entsprechen. Auch wenn die Derivatisierungsverfahren kompliziert und bisher nicht Teil der Routineanalytik geworden sind, so geben sie doch einen Einblick in die Chemie der Microcystine. Bei diesen Arbeiten stellte sich z. B. heraus, daß sich die Carboxylgruppen der Microcystine nicht für reproduzierbare Kopplungen mit sterisch anspruchsvollen Substanzen eignen. Dies wurde auf die sterische Hinderung durch funktionelle Gruppen in der Nachbarschaft der Carboxylgruppen zurückgeführt.

2.2.2 Andere HPLC-Methoden

Als weitere Methoden zur HPLC-Trennung von Microcystinen sind die Ionenchromatographie an Ionenaustauschern [112] sowie die Chromatographie an inneren Oberflächen (restricted access materials, RAM) beschrieben worden [93, 113]. Bei der Chromatographie an inneren Oberflächen (z. B. Pinkerton-Phasen) besteht die Festphase aus Silicateilchen mit hydrophiler Kornoberfläche und hydrophoben Poren. Die Poren sind nur für kleine Moleküle (Molmasse < 5000 Da) zugänglich, so daß Größenausschluß neben Polarität die Trennmechanismen sind. Diese Phasen haben den Vorteil, einen Teil der Matrix abzutrennen, sowie den Nachteil geringerer Stabilität gegenüber sauren pH-Werten und hohen Anteilen an organischem Lösungsmittel.

2.2.3 Gaschromatographie (GC)

Da Microcystine und Nodularine nicht flüchtig sind, lassen sie sich ohne Derivatisierung nicht mittels Gaschromatographie nachweisen. Flüchtige Spaltprodukte, die aus allen Vertretern dieser Substanzklasse erhalten werden können, sind jedoch für die Bestimmung eines Summenwertes geeignet. KAYA und SANO erhielten ein flüchtiges, allen Microcystinen gemeinsames Spaltprodukt durch oxidative Spaltung der Doppelbindungen der Adda-Seitenkette und anschließende Veresterung der entstandenen Säure [114]. Bei dem Produkt handelt es sich um einen Teil der Adda-Seitenkette in oxidierte Form (*erythro*-2-Methyl-3-methoxy-4-phenylbuttersäure, MMPB). Die Nachweisgrenze der GC/CI-MS liegt bei 0.1 ng MMPB absolut, was einer Nachweisgrenze von ungefähr 0.43 ng Microcystin entspricht. Ein Vorteil dieser Methode ist die Tatsache, daß sie ohne schwer erhältliche, teure Microcystinstandards auskommt. MMPB kann aus Microcystinen entweder durch Oxidation mit Natriumperiodat und Kaliumpermanganat hergestellt werden [114] oder durch Ozonolyse, wie von HARADA et al. beschrieben [115]. MMPB wurde in letzterer Arbeit neben GC-MS auch für die Analyse mittels Thermospray-LC-MS von Microcystinen benutzt.

2.2.4 Kapillarelektrophorese (CE) und Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MECC)

Die Vorteile der Kapillarelektrophorese sind die hohe Auflösung und die kurzen Analysenzeiten. Die Trennung erfolgt hier aufgrund unterschiedlicher Ionenmobilitäten der Analyten bei einer angelegten Spannung. Während mittels Kapillarzonenlektrophorese keine ausreichende Trennung einer Gruppe von Microcystinen gelang, konnten durch Zusatz von Tensiden zehn Microcystine einer Realprobe innerhalb von 17 Minuten getrennt werden [116]. Bei letzterer Methode wird die elektrophoretische Trennung von einer Trennung aufgrund unterschiedlicher Verteilung der Analyten in der mizellaren und wäßrigen Phase überlagert. Es handelt sich um die Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MECC). Nachteil beider Methoden ist die geringe Empfindlichkeit von 20 mg/L, die bei UV-Detektion erhalten wird [117]. Wie bei der HPLC-UV-Detektion wurde auch hier versucht, die

Empfindlichkeit durch Derivatisierung der Microcystine mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu verbessern [118]. Eine wesentliche Verbesserung der Empfindlichkeit konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

2.2.5 Dünnschichtchromatographie (DC)

Dünnschichtchromatographie kann vor allem wegen der einfachen Apparatur und relativ schnellen Analysenzeiten vorteilhaft für die Microcystinanalytik sein. Mehrere Proben können hier parallel bearbeitet werden und müssen nicht so sorgfältig aufbereitet werden wie bei der HPLC, da Dünnschichtplatten nur einmal verwendet werden. Die Detektion erfolgt über UV-Absorption oder Anfärbemethoden wie beispielsweise Ioddampf. Dünnschichtchromatographie von Microcystinen ist sowohl an Normalphasen als auch an Umkehrphasen beschrieben worden [119, 120]. In Kombination mit vorheriger Festphasenextraktion an C₁₈-Silicamaterial sind hier Nachweisgrenzen von 10 µg/g lyophilisierter Algen beschrieben worden, wenn die UV-Absorption detektiert wird. Mit optimierten Anfärbemethoden lassen sich Nachweisgrenzen von 10 ng absolut erreichen [121]. In Kombination mit einer Anreicherung von 50 mL Probe kann hier der WHO-Grenzwert von 1 µg/L erreicht werden.

2.3 Bioanalytische Methoden

2.3.1 Biologische Tests

Maus-Bioassay

Unter den biologischen Toxizitätstests ist der Maus-Bioassay am weitesten verbreitet. Er hat den Vorteil, daß sich die Gesamtoxizität einer Probe bestimmen läßt. Nachteile sind jedoch die geringe Empfindlichkeit und Spezifität neben der Tatsache, daß Tierversuche nur eingesetzt werden sollten, wenn es sich nicht vermeiden läßt. Gesetzliche Einschränkungen und Regelungen sind dabei zu beachten. Beim Maus-Bioassay werden der Maus 0.1-1.0 mL eines cyanobakteriellen Extraktes intraperitoneal gespritzt. Das Extrakt wird vorher durch Membran-Ultrafiltration sterilisiert. Als Lösungsmittel dient Wasser oder physiologische Salzlösung. Bei einem durchschnittlichen Gewicht einer Maus von 20 bis 25 g würde ein LD₅₀-Wert von 50 µg/kg (LD₅₀ von Microcystin-LR) einer Konzentration von 1 mg/L entsprechen, wenn der Maus 1 mL Flüssigkeit injiziert wurde. Damit gehört der Maus-Bioassay neben der NMR zu den unempfindlichsten Nachweismethoden für Microcystine. Da sowohl Neurotoxine als auch Hepatotoxine von Cyanobakterien produziert werden können, muß anhand der Symptome entschieden werden, welche Toxine in der Probe vorhanden sind. Neurotoxine wirken schneller als Hepatotoxine und der Tod tritt meist durch Atemlähmung ein. Die akute Wirkung der Hepatotoxine tritt in den ersten drei Stunden ein, wobei der Tod, wie schon beschrieben, durch Leberblutung herbeigeführt wird. Sind Neurotoxine in tödlicher

Dosis in der Probe vorhanden, so kann das Vorhandensein von Hepatotoxinen nicht mehr festgestellt werden. Eine empirische Einteilung der Toxizität eines cyanobakteriellen Extrakts besagt, daß bei einem LD_{50} kleiner 100 mg Zelltrockenmasse pro kg Körpergewicht Cyanobakterien als sehr toxisch eingestuft werden [122]. Dies würde bedeuten, daß beispielsweise Microcystin-LR einen Gewichtsanteil von größer 0.05 % an der Zelltrockenmasse hat.

Andere Toxizitätstests

Weitere biologische Toxizitätstests sind mit Salzwasser-Krabbeneiern, der Stuben- und der Fruchtfliege, Bakterien und mit Leberzellen entwickelt worden. Speziell die Toxizitätstests mit Leberzellen liefern gute Übereinstimmungen mit dem Maus-Bioassay. Da hier weniger Leberzellen als in einer Maus beobachtet werden können, können auch geringere Mengen Toxin nachgewiesen werden. Eine Übersicht der verschiedenen Toxizitätstests findet sich in [122].

2.3.2 Enzym-Inhibitionsassays

Enzym-Inhibitionsassays für die Detektion von Microcystinen und Nodularinen beruhen auf deren Bindung an Serin/Threonin-Proteinphosphatasen. Die Substratumsetzung der Enzyme wird durch diese Bindung inhibiert, was eine verminderte Signalentwicklung zur Folge hat.

Proteinphosphatasen katalysieren die Hydrolyse von Phosphorsäureestern und sind wichtig für die Regulation des Stoffwechsels. Sie sind aus mehreren Untereinheiten aufgebaut, die innerhalb der Zelle flexibel miteinander verbunden sind. Katalytische Untereinheiten binden an regulierende, wodurch die Aktivität, Substratspezifität und intrazelluläre Verteilung dieser Enzymfamilie gesteuert wird [63]. Proteinphosphatasen (PP) werden in Typ 1 (PP1) und Typ 2 (PP2A, 2B und 2C) eingeteilt, je nach zugrundeliegender Substratspezifität und Sensitivität gegenüber Inhibitoren [123]. Drei Isoformen der katalytischen Untereinheit von PP1 sind bisher identifiziert worden: PP1 α , PP1 β und PP1 γ . Die im Enzym-Inhibitionstest verwendeten Proteinphosphatasen sind aus Skelettmuskeln von Kaninchen, aus humanen roten Blutkörperchen oder rekombinant aus verschiedenen Quellen isoliert bzw. hergestellt worden.

Die Bindung der Microcystine an Serin/Threonin-Proteinphosphatasen erfolgt über einen zweistufigen Mechanismus (s. Abb. 7). Im ersten Schritt erfolgt eine kompetitive Bindung und Blockade der katalytischen Untereinheit. Aufgrund einer großen Wechselwirkungsfläche ist diese Bindung sehr stark. Innerhalb von 10 Minuten kann die Aktivität der Proteinphosphatasen von Microcystinen vollständig inhibiert werden [124]. Die Röntgenstruktur des Komplexes aus Microcystin-LR und der katalytischen Untereinheit von PP1 zeigt, daß die hydrophobe Adda-Seitenkette, die Glutamyl-Carboxylgruppe und *N*-Methyldehydroalanin in Wechselwirkung mit der Bindungstasche des Enzyms stehen [58]. In einem zweiten Schritt erfolgt die kovalente Bindung der Microcystine an die Proteinphosphatasen. Dieser Schritt ist weitaus langsamer als der erste. Innerhalb von 16 Stunden werden zwischen 55 und 65 % des Enzyms kovalent durch Microcystin modifiziert [124]. Die Untersuchung der kovalenten Bindung verschiedener Microcystine sowie die Kenntnis der Röntgenstruktur des Micro-

cystin-Enzym-Komplexes haben gezeigt, daß die kovalente Bindung zwischen *N*-Methyldehydroalanin und einem Cystein des Enzyms geknüpft wird. Dies geschieht durch nukleophile Addition des Thiols an die α,β -ungesättigte Carbonylkomponente.

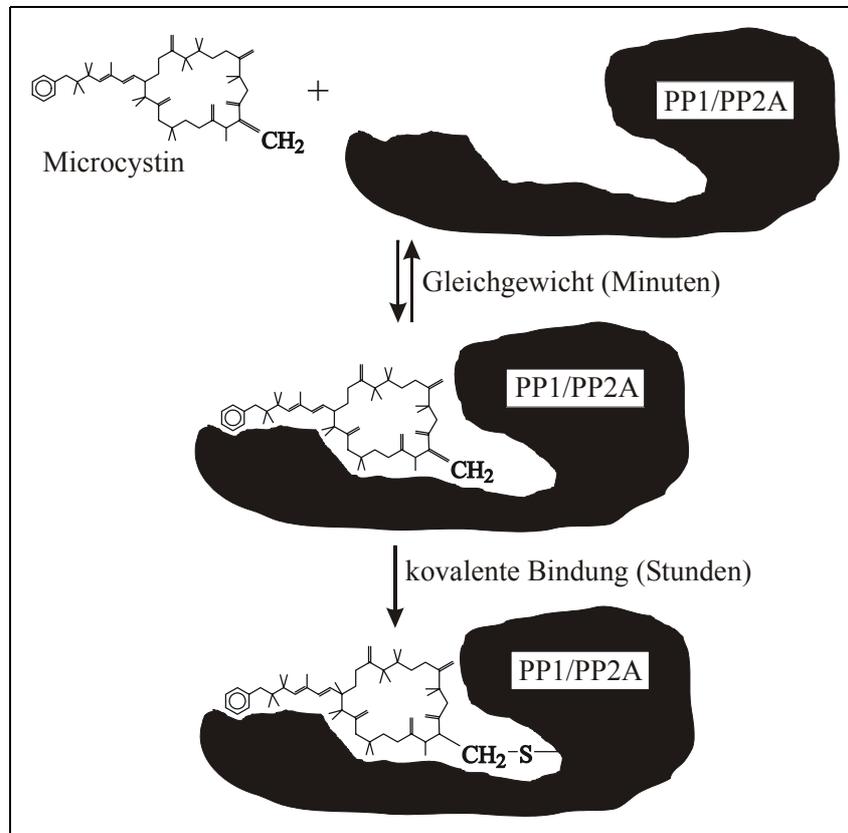


Abb. 7: Hypothetischer Bindungsmechanismus von Microcystinen an Proteinphosphatasen [124].

Nodularine können eine kovalente Bindung aus sterischen Gründen nicht eingehen. Ebenso können Strukturvarianten der Microcystine, die nur schwach gebunden werden, die kovalente Bindung nicht eingehen. Monomethyl-Microcystin-LR, dessen Glutamat verestert wurde, kann beispielsweise keine kovalente Bindung zu Proteinphosphatasen ausbilden. Bei der Planung und der Interpretation der Ergebnisse des Enzym-Inhibitionstests muß folglich der Bindungsmechanismus der Microcystine an Proteinphosphatasen berücksichtigt werden.

Das am häufigsten angewendete Testformat des Enzym-Inhibitionsassay ist das homogene Format. Alle Komponenten befinden sich hierbei in Lösung. Waschschrte sind nicht notwendig und Inkubationszeiten sind von der Geschwindigkeit des Substratumsatzes und der Empfindlichkeit der Detektion abhängig. In der Regel beträgt die Testdauer 1-3 Stunden. Zunächst wird die Probe mit dem Enzym 10-20 Minuten vorinkubiert, dann wird das Substrat zugegeben und so lange inkubiert, bis eine deutliche Signalentwicklung der Negativkontrolle stattgefunden hat. Je stärker die Signalinhibition ist, desto höher ist die Microcystin- oder Nodularinkonzentration.

Je nach Art der Detektion sind verschiedene Substrate eingesetzt worden. *p*-Nitrophenylphosphat (*p*NPP) hat sich als Substrat für die Absorptionsdetektion durchgesetzt. Es wird

enzymatisch zu *p*-Nitrophenolat hydrolysiert, welches bei 405 nm absorbiert. Diese Testvariante hat den Vorteil, daß in Mikrotiterplatten gearbeitet werden kann. Eine Vielzahl von Proben kann auf diese Weise parallel analysiert werden. Da die katalytische Spaltung durch Proteinphosphatasen relativ langsam ist, wurden Versuche unternommen, durch Kopplung zweier enzymkatalysierter Reaktionen höhere Empfindlichkeiten zu erreichen. Hier diente beispielsweise Luciferinphosphat als Substrat. Das hydrolysierte Luciferin führt, katalysiert durch Luciferase, zu dem biolumineszierenden Oxyluciferin. Da es sich bei diesem Mechanismus jedoch nicht um eine cyclische Kaskade handelt, ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt nach wie vor die Hydrolyse. Es konnte keine Signalverstärkung und damit keine höhere Empfindlichkeit erreicht werden. Eine Übersicht über die verschiedenen Testvarianten des homogenen Enzym-Inhibitionsassays ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Überblick über Proteinphosphatase-Inhibitionstests.

Enzym	IC ₅₀ [µg/L] MC-LR	Substrat	Detektion	Literatur
PP1 (rekomb.)	0.3	<i>p</i> NPP	Absorption	[125]
PP1 (rekomb.)	38	<i>p</i> NPP	Absorption	[126]
PP2A ²	0.22	<i>p</i> NPP	Absorption	[127]
PP1α ¹	1	<i>p</i> NPP	Absorption	[31]
PP2A ¹	0.5	<i>p</i> NPP	Absorption	[128]
PP1α ¹	0.7	Phosvitin	Malachitgrün / Absorption	[129]
PP2A ²	0.15 (0.08 ³)	DiFMUP	Fluoreszenz	[130]
PP1 ¹	0.15 (0.01 ³)			
PP1/PP2A aus Mausleber	1.6	³² P-Phosphohiston	Szintillationszähler	[131]
PP1 ¹	1.7	³² P-Phosphohiston / ³² P-Phos- phorylase a	Szintillationszähler	[132]
PP2A ¹	0.04			
PP1 ⁴	6	³² P-Myosin leichte Kette	Szintillationszähler	[133]
PP2A ⁵	3			
PP1α ¹	3	³² P-Phosphorylase a	Szintillationszähler	[134]
PP1α ¹	0.4	³² P-Phosphorylase a	Szintillationszähler	[135]
PP2A ¹	0.4			
PP1γ (rekomb., human)	44	Luciferinphosphat	Biolumineszenz	[136]
PP1 (rekomb., human)	0.19 (K _i für Nodularin)	¹⁴ C-Phosphopeptid	Szintillationzähler	[137]

¹ isoliert aus Skelettmuskel von Kaninchen

² isoliert aus humanen roten Blutzellen

³ Der Wert wurde von den Autoren angegeben, ist jedoch nicht vereinbar mit den dargestellten Ergebnissen.

Abkürzungen:

MC Microcystin; pNPP *p*-Nitrophenylphosphat; DiFMUP 6,8-Difluoro-4-methylumbelliferylphosphat.

⁴ isoliert aus Hühnerkaumagen.

⁵ isoliert aus Rinderherzmuskel.

Beide Proteinphosphatasen (PP1 und PP2A) liefern ähnliche Testmittelpunkte (IC_{50}) von 0.15-1 $\mu\text{g/L}$ für Microcystin-LR. Der Enzym-Inhibitionstest ist damit eine der empfindlichsten und am einfachsten durchzuführenden Analysenmethoden für Microcystine. Zu beachten sind allerdings Fehlinterpretationen, die auftreten können, wenn Wasserproben Phosphatasen enthalten. Durch Kontrollmessungen muß sichergestellt werden, daß durch unspezifische Signalentwicklung, hervorgerufen beispielsweise durch Alkalische Phosphatase, keine falsch negative Probenzuordnung möglich ist. Ebenfalls auszuschließen ist das Vorhandensein anderer Inhibitoren. Cyanobakterielle Proben enthalten z. B. das Enzym Phosphorylase, welches die Aktivität der Phosphatasen reguliert und deshalb auch inhibierend wirken kann.

Da die toxische Wirkung der Microcystine auf der Inhibition der Proteinphosphatasen beruht, wird der Enzym-Inhibitionsassay häufig als Test angesehen, der die Toxizität einer Probe wiedergibt. Dies wird beispielsweise als Vorteil gegenüber den Immunoassays angeführt. Tabelle 4 zeigt eine Übersicht der veröffentlichten Kreuzreaktionen der Enzyme und deren relativen Toxizitäten.

Tabelle 4: Massenbezogene Kreuzreaktionen der Proteinphosphatasen PP1 [125, 129, 133, 138] und PP2A [127, 128, 133] verglichen mit relativen Toxizitäten (i. p.).

Toxin	Kreuzreaktion (rel. Toxizität) <i>PP1</i>	Toxin	Kreuzreaktion (rel. Toxizität) <i>PP2A</i>
Microcystin-LR	100 (100)	Microcystin-LR	100 (100)
Microcystin-RR	89; 200 (8)	Microcystin-LA	182 (100)
Microcystin-YR	42 (71)	Microcystin-RR	71; 88; 200 (8)
[DMAdda ⁵]Microcystin-LR	20 (55)	Microcystin-YR	50; 81 (71)
[L,D-MeAla-CysGly ⁷]Microcystin-LR	16 (-)	Nodularin	50; 200 (100)
[L,D-MeAla-GSH ⁷]Microcystin-LR	13 (8)		
[L,D-MeAla-Cys ⁷]Microcystin-LR	11 (19)		
[DMAdda ³]Nodularin	7 (33)		
[Dha ⁷]Microcystin-LR	6 (20)		
[6Z-Adda ⁵]Microcystin-LR	< 0.03 (< 4)		
[D-Glu-OCH ₃ ⁶]Microcystin-LR	< 0.03 (< 4)		
Nodularin	114; 200 (100)		
[6Z-Adda ³]Nodularin	< 0.03 (< 4)		

Kreuzreaktion: $(IC_{50MC-LR}/IC_{50MC-XY}) \cdot 100$; Relative Toxizität: $(LD_{50MC-LR}/LD_{50MC-XY}) \cdot 100$

LD₅₀-Werte aus Tabelle 1; MC: Microcystin; IC₅₀ 50 % inhibition (Testmittelpunkt).

Während die Affinitäten der verschiedenen Toxine zu PP1 und deren Toxizitäten mit Ausnahme von Microcystin-RR einen ähnlichen Trend aufweisen, wird dies für das Enzym PP2A nicht gefunden. Besonders auffällig ist bei letzterem der Unterschied der Kreuzreaktion und der relativen Toxizität von Microcystin-RR. Während Microcystin-RR relativ wenig

toxisch ist, ist es ein relativ starker Inhibitor der PP2A und PP1. Der umgekehrte Fall gilt für Nodularin und PP2A. Aus den bisher vorliegenden Daten kann folglich nur bedingt von einer Bestimmung der Toxizität mittels Proteinphosphatase-Inhibitionstest ausgegangen werden. Abweichungen können dadurch erklärt werden, daß Microcystine zunächst durch einen carriervermittelten Membrantransport in die Zellen gelangen, bevor sie ihre toxische Wirkung entfalten. Möglicherweise werden hydrophile Microcystine wie Microcystin-RR in diesem Schritt diskriminiert. Zu einem ähnlichen Schluß gelangten auch SWOBODA et al. [139], die für Microcystin-LR und -RR ebenfalls ähnliche Testmittelpunkte fanden [140].

Eine kompetitive Variante des Enzym-Inhibitionsassay wurde von SERRES et al. vorgestellt [141]. Ein Microcystin, das Tyrosin (Y) enthielt, wurde mit radioaktivem Iod markiert und als Kompetitor verwendet. Die Trennung von gebundenem und freiem Marker wurde mit Größenausschlußchromatographie durchgeführt. Der Testmittelpunkt (IC_{50}) für PP2A und Microcystin-LR lag bei 0.017 $\mu\text{g/L}$.

Eine Biosensorvariante des Tests basierend auf Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (SPR) wurde von YANG et al. durchgeführt [142]. PP2A wurde hier kovalent auf der Sensoroberfläche immobilisiert und die Inhibition der Phosphorylase-PP2A-Bindung durch Microcystine studiert. Testmittelpunkte sind hier nicht angegeben.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß der Proteinphosphatase-Inhibitionstest ein großes analytisches Potential besitzt, da er schnell und empfindlich ist. Limitierend für den Test ist bisher die Verfügbarkeit der Enzyme. Da Proteinphosphatasen keine hohen Umsatzgeschwindigkeiten der bisher verwendeten Substrate zeigen, könnte eine Optimierung der Detektion den Test weiter verbessern. Dies könnte z. B. durch Einführung von signalverstärkenden, cyclischen Enzymkaskaden geschehen. Weiterhin ist der Zusammenhang zwischen den Querempfindlichkeiten der Enzyme und den Toxizitäten noch nicht systematisch untersucht worden.

2.3.3 Immunoassays

Das Prinzip des Immunoassays beruht auf der selektiven Wechselwirkung zwischen dem Analyten und einem Antikörper. Die einzelnen Komponenten und die Theorie der Immunoassays werden in Kapitel 3 genauer beschrieben. Limitierend für die Durchführung von Immunoassays sind die Antikörper. Ihre Herstellung ist langwierig und im Falle von polyklonalen Seren auf die Lebenszeit der immunisierten Tiere beschränkt. In der Literatur werden mehr als ein Dutzend anti-Microcystin-Antikörper vorgestellt. Tabelle 5 zeigt eine Zusammenfassung der veröffentlichten Antikörper, der immunisierten Strukturen und der Testmittelpunkte (IC_{50}) für Microcystin-LR.

Tabelle 5: Zusammenfassung bisher veröffentlichter anti-Microcystin-Antikörper.

Antikörper	Spezies	Immunogen	IC ₅₀ [µg/L] MC-LR	Erscheinungsjahr, Publikationen
Klon 2B2 (IgM) Klon 2B5 (IgM)	Maus	Microcystin-LA- Muramyldipeptid-PLL ²	unbekannt	1985; 1986 [143, 144]
Serum	Kaninchen	Microcystin-LR-cBSA ²	2.2	1989; 1990; 1994; 1996 [125, 145-147]
Eidotter (IgY)	Huhn	Microcystin-LR-cBSA ²	0.78*	1995 [148]
Klon M8H5 (IgG ₁)	Maus	Microcystin-LR-BSA ²	0.12	1995; 1997 [149-151]
Serum	unbekannt	unbekannt	0.31	1997; 1999 [152-154]
Serum 824	Schaf	unbekannt	1.5* ¹	1999 [155]
Serum 825	Schaf	unbekannt	10* ¹	1999 [155]
unbekannt	unbekannt	unbekannt	0.88	1999 [154, 156]
Serum	Maus	Microcystin-LR-PLL ²	50	2000 [157]
Serum	Kaninchen	Microcystin-LR-KLH ³	2.5	2000 [158]
einkettiger Antikörper	human (HPDL)	Screening nach Micro- cystin-LR-Selektivität	4000	2000 [159]
Klon M1E (IgG ₁ κ)	Maus	Microcystin-LR-SBTI ³	5	2001 [160, 161]
Klon MC10E7 (IgG ₁ κ)	Maus	Microcystin-LR-cOVA ³	0.04	diese Arbeit
Klon AD4G2 (IgG ₁ κ)	Maus	<i>N</i> -Acetyl-Adda-BSA	0.33	diese Arbeit

* abgeschätzt aus publizierten Daten

¹ Testmittelpunkt für Microcystin-YR

² Das Immunkonjugat wurde durch Kopplung des Haptens über eine der beiden Carboxylgruppen (*D*-erythro-β-methylisoAsp³ oder *D*-Glu⁶) an das Trägerprotein hergestellt.

³ Das Immunkonjugat wurde durch Kopplung des Haptens über die vinyloge Carbonylgruppe des *N*-Methyldehydroalanins⁷ hergestellt.

Abkürzungen: cBSA bzw. cOVA: mit Ethylendiamin kationisiertes Rinderserumalbumin bzw. Ovalbumin; EDC: 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid; HPDL: human phage display library; IC₅₀ 50 % Inhibition, Testmittelpunkt; KLH: Keyhole Limpet Hemocyanin; MC: Microcystin; PLL: Poly-L-Lysin.

Zwei Koppungsstellen an Microcystinen wurden zur Synthese der Immunogene ausgewählt. Zum einen die Kopplung über eine der beiden Carboxylgruppen (*D*-erythro-β-methylisoAsp³ oder *D*-Glu⁶) durch Knüpfung einer Amidbindung zu dem Trägerprotein und zum anderen die Kopplung über die vinyloge Carbonylgruppe des *N*-Methyldehydroalanins⁷. Im ersten Fall ist die Koppungsstelle nicht eindeutig. Die tatsächlich immunisierte Struktur läßt sich erst durch Untersuchung der Querempfindlichkeiten des Antikörpers aufklären.

Der erste Versuch, Microcystin-Konjugate zu immunisieren, wurde 1985 von KFIR et al. durchgeführt [143]. Nach Immunisierung eines Microcystin-LA-Konjugats wurden jedoch nur

IgM-Antikörper erhalten, die eine zu geringe Affinität aufwiesen, um analytisch verwendet zu werden. Ein recht empfindlicher anti-Microcystin-LR-Antikörper wurde 1995 von MCDERMOTT durch Immunisierung eines Huhns hergestellt. Hühnerantikörper werden aus Eidotter isoliert und haben den Vorteil, daß sie in größeren Mengen verfügbar sind, ohne die Tiere durch regelmäßige Blutabnahmen zu schwächen [148]. Eine andere, moderne Technik, Antikörper zu gewinnen, besteht in dem Screening von Antikörperbibliotheken, die durch Mutationen einzelner Aminosäuren erhalten werden. MCELHINEY et al. untersuchten eine Bibliothek humaner Antikörper auf das Vorhandensein von anti-Microcystin-Antikörpern [159]. Da diese Antikörper keiner Affinitätsreifung unterliegen, wie das bei Immunisierungen der Fall ist, werden hier in der Regel sehr unempfindliche Antikörper erhalten. Der Testmittelpunkt von Microcystin-LR betrug in diesem Fall 4 mg/L.

Zu den wichtigsten Kritikpunkten an den Immunoassays gehören die Querempfindlichkeiten (Kreuzreaktionen) der Antikörper. Im Falle der Microcystinanalytik besteht die Sorge, daß Antikörper einige Microcystine diskriminieren könnten und deshalb Proben als falsch negativ identifiziert werden. Es wird also eine zu hohe Selektivität befürchtet. Immunoassays gehören nicht zu den Trennmethode und geben deshalb einen Summenwert an, in dem die Konzentrationen aller Microcystine, gewichtet mit den entsprechenden Querempfindlichkeiten enthalten sind. Nur wenn alle Microcystine gleich gut erkannt werden, wird ein echter Summenwert aller in der Probe vorhandenen Microcystine erhalten. Im Falle der anti-Microcystin-Antikörper besitzt einer der veröffentlichten Antikörper die geforderte Breite, wie in dieser Arbeit gezeigt wird. Ein Entwicklung und Charakterisierung eines weiteren Breitbandantikörpers wird in dieser Arbeit beschrieben.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Microcystin-Immunoassays ähnliche Empfindlichkeiten aufweisen wie die Proteinphosphatase-Inhibitionstests. Die Durchführung von Immunoassays ist in der Regel komplizierter. Vorteil der Immunoassays ist die bessere Verfügbarkeit der monoklonalen Antikörper, weshalb Analysen über lange Zeit unverändert in einem Labor durchgeführt werden können. Durch Verwendung von Antikörpern mit unterschiedlichen Querempfindlichkeiten kann außerdem eine schnelle und empfindliche, partielle Strukturaufklärung der Microcystine erfolgen.

2.4 Massenspektrometrische Methoden

Die Massenspektrometrie hat einen erheblichen Beitrag zu der Strukturaufklärung von Microcystinen und Nodularinen geleistet. Dies wurde durch Entwicklungen in der Massenspektrometrie möglich, die es erlaubten, nichtflüchtige, ionische Verbindungen in die Gasphase zu überführen. Heutzutage wird die Massenspektrometrie der Microcystine meist als Referenzmethode zur Bestätigung und Identifizierung positiver Proben eingesetzt. Einige quantitative Nachweismethoden wurden ebenfalls in der Literatur vorgestellt.

Das Prinzip der Massenspektrometrie von Peptiden und Proteinen wird in Kapitel 4 beschrieben. Dieser Abschnitt faßt die in der Literatur beschriebenen Methoden zusammen, die zum massenspektrometrischen Nachweis von Microcystinen dienen.

Fast-Atom-Bombardment-(FAB)-Massenspektrometrie gehört zu den ersten Methoden, die zur Strukturaufklärung der Microcystine herangezogen wurden. Bei dieser Ionisierungstechnik wird die flüssige Probe mit Teilchen hoher kinetischer Energie beschossen. Der Primärteilchenstrahl besteht aus Cäsiumionen, Argon oder Xenon der Energie 5-15 keV. Die Energie wird durch eine Matrixsubstanz auf die Analytmoleküle übertragen. Als flüssige Matrix dient beispielsweise Glycerin. Die Ionisierung ist sehr schonend und es werden in der Regel einfach geladene Molekülonen als Massenpeaks erhalten. RINEHART et al. haben bei der Strukturaufklärung von 30 Microcystinen die FAB-Massenspektrometrie benutzt [64]. Sie waren unter den ersten, die feststellten, daß Microcystine als cyclische Peptide schwer fragmentierbar sind und die Vielzahl der möglichen Spaltprodukte eine Strukturaufklärung erschweren. In dieser und in einer Folgearbeit [162] wurden deshalb die Microcystine und Nodularine zunächst chemisch an einer definierten Stelle gespalten. Die linearisierten Peptide fragmentierten leichter und ihre Fragmente waren einfacher zu interpretieren. Die chemische Spaltung des Peptidrings ist in Abb. 8 dargestellt.

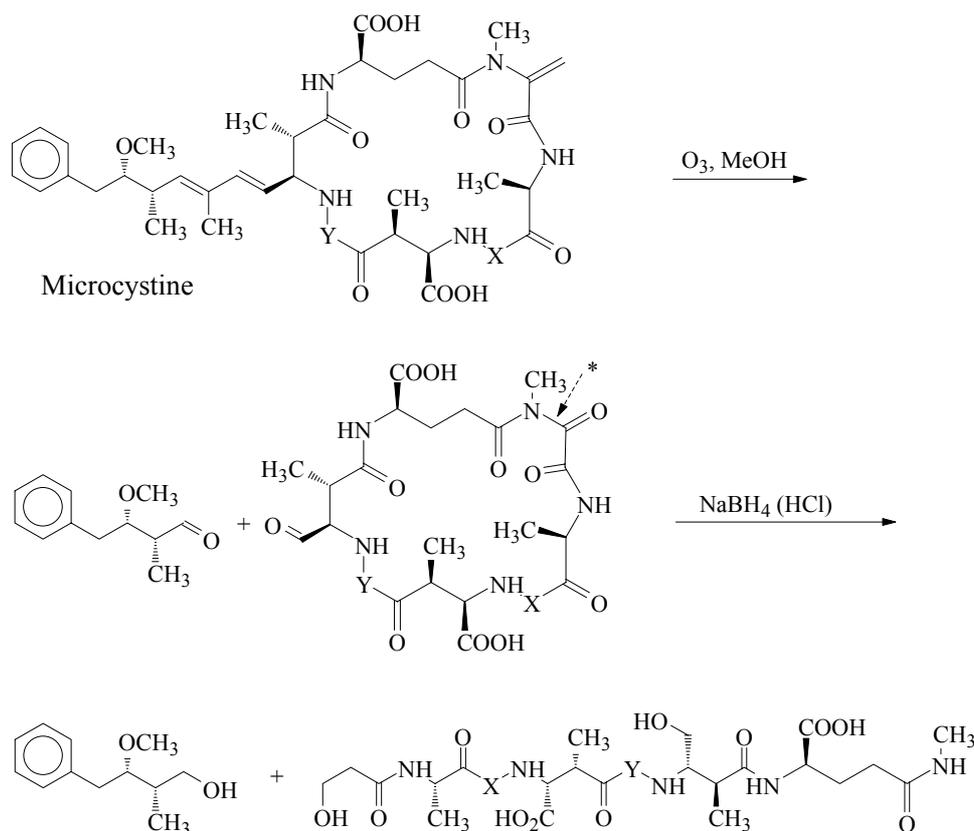


Abb. 8: Chemische Linearisierung der Cyclopeptide (Microcystine und Nodularine) nach RINEHART et al. [64] in einer Eintopfreaktion. Zunächst werden die Doppelbindungen oxidativ durch Ozonolyse gespalten. Dann erfolgt die Reduktion zum Alkohol mit $NaBH_4$ und die Spaltung des Rings durch anschließende saure Aufarbeitung. Die Spaltstelle ist mit * markiert.

Der Ring wird an *N*-Methyldehydroalanin gespalten. Gleichzeitig wird auch die Adda-Seitenkette fragmentiert, so daß ein für diese Toxine charakteristisches Fragment entsteht.

KONDO et al. [163] benutzen die FAB-Massenspektrometrie zum Nachweis bereits bekannter Microcystine. Sie stützten sich dabei einerseits auf den Molpeak und andererseits auf das charakteristische Fragment m/z 135 der Adda-Seitenkette. Dieses Fragment entsteht durch α -Spaltung am Sauerstoff der Adda-Seitenkette (vgl. Abb. 9)

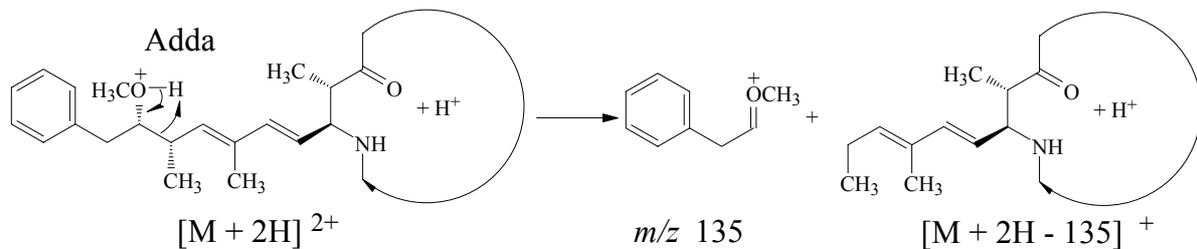


Abb. 9: Fragmentierung der Adda-Seitenkette durch α -Spaltung am Sauerstoff. Bei dieser Spaltung behalten beide Fragmente ihre Ladung und sind im Massenspektrometer nachweisbar.

Diese Fragmentierung ist auch bei sehr schonenden Ionisierungsbedingungen zu beobachten und wird oft als Indiz für das Vorhandensein eines Microcystins gewertet. Wird mit Massenspektrometern gearbeitet, die die höchste Empfindlichkeit im SIM (selected ion monitoring) erreichen, so kann dieses Ion bei HPLC-MS-Kopplungen zur Microcystin-Detektion herangezogen werden.

In einer weiterführenden Arbeit verwendete diese Gruppe die LC-MS-Kopplung, um Microcystine quantitativ zu analysieren. Wurde das Ion der Masse 135 detektiert, so wurden Nachweisgrenzen von 2 ng absolut erhalten (entsprechend 40 $\mu\text{g/L}$ bei 50 μL Injektionsvolumen). Die Molmassen $[M+H]^+$ der einzelnen Microcystine ließen sich empfindlicher nachweisen. Für Microcystin-LR, -RR und -YR lagen die Nachweisgrenzen zwischen 300 und 400 pg [164].

Durch weitere Entwicklungen in der Massenspektrometrie wurden Ionisierungsverfahren möglich, die keine Matrix benötigen. Durch MS-MS-Kopplung ist es außerdem möglich, einzelne Ionen zu fragmentieren und deren Fragmente nachzuweisen. Dieser Vorgang wird durch stoßinduzierte Dissoziation (engl. collision induced dissociation, CID) erreicht und wird oft mit Argon als Stoßgas durchgeführt. Mit Hilfe dieser Technik ist das Fragmentierungsverhalten von Microcystinen eingehend untersucht worden [116, 165-170]. Generell wurde festgestellt, daß sich doppelt geladene Microcystine leichter fragmentieren lassen als einfach geladene und daß dabei die Intensität der Fragmentationen höher ist. Deshalb wurde als Ausgangsion der Stoßexperimente meist das doppelt geladene Molekülion herangezogen. Microcystin-RR, das zwei basische Arginine besitzt, tritt bei Massenspektrometrie im positiven Ionenmodus meist als doppelt geladenes Ion auf. Bei den anderen Microcystinen ist die Intensität des doppelt geladenen Peaks recht gering. Aus diesem Grund wurden Bedingungen gesucht, die das Verhältnis von doppelt geladenen zu einfach geladenen Molekülionen vergrößern sollten. Ammoniumacetat oder Lewis-Säuren wurden zu diesem Zweck dem Laufmittel zugegeben.

Weiterhin wurde festgestellt, daß Microcystine, die kein Arginin enthalten, oft als Salzaddukte ($[M+Na]^+$) auftreten. Zu diesen Microcystinen gehören alle hydrophoben Microcystine wie Microcystin-LA, -LF, -LW. Salzaddukte sind schwer zu fragmentieren, weshalb durch Zusatz von Komplexbildnern (z. B. Oxalsäure) versucht wurde, diese Ionen zu unterdrücken und die protonierten Spezies zu erhalten. Protonierte Microcystine ohne Arginin fragmentieren hingegen vergleichsweise leicht unter CID-Bedingungen.

Das Fragmentierungsmuster ist nicht für alle Microcystine identisch. Microcystine können nach dem Fragmentierungsmuster eingeteilt werden in solche mit zwei Argininen, solche mit einem Arginin und solche ohne Arginin. Allen ist gemeinsam, daß zunächst die Adda-Seitenkette fragmentiert wird, wie in Abb. 9 dargestellt. Argininhaltige Microcystine zeigen außerdem einen Verlust von Ammoniak bzw. Guanidin. Einen weiteren Sonderfall stellen Microcystine mit derivatisierter Adda-Seitenkette dar. O-Acetyl-desmethyl-Adda zeigt ein anderes Fragmentierungsschema als Adda, da das Produkt der α -Spaltung weniger stabil ist [168].

Die Öffnung des Peptidrings kann, wie bei allen cyclischen Peptiden, grundsätzlich an jeder Amidbindung geschehen. Zu beobachten sind dann eine Reihe von Ionenserien, die sich nach der Ringöffnung durch sequentielle Abspaltung der Aminosäuren ergeben. Erfolgt die Ringöffnung statistisch, so verteilt sich die Intensität der Fragmentationen auf alle Ionenserien und wird deshalb für einzelne Ionen geringer. Die Vielzahl der möglichen Fragmente und deren geringe Intensität stellen eine Herausforderung für die massenspektrometrische Strukturaufklärung dar.

Unter nicht-fragmentierenden Bedingungen werden folgende Ionen im Massenspektrum beobachtet $[M+Na]^+$, $[M+H]^+$; $[M+2H-135]^+$; $[M+2H]^{2+}$; $[M+2H-MeOH]^{2+}$; $[135]^+$ [169]. Den Mechanismus der Methanolabspaltung zeigt Abb. 10.

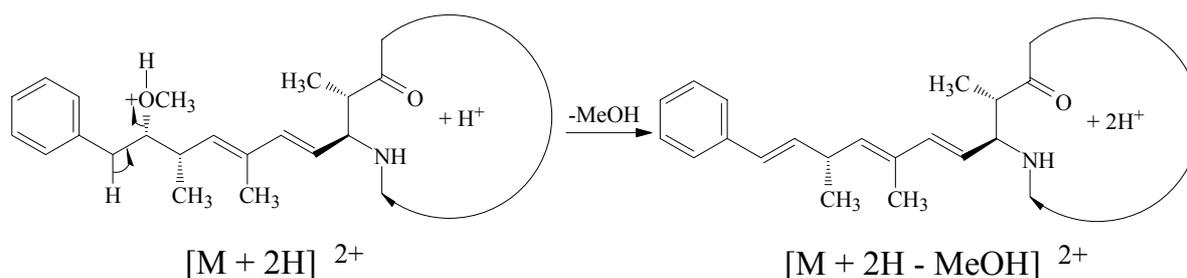


Abb. 10: Methanolabspaltung der Adda-Seitenkette nach YUAN et al. [169].

Ein weiterer Ansatz, Microcystine im Massenspektrum zu identifizieren, wurde von SHERLOCK et al. verfolgt [171]. Zunächst wurde die Probe underivatisiert vermessen. Anschließend erfolgte die Derivatisierung mit 2-Aminoethanthiol (vgl. Abb. 11). Da diese Derivate eine weitere basische Aminogruppe besitzen, erscheinen die Molekülonen doppelt geladen bei dem halben m/z -Wert. In der Chromatographie erscheinen die Peaks der derivatisierten Microcystine aufgrund der Hydrophilie der Aminogruppe früher. Wurden sowohl die Molmassen der underivatisierten Microcystine ($[M+H]^+$) als auch die der derivatisierten Microcystine ($[M+2H+77]^{2+}$) gefunden, so war sichergestellt, daß es sich bei dem Massenpeak um

ein Microcystin handelte. Dieses Verfahren könnte auch bei Fragmentierungsexperimenten zur reproduzierbaren Herstellung doppelt geladener Molekülonen dienen.

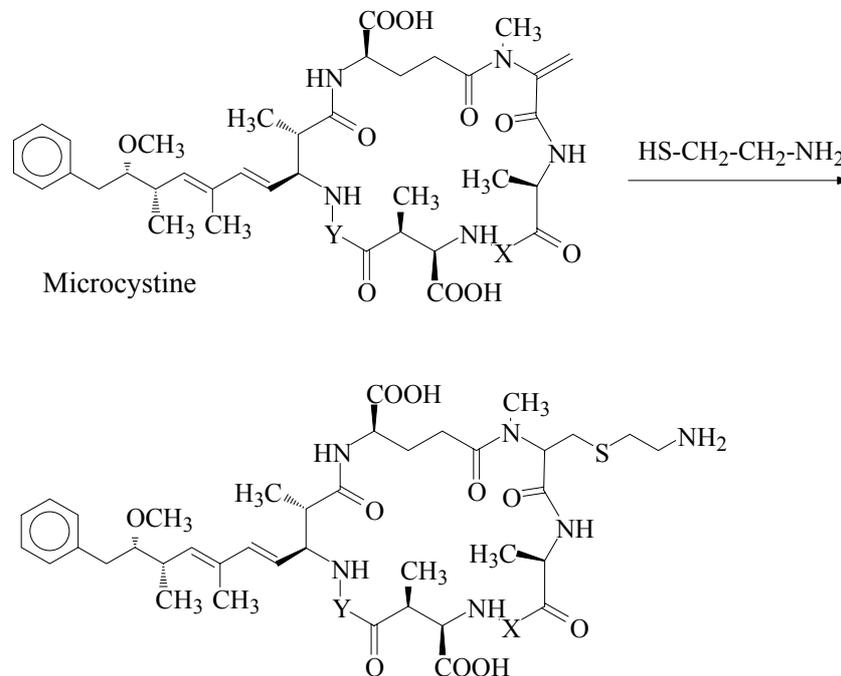


Abb. 11: Derivatisierung zum Nachweis von Microcystinen nach SHERLOCK et al. [171].

Interne Standards sind in der Massenspektrometrie besonders bei quantitativen Messungen sehr wichtig. Sie sollten den Analyten möglichst ähnlich sein, um ähnliches Ionisierungsverhalten und ähnliches Verhalten bei Matrixsuppression zu zeigen. Am besten sind hierfür isotope markierte Analytmoleküle geeignet. Diese können auch bei Fragmentierungsexperimenten die Strukturaufklärung erleichtern. BATEMAN et al. benutzen zu diesem Zweck ^{15}N -markiertes Microcystin-LR, das sie durch Fütterung eines Cyanobakterienstammes mit ^{15}N -angereichertem Natriumnitrat erhalten hatten [167]. Andere Möglichkeiten bestehen in dem Protonenaustausch der Carbonsäuren gegen Deuterium oder der Hydrierung der Doppelbindung des *N*-Methyldehydroalanins. Tritiummarkiertes [^3H]Dihydromicrocystin-LR ist kommerziell erhältlich.

Quantitative Arbeiten wurden von KONDO, EDWARDS, HORMAZABAL et al. und der Firma FINNIGAN veröffentlicht [164, 165, 172, 173]. Wird eine vorausgehende Festphasenanreicherung nicht berücksichtigt, so werden mittels LC-MS-Kopplung mit verschiedenen Geräten Nachweisgrenzen zwischen 40 und 200 $\mu\text{g/L}$ pro Microcystin erhalten. Durch Festphasenanreicherung erniedrigt sich die Nachweisgrenze je nach Anreicherungs- und Elutionsvolumen. In keiner dieser Arbeiten werden Matrixsuppressionseffekte berücksichtigt. Es wird ohne internen Standard gearbeitet und im SIM detektiert. Unbekannte Microcystine müssen allerdings zunächst im Scanmodus detektiert werden, dessen Nachweisgrenze höher liegt.

Ein massenspektrometrisches Verfahren, das sich zum Screening cyanobakterieller Proben und weniger zur quantitativen Analyse eignet, ist die MALDI-Massenspektrometrie (matrix-

assisted laser desorption mass spectrometry). Bei diesem Verfahren wird die Probe in einer Matrixlösung gelöst und auf einen Probenträger aufgebracht. Das Lösungsmittel verdunstet und die Probe bildet einen Kokristall mit der Matrix. Durch einen Laserstrahl erfolgt dann die Energieübertragung auf die Matrix und dann auf die Probe. Diese wird dadurch ionisiert und in einem Massenanalysator nachgewiesen. Wie bei FAB-MS handelt es sich hierbei um ein sehr schonendes Ionisierungsverfahren. Die Molekülonen sind meist einfach geladen. Diese Methode eignet sich besonders zum Screening vieler Proben, da auf einem Probenträger viele Proben aufgebracht werden können. Aufwendige Probenvorbereitung ist hier nicht notwendig, wodurch Diskriminierung von Substanzen reduziert werden kann. Mit Hilfe eines Flugzeit-Massenanalysators (engl. time-of-flight mass spectrometer, TOF-MS), der in Abschnitt 4.3 genauer erklärt wird, kann hier ein großer Massenbereich ohne Empfindlichkeitsverlust detektiert werden. Dadurch können auch unbekannte Substanzen detektiert werden. ERHARD und Mitarbeiter untersuchten mit dieser Methode cyanobakterielle Proben, die neben Microcystinen weitere biologisch aktive Peptide enthielten [174]. ROBILLOT et al. untersuchten die Fragmentierungsmuster mit MALDI-Massenspektrometrie und identifizierten so Microcystine einer Probe [175].

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß sich die Massenspektrometrie gut zur Bestätigung positiver Microcystinproben eignet. Strukturell bereits bekannte Microcystine lassen sich anhand des Molekularpeaks und von charakteristischen Fragmenten nachweisen. Auch bei der Strukturaufklärung neuer Substanzen ist die Massenspektrometrie hilfreich, jedoch nicht ausreichend. Beispielsweise ist eine Aufklärung der Stereochemie oder der Konformation von Doppelbindungen mit Hilfe der Massenspektrometrie nicht möglich. Diese Tatsache muß auch bei der toxikologischen Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden, da veränderte Stereochemie die biologische Aktivität ebenfalls verändert.

3 Immunologische Methoden

3.1 Antikörper

Antikörper stellen das Rückgrat aller immunologischen Bestimmungsverfahren dar. Auf ihrer Fähigkeit, fremde Moleküle selektiv zu binden, beruht das Prinzip der Immunoassays. Bis heute können Antikörper nicht synthetisch hergestellt werden. Ihr Aufbau aus über tausend einzelnen Aminosäuren und ihre komplizierte dreidimensionale Struktur kann optimal nur durch Wirbeltierzellen erfolgen. Antikörper und Antikörperfragmente können neuerdings auch rekombinant in Bakterien, Insektenzellen und sogar Pflanzen hergestellt werden. Als Vorlage dient hierbei der antikörpercodierende Teil des Erbmaterials von Immunzellen. Die Struktur der Antikörper und ihre Bindungseigenschaften sind bedingt von ihrer Funktion innerhalb des Immunsystems. Da Struktur und Bindung auch für immunoanalytische Verfahren entscheidend sind, sollen sie im folgenden erläutert werden.

3.1.1 Struktur von Antikörpern

Antikörper sind Glykoproteine, die zu der Klasse der Immunglobuline gehören und im Serum sowie den Körperflüssigkeiten von Wirbeltieren vorkommen. Sie dienen als Fänger und Marker körperfremder Organismen (Bakterien, Viren, Parasiten). Markierte Fremdkörper werden anschließend von anderen Teilen des Immunsystems eliminiert. Antikörper werden nach Struktur und Funktion in fünf verschiedene Klassen eingeteilt, nämlich IgG, IgA, IgM, IgD und IgE. Obwohl die einzelnen Antikörperklassen unterschiedliche physiologische Funktionen innerhalb des Immunsystems erfüllen, ist ihre Grundstruktur sehr ähnlich. Das Grundgerüst besteht aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Polypeptidketten. Jeweils eine lange Kette ist über Disulfidbindungen mit einer kurzen Kette verbunden, während zwischen den beiden langen Ketten weitere Disulfidbindungen die beiden Untereinheiten verbrücken. Dabei entsteht die Y-förmige Struktur der Antikörper. Vorkommen und Anteil der einzelnen Immunglobulinklassen am gesamten Immunglobulin-Pool unterscheiden sich deutlich. Im Serum kommen hauptsächlich Immunglobuline der Klasse G (IgG) vor, die auch den Hauptanteil des gesamten Antikörpervorrats stellen. Immunologische Testverfahren verwenden fast ausschließlich IgG-Antikörper, da diese aus dem Serum leicht zu gewinnen sind und meist eine Affinitätsreifung durchlaufen haben.

Die Erkennung und Bindung eines Fremdstoffes erfolgt durch die sogenannten variablen Regionen (F_v) der Antikörper. Diese werden aus jeweils einem Teil einer schweren und einer leichten Kette gemeinsam gebildet. Jeder IgG-Antikörper hat deshalb zwei identische Bindungsstellen. Der Begriff "variabel" bezieht sich auf die Aminosäurezusammensetzung und die Länge einzelner Regionen. Die eigentliche Bindungsstelle des Antikörpers wird aus 3 hypervariablen Schleifen der leichten Kette und 3-4 hypervariablen Schleifen der schweren Kette gebildet. Die Variabilität dieser Regionen wird durch somatische Rekombination relativ

weniger Genabschnitte sowie durch erhöhte somatische Mutationsrate dieser Abschnitte erreicht. Die Gesamtzahl verschiedener Antikörper, die ein Mensch produzieren kann, wird auf 10^{12} - 10^{14} geschätzt [1, S. 1110-1135]. Nur ein Bruchteil dieser Antikörper wird während der Lebenszeit tatsächlich synthetisiert. Die Vielfalt der synthetisierten Antikörper ist jedoch ausreichend, um jeden, auch völlig neuartigen Fremdstoff zu erkennen und zu binden. Fremdstoffe, die von Antikörpern selektiv erkannt werden, nennt man Antigene [176, S. 67-86]. Kleine Teilstrukturen von Antigenen, die von Antikörpern erkannt werden können, jedoch selber nicht immunogen sind, werden Haptene genannt.

Während die variablen Regionen zur Antigenbindung dienen, tritt der konstante Teil (F_c) eines Antikörpers, gebildet aus den beiden schweren Ketten, mit anderen Teilen des Immunsystems in Wechselwirkung. Der konstante Teil variiert innerhalb von Arten nicht, ist jedoch von Art zu Art verschieden. Dies ist der Grund dafür, daß Antikörper einer Tierart für andere Tierarten Antigene darstellen und daß es möglich ist, Antikörper gegen Antikörper herzustellen. In Immunoassays wird diese Eigenschaft genutzt, um Antikörper auf Oberflächen zu immobilisieren oder mit markierten Antikörpern sichtbar zu machen.

3.1.2 Antigen-Antikörper-Wechselwirkung

Grundlage von Immunoassays ist die spezifische Erkennung des Antigens durch den Antikörper. Das physikalisch-chemische Verständnis der Wechselwirkung hat deshalb einen entscheidendem Einfluß für die optimale Entwicklung und Qualität eines Assays. Mit Zunahme des Wissens über die treibenden Kräfte bei Antigen-Antikörper-Reaktionen und über den Vorgang der Affinitätsreifung von Antikörpern wächst die Möglichkeit, gezielt hochaffine und hochselektive Antikörper herzustellen.

Die Antigenbindungsstelle ist im Falle von Protein-Antigenen eine eher oberflächenorientierte Stelle am Antikörper, die möglichst komplementär zur Struktur des Antigens ist. Die Stabilisierung der Wechselwirkung wird durch Ausbildung von VAN-DER-WAALS- und Wasserstoffbrücken-Bindungen, sowie durch hohe Packungsdichten erreicht [177]. Dagegen stellen Hapten-Bindungsstellen eher Taschen oder Spalten dar, die das Hapten aufnehmen können. Aus thermodynamischer Sicht ist bei Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen zwischen enthalpie- und entropiegetriebenen Bindungen zu unterscheiden. In beiden Fällen handelt es sich um nichtkovalente Wechselwirkungen. Zu den Entropie-Effekten werden hydrophobe Wechselwirkungen gezählt, von denen angenommen wird, daß sie einen entscheidenden Anteil am Zustandekommen der Antikörper-Antigen-Bindung haben [178]. Auch enthalpiegetriebene, nichtkovalente Bindungen, wie z. B. Wasserstoffbrücken, VAN-DER-WAALS- und ionische Wechselwirkungen, können zu der Ausbildung der Antikörper-Antigen-Bindung beitragen [179]. Die Selektivität der Bindung nimmt mit der Anzahl gebildeten Wasserstoffbrücken zu, da deren Energiebeitrag von der gegenseitigen Orientierung der beiden Bindungspartner abhängt. Dieser Zusammenhang konnte in einer vergleichenden Studie über Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen aufgezeigt werden [180]. Die Entwicklung von hoch-

affinen und hochselektiven Antikörpern ist folglich von der Anzahl und Art der funktionellen Gruppen des Analytmoleküls abhängig.

Außer den direkten Wechselwirkungen zwischen Antigen und Antikörper sind auch indirekte Energiebeiträge zu berücksichtigen. Ist eine Umorientierung des Antikörpers notwendig, um das Antigen zu binden, so ist dies meist mit einem Energieaufwand verbunden. Während der Affinitätsreifung eines Antikörpers kann durch Mutationen diejenige Konformation des Antikörpers stabilisiert werden, die das Antigen ohne Umorientierung binden kann [181, 182]. Mutationen, die zu einer Stabilisierung der "richtigen" Konformation führen, müssen nicht notwendigerweise die antigenbindenden Regionen des Antikörpers betreffen. Diese Erkenntnis zeigt, daß der Austausch von Aminosäuren mittels gentechnologischer Verfahren auch in Regionen, die nicht in direktem Kontakt zum Hapten stehen, zu einer Steigerung der Affinität und der Selektivität führen kann.

Die Stärke der Antikörper-Antigen-Wechselwirkung kann durch die Bindungsenergie bzw. die Affinitätskonstante beschrieben werden. Wie bei jeder reversiblen Reaktion, kann auch für die Bildung des Antikörper-Antigen-Komplexes das Massenwirkungsgesetz aufgestellt werden:



$$K = \frac{[\text{AkAg}]}{[\text{Ak}] \cdot [\text{Ag}]} \quad \text{Gleichung 1}$$

mit	K	Affinitätskonstante des Antikörpers zu dem Antigen
	[Ak]	Konzentration des ungebundenen Antikörpers
	[Ag]	Konzentration des freien Antigens
	[AkAg]	Konzentration des Antikörper-Antigen-Komplexes.

Der Zusammenhang zwischen der Affinitätskonstante (Gleichgewichtskonstante) K und der freien Bindungsenergie ΔG ergibt sich durch die Gleichung 2, wobei R die allgemeine Gaskonstante ist.

$$\Delta G = RT \ln K \quad \text{Gleichung 2}$$

Die Affinitätskonstanten der Antikörper zu Antigenen liegen meist im Bereich von 10^4 - 10^{10} M^{-1} , was Bindungsenergien von 25 bis 65 kJ/mol entspricht [1, S. 1110-1135]. Der Kehrwert der Affinitätskonstanten wird oft auch als "Dissoziationskonstante" bezeichnet. Dieser Begriff ist jedoch mißverständlich, da er auch als Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation des Antigen-Antikörper-Komplexes verstanden werden kann.

Die Aufstellung des Massenwirkungsgesetzes (Gleichung 1) erfolgte unter der Annahme, daß ein monovalentes Antigen und eine Antikörperbindungsstelle wechselwirken. Dies ist der Fall, wenn kleine Analytmoleküle mit monoklonalen Antikörpern reagieren und beschreibt

daher die Thermodynamik vieler Immunoassays. Betrachtet man jedoch ein multivalentes Antigen, das groß genug ist, um von mehreren Antikörpern gebunden zu werden, und ein polyklonales Serum mit verschiedenen Antikörpern, so können sich einzelne Bindungseffekte überlagern. Werden beispielsweise zwei multivalente Antigene von zwei Antikörpern verbrückt, so gehen die Einzelaffinitäten ungefähr multiplikativ in die neue Affinitätskonstante ein. Dieses Zusammenwirken von Affinitäten einzelner Bindungsstellen wird funktionale Affinität oder Avidität genannt. Bei der Entwicklung immunologischer Meßtechniken muß die mögliche Multivalenz von verwendeten Assaykomponenten berücksichtigt werden.

3.1.3 Bildung von Antikörpern

Antikörper der Klasse IgG werden von B-Lymphozyten hergestellt und zunächst membranständig auf der Zelloberfläche präsentiert. Jeder Lymphozyt kann nur eine Art Antikörper herstellen. Alle Nachkommen einer Zelle erben diese Fähigkeit und stellen Antikörper derselben Selektivität her. Man spricht daher von einem Zellklon. Kommt nun ein Lymphozyt mit einem Fremdmolekül in Kontakt und wird dieses von den membranständigen Antikörpern erkannt, so wird die Zelle durch eine komplizierte immunologische Reaktion zur Vermehrung und Differenzierung angeregt. Die meisten Nachkommen sind Plasmazellen, die die Fähigkeit besitzen, große Mengen von Antikörpern in das Serum freizusetzen. Plasmazellen sind kurzlebig und dienen zur raschen Bekämpfung von Infektionen. Einige der B-Lymphozyten werden zu langlebigen Gedächtniszellen und schützen den Körper jahrelang vor erneuten Infektionen.

Bei der Immunantwort von Wirbeltieren können mehrere Phasen beobachtet werden. Die erste Reaktion auf den Kontakt mit einem Antigen ist die Bildung und Freisetzung von IgM-Antikörpern. Dies sind Pentamere der Y-förmigen Grundstruktur von Antikörpern. Sie können mangelnde Affinität durch die hohe Zahl von 10 Bindungsstellen ausgleichen. Ihre Produktion beginnt zwei bis drei Tage nach dem ersten Antigenkontakt, erreicht nach 8-10 Tagen das Maximum und fällt innerhalb von 14 Tagen wieder auf den Ursprungswert. Bei einem erneuten Antigenkontakt ist die IgM-Antwort ähnlich. Die Konzentration der IgM-Antikörper steigt nicht höher als beim ersten Mal. IgG-Antikörper verhalten sich hingegen anders. Ihre Produktion nach dem ersten Antigenkontakt beginnt 2-3 Tage nach dem ersten Auftreten von IgM-Antikörpern, erreicht nach ungefähr 2-3 Wochen das Maximum und fällt dann sehr langsam wieder ab. Beim zweiten Antigenkontakt steigt die Konzentration der IgG-Antikörper jedoch viel schneller und viel höher an. Im Maximum der Immunantwort kann die IgG-Konzentration 1000mal höher sein als bei der primären Immunantwort [1, S. 1110-1135]. Durch mehrmaligen Kontakt mit dem gleichen Antigen kann die Menge der selektiven Antikörper auf bis zu 1 g/L im Serum ansteigen [183].

Der mehrmalige Kontakt mit dem Antigen steigert nicht nur die Konzentration der selektiven Antikörper, sondern auch deren Affinität und Selektivität. Der Zusammenhang zwischen sprunghaftem Anstieg der Antikörperkonzentration und Affinitätsreifung läßt sich dadurch erklären, daß die Geschwindigkeit, mit der B-Gedächtniszellen zur Vermehrung angeregt werden, mit der Affinität der membranständigen Antikörper zu dem Antigen zunimmt. Die

Affinitätsreifung selber wird durch somatische Hypermutation erreicht. Diejenigen Gene, die für die variablen Regionen der leichten und schweren Kette codieren, besitzen eine spontane Mutationshäufigkeit, die einmillionmal höher ist als diejenige normaler Gene. Da Zellen, die Antikörpermutanten mit einer höheren Affinität zum Antigen tragen, stärker zur Vermehrung angeregt werden, setzen sie sich gegenüber den ursprünglichen Zellen durch. Auf diese Weise kann das Immunsystem einerseits pathogene Mikroorganismen mit hohen Mutationsgeschwindigkeiten bekämpfen und andererseits erneutem Antigenkontakt wirkungsvoller entgegenreten.

3.1.4 Gewinnung von polyklonalen Antikörpern

Die Gewinnung polyklonaler Antikörper aus dem Serum immunisierter Wirbeltiere (meist Kaninchen, Schafe, Ziegen, Mäuse) ist der einfachste und schnellste Weg, Antikörper hoher Affinität und Selektivität zu erhalten. Gleichzeitig kann dies eine Vorstufe zur Gewinnung monoklonaler Antikörper oder rekombinanter Antikörperfragmente sein.

Immunogen sind alle körperfremden Moleküle, die eine Molmasse größer 5 000 Da haben [184, S. 42-46]. Da umweltanalytisch relevante Substanzen meistens kleiner als 5 000 Da sind, müssen sie vor der Immunisierung an ein größeres Molekül gekoppelt werden. Als Trägermoleküle werden Proteine eingesetzt, die den immunisierten Tieren artfremd sind. Albumine aus Rinderserum oder Hühnereiern, Hämocyanine aus Schnecken oder Thyroglobulin aus Schweinen sind häufig verwendete Trägerproteine [185]. Vor allem Hämocyanin aus *Megathura crenulata* (Keyhole Limpet Hämocyanin, KLH) kommt sehr häufig zum Einsatz, da es Wirbeltieren artfremd ist und daher eine starke Immunantwort auslöst [186]. Auch mit Konjugaten aus Diphtherie- [187], Tetanus- [188] oder Cholera-Toxinen [189, 190] konnten gute Immunisierungsergebnisse erzielt werden. Synthetische Polymere haben sich als Trägermoleküle weniger gut bewährt. Dies kann daran liegen, daß ihre Primärstruktur eine geringere Vielfalt aufweist als diejenige natürlicher Proteine. Werden Tiere beispielsweise mit Polylysin immunisiert, so entwickeln einige der Tiere eine heftige Immunantwort, während andere keine Reaktion zeigen. Letztere haben nicht die Fähigkeit, den Zellen des Immunsystems Polylysinfragmente zu präsentieren, weshalb die Immunantwort ausbleibt [1, S. 1110-1135].

3.1.5 Synthese von Immunkonjugates

Antikörper erkennen und binden in den allermeisten Fällen diejenige Struktur am besten, die ihnen während der Immunisierung präsentiert worden ist. Da für Immunisierungen von kleinen Molekülen Kopplungen an Trägermoleküle notwendig sind, kann das Analytmolekül nicht unverändert immunisiert werden. Trotzdem muß versucht werden, die Ladungsverteilung und räumliche Anordnung des Analytmoleküls im Immunkonjugat zu wahren. Antikörper reagieren sehr sensibel auf geringste Strukturänderungen. Sogar Enantiomere können unterschieden werden, wie LANDSTEINER schon 1928 zeigen konnte [191].

Die Kopplungsstelle zwischen Hapten und Trägermolekül sollte idealerweise so gewählt werden, daß sie entgegengesetzt zu funktionellen Gruppen des Haptens liegt. Oft werden zwischen Hapten und Trägermolekül Abstandhalter (Spacer) eingeführt, die dafür sorgen sollen, daß das gesamte Hapten der Bindung durch den Antikörper zugänglich ist. Dies führt zu maximaler Selektivität des Antikörpers gegenüber dem Hapten. Ausführliche Beschreibungen der Faktoren, die bei der Synthese eines Immunkonjugates berücksichtigt werden sollten, sind in Übersichtsartikeln zusammengefaßt [192, 193]. Die Autoren empfehlen den Ersatz einer aliphatischen C-H-Bindung im Hapten durch einen aliphatischen Spacer mittlerer Kettenlänge (C₄-C₆). Dieses Prinzip wurde auch von WELLER [194] getestet und empfohlen. Es gewährleistet, daß funktionelle Gruppen unverändert bleiben und daß das gesamte Hapten erkannt werden kann. Allerdings ist die Durchführung einer solchen Synthese oft schwierig, da die Möglichkeiten einer C-C-Knüpfung recht eingeschränkt sind.

Während obige Kriterien für die Auswahl des Haptens zur Generierung hochselektiver Antikörper gelten, sind für die Generierung von Breitbandantikörpern andere Faktoren wichtig. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden soll, ist es beispielsweise nicht sinnvoll, Spacer in das Immunogen einzuführen, wenn eine Teilstruktur des Analytmoleküls immunisiert wird und anschließend das gesamte Analytmolekül erkannt werden soll.

3.1.6 Immunisierungsprotokoll

Das Immunisierungsprotokoll beschreibt die Art und das Alter der immunisierten Tiere, die Menge und Beschaffenheit des applizierten Immunogens, die Art der Applikation, das verwendete Adjuvans (Hilfsstoff), den Abstand zwischen den Immunisierungen und den Abstand zwischen Immunisierung und Blutabnahme. All diese Faktoren sind entscheidend für die Menge und Affinität des sezernierten Antikörpers.

Adjuvantien werden dem Immunogen zur Verstärkung der Immunantwort zugesetzt. Sie regen das Immunsystem unspezifisch an und ermöglichen eine Reduzierung der notwendigen Antigenosis und der Anzahl von Injektionen aufgrund des längeren Verbleibens am Injektionsort (Depoteffekt) [195]. Das bekannteste und am häufigsten verwendete Adjuvans ist eine Emulsion von Mineralöl, abgetöteten Bakterien (*Mycobacterium tuberculosis*) und Tensiden. Dieses sog. komplette FREUNDSche Adjuvans stimuliert sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunantwort. Das komplette FREUNDSche Adjuvans wird meist nur bei Erstimmunisierungen angewendet. Nachfolgende Immunisierungen werden mit inkompletten FREUNDSchen Adjuvans durchgeführt, welches keine abgetöteten Bakterien enthält. Da das Mineralöl örtliche Entzündungen, Fieber und in manchen Mausstämmen sogar multiple Myelome induziert [184, S. 58-70], wird aus Gründen des Tierschutzes schon seit längerem der Einsatz von Adjuvantien mit geringeren Nebenwirkungen gefordert. Mittlerweile existieren eine Reihe von Adjuvantien, die bei gleicher Wirksamkeit weniger Nebenwirkungen zeigen [196-198].

Der Applikationsweg ist abhängig von der immunisierten Tierart und von dem Ziel polyklonale oder monoklonale Antikörper herzustellen. Im Falle der Generierung von monoklonalen Antikörpern ist es vorteilhaft, eher die Lymphknoten nahe der Milz als die peri-

pheren Lymphknoten zu stimulieren. Hier wird meist in die Bauchhöhle (intraperitoneal) injiziert. Kurz vor der Fusion kann auch intravenös injiziert werden, wenn diese Technik beherrscht wird. Dies birgt jedoch die Gefahr eines anaphylaktischen Schocks.

Ebenfalls entscheidend für den Immunisierungserfolg ist die Antigendosis und die Antigenbeschaffenheit. Um hochaffine Antikörper zu erhalten, dürfen nur sehr geringe Immunogendosen injiziert werden [199]. Der Abstand zwischen den Immunisierungen soll so gewählt werden, daß der Antikörpertiter der vorherigen Immunisierung im Serum wieder abgefallen ist. Meist wird zwei bis fünf Wochen zwischen den Immunisierungen gewartet. Geringe Immunogendosen können durch geringe absolute Mengen, geringe Hapten-Kopplungsdichten am Trägerprotein oder durch geringe Verfügbarkeit (unlösliche Antigene) erreicht werden. WITTMANN und HOCK gelang unter Berücksichtigung dieser Bedingungen die Generierung eines polyklonalen Antikörperserums mit einer außerordentlich hohen Affinität zu einem Pestizid (s-Triazin) [200]. Sie benutzten zunächst ein Immunkonjugat mit einer sehr geringen Kopplungsdichte von nur vier Haptenen pro Trägerprotein. Nach fünf Monaten injizierten sie ein Immunkonjugat mit einer nahezu zehnfach höheren Kopplungsdichte und erhielten einen starken Anstieg des Antikörpertiters und hochaffine Antikörper. Auch PFORTNER erhielt mit einem analogen Immunisierungsschema ein hochaffines Antiserum gegen 4-Amino-2,6-dinitrotoluol [201]. Die Nachweisgrenze dieses Immunoassays lag bei 9 ng/L. Wird zunächst mit einem unlöslichen und anschließend mit einem löslichen Immunkonjugat immunisiert, so lassen sich ähnliche Effekte wie bei der Änderung der Kopplungsdichte beobachten, wie in dieser Arbeit gezeigt wird.

Bei Immunisierungen ist ein regelmäßiger Abstand zwischen Nachimmunisierungen (Boosts) und Blutabnahme zur Kontrolle der Immunantwort zu beachten. Wird der zeitliche Abstand nicht konstant gehalten, so können die Seren der verschiedenen Immunisierungen nur schlecht miteinander verglichen werden. Verwendet man polyklonale Antikörper für immunologische Testverfahren, so können in jedem Fall die Ergebnisse nur verglichen werden, wenn Antikörper derselben Blutung eingesetzt werden.

3.1.7 Monoklonale Antikörper

Antikörper, die gegen ein einziges *Epitop* (antigene Teilstruktur) einer immunogenen Substanz gerichtet sind, also von einem einzigen B-Lymphozyten abstammen, werden *monoklonal* genannt. Der Vorteil der Verwendung von monoklonalen Antikörpern liegt in der unbegrenzten Verfügbarkeit dieser Antikörper und in der Tatsache, daß es sich um Reinstoffen im chemischen Sinne handelt. Bei polyklonalen Antikörpern muß die Wechselwirkung mehrerer Antikörper zu dem Analyten berücksichtigt werden.

Fusion

Da Lymphozyten nicht unbegrenzt in Gewebekultur wachsen können, müssen sie mit Myelomzellen fusioniert werden. Diese Methode, die 1975 von KÖHLER und MILSTEIN vorgestellt wurde [202], ermöglicht die Herstellung von *Hybridomen* (Hybrid-Myelomzellen),

die sowohl die Fähigkeit zur Antikörpersynthese als auch die unbegrenzte Teilungsfähigkeit der Myelomzellen besitzen. Voraussetzung für die Gewinnung monoklonaler Antikörper bestimmter Selektivität ist das Vorhandensein der entsprechenden Lymphozyten im Organismus. Deshalb wird zur Gewinnung monoklonaler Antikörper zunächst das gleiche Immunisierungsprotokoll verwendet, wie für die Gewinnung polyklonaler Antikörper. Für die erfolgreiche Fusion ist es entscheidend, die Lymphozyten in einem definierten Differenzierungsstadium zu isolieren. B-Lymphozyten und Gedächtnis-B-Zellen sezernieren keine Antikörper, sondern tragen sie als Rezeptoren auf der Zellwand. Plasmazellen, die während einer Immunantwort aus B-Lymphozyten gebildet werden und Antikörper an das Medium abgeben können, sind sehr kurzlebig und vermehren sich nicht mehr. Beide Zellstadien sind für eine Fusion nicht geeignet. Hierfür werden stimulierte B-Lymphozyten (*B-Lymphoblasten*) benötigt, die sich in der Proliferationsphase zu Plasmazellen befinden. Um dieses Zellstadium zu erreichen, wird den Tieren an ein bis drei aufeinanderfolgenden Tagen Immunkonjugat ohne Adjuvans injiziert und ein bis zwei Tage später fusioniert. Immunisierungen ohne Adjuvans rufen eine schwächere, allerdings selektivere Immunantwort hervor.

Die Fusion von Lymphozyten mit Myelomzellen ist meist nur erfolgreich, wenn beide Zelltypen aus der gleichen Tierart stammen. Da die bisher existierenden Myelomzell-Linien fast ausschließlich aus der Maus stammen, beschränkt sich die Gewinnung der monoklonalen Antikörper bisher auf Mäuse als Lymphozyten-Spender. Dies ist insofern ein Nachteil, als im Falle einer erfolglosen Fusion weder monoklonale Antikörper noch ein polyklonales Serum erhalten werden können, da Mäuse nur geringe Mengen Serum liefern.

Für die Fusion werden mutierte Maus-Myelomzellen verwendet, die in HAT-Zellmedium (HAT, Hypoxanthin, Aminopterin und Thymin) nicht wachsen können. Die Fähigkeit zu wachsen erlangen sie erst, wenn sie mit Lymphozyten fusionieren, die ein bestimmtes Enzym produzieren. Auf diese Weise kann zwischen fusionierten und ursprünglichen Myelomzellen unterschieden werden. Nach der Fusion werden die Hybridomzellen meist durch Verdünnung (Limiting Dilution [184, S. 203-211]) vereinzelt. Dabei muß ein Kompromiß geschlossen werden zwischen niedriger und hoher Zellzahl pro Kavität. Einzelzellaussaat hat zur Folge, daß die Zellen häufig Wachstum und die Proliferation einstellen [203]. Sie gewährleistet hingegen mit großer Wahrscheinlichkeit Monoklonalität der Hybridome. Das Umgekehrte ist der Fall für niedrigere Zellverdünnungen.

Screening

Nach dem Aussäen und Wachsen der Klone werden die Zellüberstände auf die Produktion von anti-Hapten-Antikörpern durchmustert (gescreent). Positive Zellhaufen müssen so lange weiter verdünnt und gescreent werden, bis sich der Klon stabilisiert hat. Dadurch wird einerseits sichergestellt, daß es sich um eine einzige Zell-Linie handelt und andererseits, daß die Hybridomzelle genetisch stabil ist. Durch die Fusion erhalten die Hybridomzellen die doppelte Menge an genetischem Material. Während der Zellteilung eliminieren sie so lange Teile des Erbmaterials, bis die Zellen stabil sind. Bei der Eliminierung von Erbmaterial kann es vorkommen, daß die Hybridomzellen die Fähigkeit verlieren, Antikörper zu produzieren. Diese Zellen und ihre Nachkommen müssen entfernt werden, da sie aufgrund fehlender

Antikörperproduktion schneller wachsen können und die Gefahr besteht, daß sie die antikörperproduzierenden Zellen überwachsen.

Die Affinität, die mit monoklonalen Antikörpern erreicht werden kann, unterscheidet sich nicht von derjenigen, die von polyklonalen Seren erreicht wird [204]. Beispielsweise konnten WINKLMAIR et al. [205] mit monoklonalen Antikörpern einen Immunoassay etablieren, dessen Sensitivität mit dem Immunoassay mit polyklonalen Antikörpern von WITTMANN und HOCK [200] vergleichbar ist. Meist läßt sich sogar die zu erwartende Affinität des besten monoklonalen Antikörpers anhand der Affinität des Mäuseserums vor der Fusion abschätzen.

Konzentrierung und Reinigung

Die Konzentrierung und Reinigung monoklonaler Antikörper verbessert deren Langzeitstabilität und ist für manche Anwendungen (z. B. Immunaффinitätschromatographie) unumgänglich. Antikörper werden bei dieser Prozedur von Bestandteilen des Zellkulturmediums befreit. Wird fötales Rinderserum als Wachstumsmedium verwendet, so befinden sich auch Rinder-IgGs im Zellkulturüberstand, die eventuell die Aufreinigung erschweren. Zu den am häufigsten eingesetzten Reinigungsmethoden gehört die Protein-A- bzw. Protein-G-Säulen-Chromatographie, die Aufreinigung mittels thiophiler Adsorption und die Anionenaustausch-Chromatographie. Oft wird vor den chromatographischen Methoden eine Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt [206].

Protein-A- und Protein-G-Chromatographie beruhen auf der starken Bindung zwischen dem bakteriellen Protein A bzw. G und dem F_c-Teil der Immunglobulin-Moleküle. Die Bindung und Elution ist pH-abhängig und unterschiedlich je nach IgG-Subklasse. Da die Elution mitunter bei relativ sauren Bedingungen erfolgt, muß hier in Vorversuchen getestet werden, ob die Antikörper denaturieren. Die thiophile Adsorption beruht auf einer Art hydrophoben Wechselwirkung zwischen schwefelhaltigen Liganden der Festphase und Antikörpern. Der genaue Bindungsmechanismus ist bisher noch nicht geklärt. Der Vorteil von thiophiler Adsorption gegenüber Protein-A-Gelen ist die Tatsache, daß Antikörper aller Klassen und Subklassen gleich gut binden und die Elutionsbedingungen wesentlich milder sind, als bei Protein-A-Chromatographie. Die Konzentrierung und Reinigung von monoklonalen Antikörpern ist in mehreren Übersichtsarbeiten beschrieben worden [207-209]. Die Auswahl der geeigneten Methode ist von der Antikörper-Klasse und -Subklasse, der Antikörperstabilität und von der geforderten Reinheit abhängig.

3.1.8 Andere Antikörperquellen und künstliche Antikörper

Während die Produktion monoklonaler Antikörper schon zu den klassischen Verfahren zählt, stehen heute immer häufiger gentechnische Herstellungsverfahren im Vordergrund. Rekombinante Antikörper werden durch Übertragung der für den Antikörper codierenden Gene in einen Mikroorganismus oder eine Säugetierzelle erhalten [210, 211]. Hier kann der Antikörper auf einfache Weise in großen Mengen exprimiert werden. Obzwar bei diesem Verfahren die Immunisierung eines Tieres weiterhin notwendig ist, besteht ein Vorteil darin, daß

rekombinante Antikörper im Gegensatz zu monoklonalen aus allen Tierarten durch Isolierung von selektiven Lymphozyten erhalten werden können. Folglich kann zunächst die Produktion polyklonaler Antiseren in einem größeren Tier (Kaninchen, Schaf, Ziege) angestrebt werden und bei positiver Immunantwort die Produktion rekombinanter Antikörper erfolgen. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß verschiedene Teile geklonter Immunglobulin-Gene isoliert werden können und mit Stücken anderer Immunglobuline, auch von anderen Spezies, verknüpft und exprimiert werden können. Diese Anwendung ist insbesondere in der Medizin wichtig, wo quasi-menschliche Antikörper aus variablen Regionen der Maus und konstanten Regionen des Menschen hergestellt werden (humanisierte Antikörper). Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit der Variation der Antikörperselektivität durch Mutationen einzelner Aminosäuren.

Bei einem anderen Ansatz wird möglichst die gesamte Antikörpervielfalt eines Tieres in Genbibliotheken übertragen. Diese Bibliotheken haben lange Bestand und können immer wieder zum Screening Antigen-spezifischer Antikörper verwendet werden [212-214]. Das Screening läuft meist automatisiert ab, benötigt jedoch ein Hapten-Proteinkonjugat, auf dessen Synthese nicht verzichtet werden kann. Nachteil dieser sogenannten Phage-Display-Methode ist die Tatsache, daß die Antikörper keiner Affinitätsreifung unterliegen und somit meist eine geringere Affinität aufweisen als Antikörper, die durch Immunisierung entstanden sind. Außerdem setzt die Anwendung dieser Methode umfangreiches molekularbiologisches Wissen voraus [215].

Molekular geprägte Adsorbentien (Molecular Imprinted Polymers, MIPs) stellen einen weiteren universalen Ansatz dar, durch selektive Wechselwirkung einzelne Analyten zu erkennen und anzureichern. Ihre Herstellung erfolgt durch Polymerisation der Trägersubstanz in Gegenwart des Analyten. Nach dem Aushärten des Polymers wird dieser extrahiert und hinterläßt Abdrücke im Polymer. Durch geschickte Wahl des Polymers kann eine reversible Bindung des Analyten nicht nur durch die geometrische Form des Abdrucks erfolgen, sondern auch durch nichtkovalente Wechselwirkungen. Die Affinität des Abdruckes zu dem Analyten reicht in einigen Fällen aus, um einen kompetitiven Immunoassay durchzuführen [216, 217], ist aber meist wesentlich niedriger als diejenige von Antikörpern. Zur Anreicherung oder als chirale stationäre Phasen sind diese Abdrücke jedoch durchaus geeignet [218-221]. Einen Nachteil stellen die großen Mengen Analyt dar, die zur Herstellung des Polymers benötigt werden. Oft stellt auch die Alterung des Polymers und das Ausbluten von Analyt, der zur Herstellung verwendet wurde, ein Problem dar.

Ein relativ neuer Ansatz der selektiven molekularen Erkennung ist das gezielte Design von Bindungsproteinen für einzelne Analyten. Die Klasse der Lipocaline scheint als Bindungsproteine besonders geeignet zu sein. Die Funktion der Lipocaline im Körper ist der Transport von meist hydrophoben oder chemisch empfindlichen Verbindungen. Lipocaline besitzen ein starres β -Faltblattgrundgerüst und einige variable Schleifen, die zur Bindung des Liganden dienen. Diese ähneln im Aufbau den variablen Domänen von Antikörpern. Künstliche Lipocalinvarianten werden in Analogie zu Antikörpern Anticaline genannt. Als Liganden wurden u. a. Fluorescein, Rhodamin, Biliverdin und Digoxigenin untersucht [222, 223]. Die Affinitäten der Anticalin-Ligand-Bindungen sind mittelmäßig ($K_D = 35$ nM entsprechend einer Affinität von $2.8 \cdot 10^7$ M⁻¹ für Fluorescein) bis hoch ($K_D = 2$ nM entsprechend einer

Affinität von $5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ für Digoxigenin). Die Herstellung erfolgt durch Screening einer Phagen-Bibliothek von Anticalinvarianten. Anschließend kann eine künstliche "Affinitätsreifung" durch gezielte Mutagenese von Bereichen, die für die Bindung noch nicht optimal sind, durchgeführt werden. Anticaline sind prinzipiell für alle Anwendungen geeignet, die bisher Antikörpern vorbehalten waren. Zusätzlich sind sie von medizinischem Interesse, da menschliche Anticalinvarianten immunverträglich sind. Sie könnten beispielsweise als Cholesterinfänger dienen.

3.2 Immunoassays

3.2.1 Historische Entwicklung und Anwendungsgebiete

LANDSTEINER wies in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts als einer der ersten darauf hin, daß Immunsereen zum empfindlichen Nachweis von Proteinen eingesetzt werden können [224]. Die ersten immunanalytischen Nachweismethoden erfolgten durch Immunpräzipitation und waren qualitativer Natur. Der eigentliche Durchbruch gelang erst dreißig Jahre später, als radioaktive Markierungsmöglichkeiten eine empfindliche Detektion erlaubten. BERSON und YALOW war es gelungen, durch radioaktiv markiertes Schweineinsulin das Vorhandensein von insulinbindenden Antikörpern im Blut von zuckerkranken Patienten nachzuweisen. Den Patienten war Schweineinsulin zu therapeutischen Zwecken injiziert worden [225]. Die Autoren konnten damit einen Test zur Quantifizierung von Insulin entwickeln. YALOW erhielt für diese bahnbrechenden Arbeiten auf dem Gebiet der serologischen Nachweisverfahren 1977 den Nobelpreis für Medizin. Zeitgleich und unabhängig von BERSON und YALOW entwickelte EKINS einen serologischen Test zur Messung des Schilddrüsenhormons Thyroxin, wobei er radioaktiv markiertes Thyroxin zur Quantifizierung benutzte [226]. In den darauffolgenden Jahren erlebten die immunologischen Nachweisverfahren einen großen Aufschwung und gehören heute im medizinischen Bereich zum analytischen Standardrepertoire.

Der Umgang mit radioaktivem Material bei der Testdurchführung erfordert jedoch erhöhte Sicherheitsmaßnahmen und die Abfallbeseitigung ist ebenfalls problematisch. Auch sind Substanzen, die mit kurzlebigen Radioisotopen markiert sind, nicht über längere Zeiträume haltbar. Aus diesem Grund wurden schon bald Alternativen zur radioaktiven Markierung gesucht. Die Übertragung einer Technik aus der Histochemie, bei der Moleküle auf der Oberfläche von Gewebeschnitten mit Hilfe von enzymmarkierten Antikörpern nachgewiesen werden, in den Bereich der löslichen Analyten (ENGVALL und PERLMANN [227, 228], VAN WEEMEN und SCHUURS [229, 230]) ermöglichte eine elegante Lösung des Problems. Der Einführung der Enzymmarkierung für die Detektion und die Möglichkeit der Immobilisierung von Antikörpern auf festen Oberflächen, führte schließlich zur Etablierung des ELISAs (enzyme-linked immunosorbent assay).

Zunächst lagen die Einsatzgebiete der Immunoassays überwiegend im Bereich der medizinischen Diagnostik. Hormone, Antikörper und andere biologisch aktive Proteine, aber auch Oberflächenstrukturen von Viren und Bakterien werden von Antikörpern erkannt und können mit Immunoassays nachgewiesen werden, was klassischen analytischen Verfahren nur schwer oder gar nicht möglich ist. Nachdem sich Antikörper im analytischen Bereich schon lange bewährt haben, gehen neuere Bestrebungen dahin, sie nicht nur zu diagnostischen, sondern auch zu therapeutischen Zwecken einzusetzen. Insbesondere in der Krebsforschung werden große Hoffnungen auf Antikörper gesetzt.

In andere Bereiche der Analytik fanden die immunologischen Nachweisverfahren erst später Eingang. Inzwischen gibt es jedoch eine Reihe von gut entwickelten Tests, vor allem auf dem Gebiet der Umwelt- und Lebensmittel-Analytik. Die Notwendigkeit der Festsetzung von niedrigen Grenzwerten für Umweltschadstoffe in Wasser, Boden, Luft oder Lebensmitteln hat die Entwicklung dieser nachweisstarken Methode wesentlich gefördert. Zu den bisher untersuchten Analyten gehören u. a. Pestizide, Nitroaromaten, polycyclische Aromaten und biologische Toxine. Die Empfindlichkeit der Immunoassays erlaubt im Gegensatz zu herkömmlichen Verfahren wie Gaschromatographie oder HPLC die Messung von Umweltschadstoffen direkt am Wasserhahn oder in Nebel- oder Tautropfen ohne vorherige Anreicherung. Immunoassays ermöglichen außerdem ein schnelles und kostengünstiges Screening einer großen Anzahl von Proben. So kann im landwirtschaftlichen Bereich die Kontrolle der Einhaltung von Umweltgesetzen flächendeckend erfolgen und ist damit viel effizienter als die Durchführung einzelner Stichproben. Bei einem Modellversuch in einer bayerischen Gemeinde konnte mit dieser Methode der Einsatz von einem verbotenen Pestizid parzellenscharf nachgewiesen werden [231]. Als die Untersuchung im darauffolgenden Jahr wiederholt wurde, stellte sich heraus, daß die Anwendung des verbotenen Pestizids von allen Landwirten eingestellt worden war.

Aktuelle Bestrebungen zur Weiterentwicklung der Immunoassays im umweltanalytischen Bereich sind die parallele Messung unterschiedlicher Analyten (Multianalytfähigkeit) [232], die Entwicklung von Schnellmeßtechniken (z. B. Teststäbchen) [233] und die Entwicklung von Sensoren für die kontinuierliche Überwachung von beispielsweise der Wasserqualität.

3.2.2 Prinzip und Durchführung

Da es viele verschiedene Immunoassay-Varianten gibt, erscheint eine Einteilung anhand geeigneter Kriterien sinnvoll. Häufig werden Immunoassays nach äußeren Merkmalen klassifiziert. So gibt es die Einteilung in homogene und heterogene Assays, je nachdem, ob Assaykomponenten an einer festen Phase immobilisiert werden oder nicht. Andere Einteilungen erfolgen aufgrund der verwendeten Markierung, Detektionsart oder Festphase. Mechanistisch lassen sich Immunoassays in kompetitive und nichtkompetitive Assays einteilen. Diese Klassifizierung erscheint am sinnvollsten, da die zugrundeliegenden Reaktionen und Gesetzmäßigkeiten unterschiedlich sind und die beiden Typen unterschiedliche Optimierungstrategien erfordern. Da das Prinzip der verschiedenen Testformate in zahlreichen

Veröffentlichungen beschrieben wurde ([194, 234-236], homogene Immunoassays: [237]), werden im folgenden nur die grundlegend unterschiedlichen Tests beschrieben.

Kompetitive ELISAs

Beim diesem Testformat findet eine Konkurrenz zwischen dem Analyten und einem Analyt-Protein-Konjugat um eine limitierte Anzahl von Antikörperbindungsstellen statt. Beim direkten kompetitiven ELISA ist das Analyt-Protein-Konjugat ein sog. *Enzymtracer*, d. h. ein enzymmarkiertes Analytmolekül. Bei dem indirekten kompetitiven ELISA besteht das Analyt-Protein-Konjugat (sog. *Coatingantigen*) aus einem beliebigen, nicht mit dem Antikörper wechselwirkenden Protein, an welches Analytmoleküle kovalent gekoppelt sind. Die Funktion des Proteins liegt hierbei in der Immobilisierung von Analytmolekülen auf einer festen Oberfläche. Alternativ zu der Proteinimmobilisierung können die Analytmoleküle auch kovalent auf bestimmten Oberflächen immobilisiert werden. Letztere Methode wird insbesondere bei Sensoranwendungen der Immunoassays eingesetzt. Das direkte Format unterscheidet sich vom indirekten dadurch, daß bei ersterem zunächst der Antikörper auf der Oberfläche immobilisiert wird und bei letzterem das Coatingantigen.

Direkter kompetitiver ELISA

Das Prinzip des direkten kompetitiven ELISA ist in Abb. 12 dargestellt. Im ersten Schritt werden die Antikörper, gelöst in einem geeigneten Puffer, auf der Oberfläche einer Polystyrol-Mikrotiterplatte durch mehrstündiges Schütteln immobilisiert. Die Bindung erfolgt unspezifisch durch Adsorption, ist jedoch so stark, daß die Antikörper auch bei intensivem Waschen nicht abgelöst werden. Werden monoklonale Antikörper verwendet, so wird meist mit einem anti-Maus-Serum vorbeschichtet, bevor die monoklonalen Antikörper immobilisiert werden. Der Grund hierfür liegt darin, daß monoklonale Antikörper oft als sog. Zellkulturüberstände vorliegen, die aufgrund ihres hohen Fremdproteingehaltes die Oberflächen weniger gut beschichten. Durch Waschen der Mikrotiterplatte werden anschließend alle nicht gebundenen Antikörper entfernt. Im nächsten Schritt erfolgt die Zugabe von Analyt, welcher idealerweise so lange vorinkubiert wird, bis das Gleichgewicht der Bindung zwischen Analyt und Antikörper erreicht ist. Im nächsten Schritt erfolgt die Zugabe des Enzymtracers, d. h. eines enzymmarkierten Analytmoleküls. Der Enzymtracer bindet an die frei gebliebenen Antikörperbindungsstellen. Durch Verwendung geringer Mengen Tracer und durch möglichst kurze Tracerinkubationszeiten wird erreicht, daß das ursprüngliche Gleichgewicht möglichst wenig gestört wird. Mit dieser Art der Testdurchführung werden die empfindlichsten Assays erhalten.

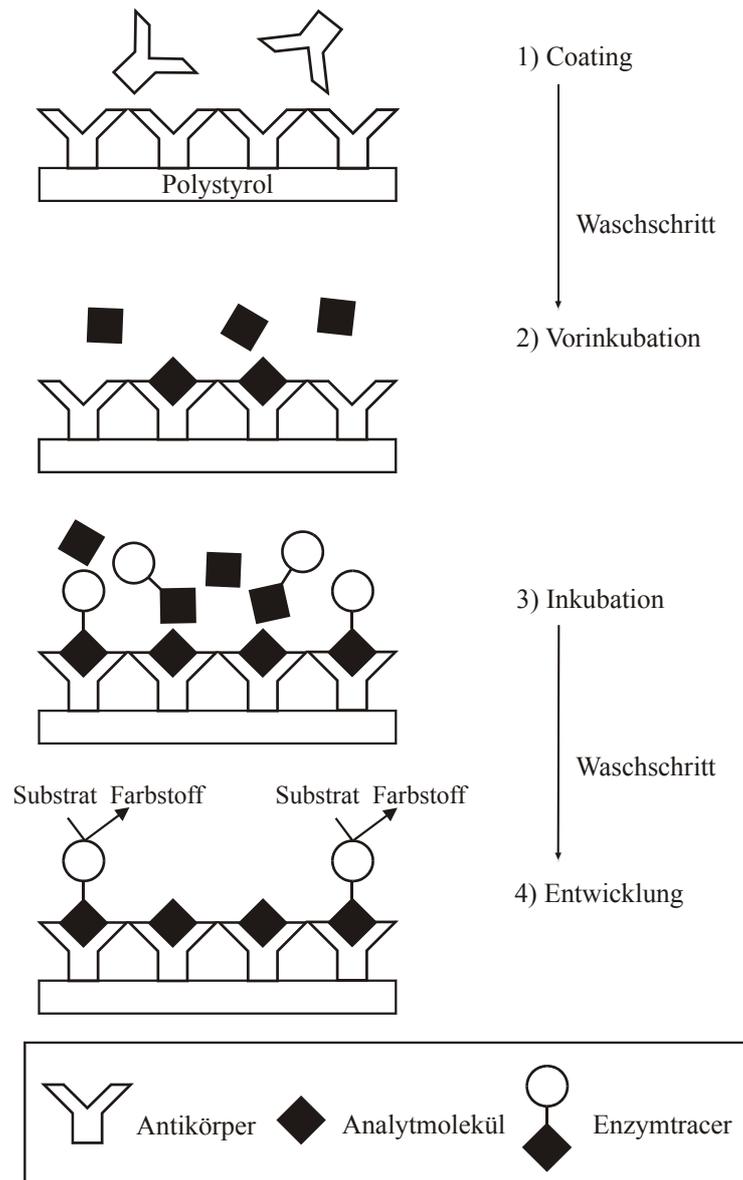


Abb. 12: Prinzip des direkten kompetitiven ELISAs. 1) Beschichtung mit Antikörpern, 2) Standard- bzw. Probenzugabe, 3) Tracerzugabe, 4) Entwicklung.

Nach einem weiteren Waschschritt, der alle ungebundenen Bestandteile entfernt, erfolgt die Substratzugabe. Ist das verwendete Markerenzym Meerrettichperoxidase (POD), so wird meist eine Mischung einer Wasserstoffperoxid und einer 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-(TMB)-Lösung als Substrat verwendet. Die Oxidation von TMB durch H_2O_2 wird von Peroxidase katalysiert. Das entstehende Produkt ist blau gefärbt. Nach wenigen Minuten, nämlich dann wenn eine deutliche Blaufärbung der Lösung stattgefunden hat, wird die enzymatische Reaktion abgestoppt. Dazu wird Säure oder Base verwendet, die das Enzym sofort denaturiert und damit die gesamte Aktivität zerstört. POD wird üblicherweise mit Schwefelsäure denaturiert, wobei das blaue Radikalkation vollständig in das gelbe Diphenochinondiimmoniumion umgesetzt wird, welches einen höheren Absorptionskoeffizienten hat. Die Farbentwicklung sollte nicht länger als 30 Minuten erfolgen, da Peroxidase aufgrund der verwendeten sauren Puffer und des Wasserstoffperoxids an Aktivität verliert, während die nicht-

katalysierte Oxidation des TMB zunimmt. Diese Art der Testdurchführung hat zur Folge, daß Lösungen, die hohe Analytkonzentrationen enthalten, ein niedriges Signal ergeben, da wenig freie Bindungsplätze für den Tracer übrig bleiben. Umgekehrt bedeutet ein hohes Signal eine geringe Analytkonzentration in der Probe.

Indirekter kompetitiver ELISA

Das Prinzip des indirekten kompetitiven ELISA ist in Abb. 13 dargestellt. Hier wird im ersten Schritt eine konstante Menge der Analytsubstanz (Hapten) an der Oberfläche einer Platte immobilisiert. Da Analytmoleküle meist zu klein sind, um adsorptiv an die Polystyroloberfläche zu binden, werden sie zunächst an ein Protein gekoppelt, welches die Immobilisierung vermittelt. Verwendet man polyklonale Antikörper, so ist darauf zu achten, daß ein Protein eingesetzt wird, das nicht als Trägerprotein für die Immunisierung diente, da das Antiserum in diesem Fall Antikörper dagegen enthalten würde. Diese "unspezifische" Bindung würde den Test unbrauchbar machen. Nach einem Waschschrift und eventuellem Blocken freier Oberflächenplätze mit anderen Proteinen wird der Analyt und der Antikörper zugegeben. In Analogie zu der Durchführung des direkten kompetitiven ELISA wird in manchen Protokollen die Vorinkubation des Analyten und des Antikörpers in einer gesonderten Mikrotiterplatte beschrieben. Wie beim direkten kompetitiven ELISA kommt es zur Konkurrenz der freien und der immobilisierten Analytmoleküle um die limitierte Zahl der Antikörperbindungsstellen. Je mehr Analyt in der Probe vorhanden ist, desto weniger Antikörper bindet an die immobilisierten Analytmoleküle. Nach einem weiteren Waschschrift wird ein Sekundärantikörper zugegeben, der die Aufgabe hat, die Bindung der Antikörper an die immobilisierten Analytmoleküle sichtbar zu machen. Der Sekundärantikörper bindet an den F_c-Teil des ersten Antikörpers und ist enzymmarkiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgt die Signalentwicklung, wie sie für den direkten kompetitiven ELISA beschrieben wurde.

Mechanistisch gesehen ist der direkte und der indirekte kompetitive Immunoassay sehr ähnlich, da ihnen die gleichen Reaktionsgleichungen zugrunde liegen. Beide Assayvarianten sollten nach der Optimierung die gleichen Testparameter liefern. Ein Unterschied besteht jedoch, der die Optimierung des indirekten kompetitiven ELISAs erschwert. Das Hapten-Protein-Konjugat, das zur Immobilisierung der Haptene dient, trägt meist mehrere Haptene auf der Oberfläche. Dies liegt daran, daß die meisten Proteine mehrere kopplungsfähige Gruppen (z. B. primäre Aminogruppen) besitzen und eine Steuerung der Synthese hin zu monovalenten Proteinkonjugaten sehr schwierig ist. Multivalente Proteinkonjugate erlauben eine bivalente Bindung der Antikörper, welche viel stärker ist, als die monovalente zu dem Analytmolekül. Bivalente Bindungen und langsamere Diffusion des Antikörpers in Lösung tragen zu einer Diskriminierung der Bindung zwischen freiem Analyten und Antikörper gegenüber der Bindung zwischen immobilisiertem Analyten und Antikörper bei. Im Gegensatz dazu ist der beim direkten kompetitiven ELISA eingesetzte Enzymtracer meist monovalent, da Meerrettichperoxidase nur zwei frei zugängliche, primäre Aminogruppen enthält [238, S. 630-639]. Bivalente Bindungen sind in diesem Fall aus sterischen Gründen fast ausgeschlossen.

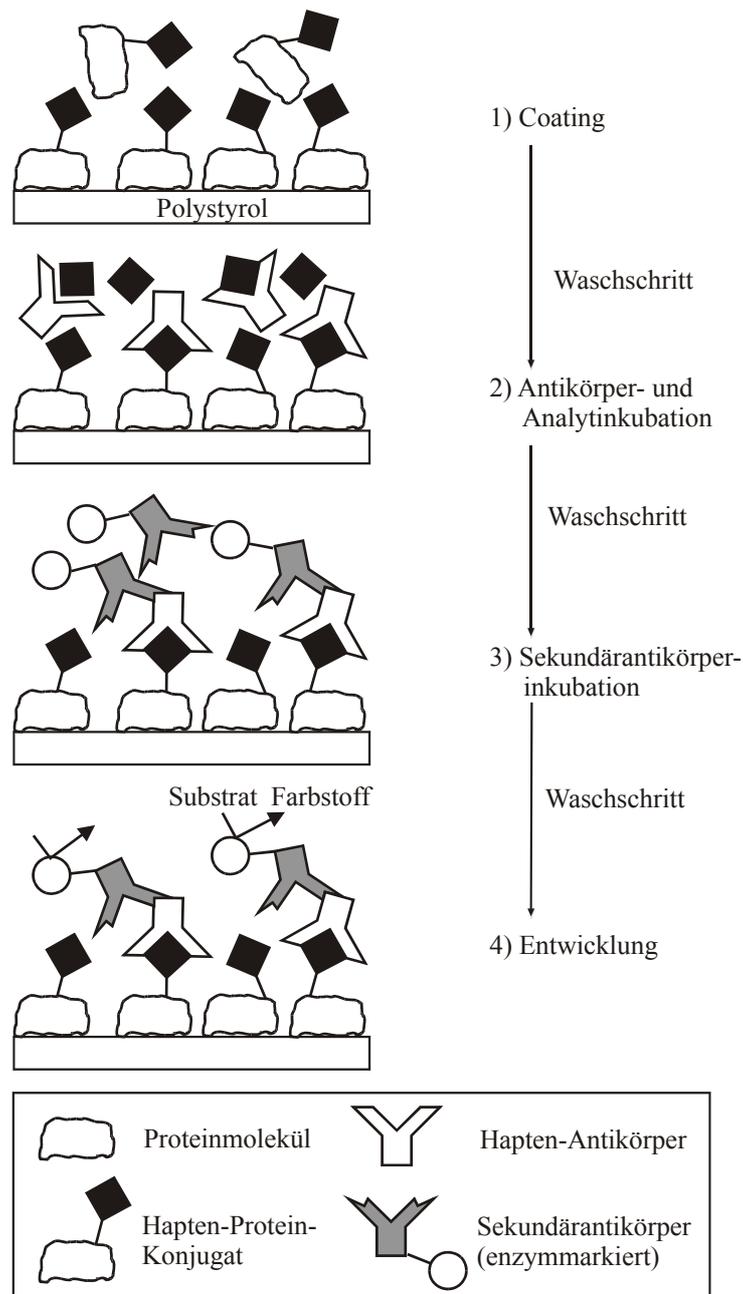


Abb. 13: Prinzip des indirekten kompetitiven ELISAs. 1) Beschichtung mit Proteinkonjugat, 2) Zugabe des Analyten (Haptens) und des Hapten-Antikörpers, 3) Zugabe des Sekundärantikörpers, 4) Entwicklung.

Nichtkompetitiver ELISA (Sandwich-ELISA)

Der nichtkompetitive ELISA, auch Sandwich-ELISA genannt, läßt sich nur bei Analyten anwenden, die groß genug sind, um von zwei Antikörpern gleichzeitig gebunden zu werden. Umweltschadstoffe sind meist kleine Analyten, die die Anwendung dieses Testformats nicht erlauben. Hingegen können Schadstoffe, die an polymere organische Substanzen gebunden sind, mit diesem Assay nachgewiesen werden [239, 240].

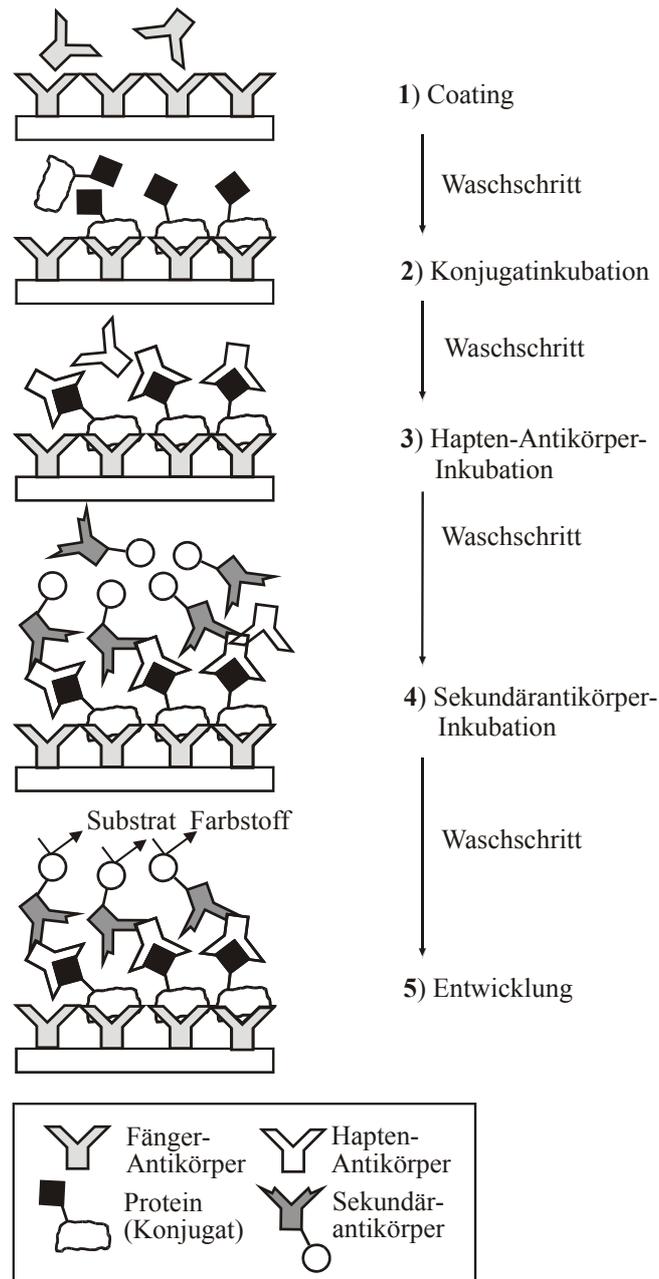


Abb. 14: Prinzip des nichtkompetitiven ELISAs. 1) Inkubation des Fängerantikörpers, 2) Inkubation des Hapten-Proteinkonjugats, 3) Inkubation des Hapten-Antikörpers, 4) Inkubation des enzymmarkierten Sekundärantikörpers.

Das Prinzip des Sandwich-ELISA ist in Abb. 14 dargestellt. Zunächst wird einer der beiden analytspezifischen Antikörper auf der Oberfläche immobilisiert. Nach einem Waschschrift erfolgt die Inkubation des Analyten. Der immobilisierte Antikörper bindet an ein Epitop des Analyten. Die gebundene Menge ist proportional der in der Lösung vorhandenen Analytkonzentration. Nach einem weiteren Waschschrift wird ein zweiter Antikörper zugegeben. Dieser erkennt ein anderes Epitop des Analytmoleküls. Durch den enzymmarkierten Sekundärantikörper wird nach einem weiteren Waschschrift die Bindung sichtbar gemacht. Bei diesem Testformat ist das Signal positiv mit der Analytkonzentration korreliert. Je mehr Analyt vorhanden ist, desto höher ist das Signal. Durch Einsatz des Haptenantikörpers im

Überschuß kann das Gleichgewicht der Analyt-Antikörper-Reaktion nach dem Prinzip von LE CHATELIER in Richtung des Komplexes verschoben werden. Dadurch wird die Detektion sehr geringer Analytkonzentrationen möglich. Für einen Antikörper gegebener Affinität ist dieses Testformat deshalb empfindlicher als das kompetitive Format [241]. Limitierend wirkt sich in diesem Fall die unspezifische Bindung aus, die bei hohen Antikörperkonzentrationen zu beobachten ist.

3.2.3 Messung und Auswertung von ELISAs

Die Quantifizierung des gebundenen Antigens im ELISA erfolgt über den Substratumsatz des Enzyms. Mit steigender Analytkonzentration fällt die Signalintensität beim kompetitiven Immunoassay und steigt beim nichtkompetitiven Immunoassay. Die Konzentration kann dabei anhand der Farbentwicklung zunächst visuell abgeschätzt werden und dann durch Absorptionsmessung im Photometer exakt bestimmt werden. Für Routinemessungen wird dazu im allgemeinen die Endpunktmethode einer kinetischen Messung vorgezogen, da sie weniger Gerätekapazitäten erfordert und geringere Datenmengen liefert. Bei der Verwendung von TMB als Substrat besteht darüber hinaus der Vorteil, daß der nach dem Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure entstandene gelbe Farbstoff einen höheren Extinktionskoeffizienten besitzt als das ursprüngliche Produkt.

Fitfunktion

Bei einer halblogarithmischen Auftragung der Rohdaten wird eine sigmoidale Kurve erhalten, die nach RODBARD [242] mit Hilfe von vier Parametern rechnerisch erfaßt werden kann (Gleichung 3). Auch eine Expertengruppe der Internationalen Atomenergiebehörde [243] empfiehlt die Auswertung von Immunoassay-Rohdaten nach dieser Formel. Die vierparametrische Gleichung, auch logistische Fitfunktion genannt, ist in kommerziell erhältlicher Datenauswertesoftware, z. B. Origin[®], enthalten, was die Auswertung der Daten wesentlich erleichtert.

$$Y = \frac{(A - D)}{\left[1 + \left(\frac{X}{C} \right)^B \right]} + D \quad \text{Gleichung 3}$$

mit	X	Analytkonzentration [$\mu\text{g/L}$]
	Y	Absorption (450 nm)
	A	Maximale Absorption (obere Asymptote)
	B	Steigung am Testmittelpunkt
	C	Testmittelpunkt (50 %-Wert) [$\mu\text{g/L}$]
	D	Minimale Absorption (untere Asymptote)

Diese Funktion ist monoton und erzwingt einen sigmoidalen Verlauf. Sie kann sowohl für kompetitive als auch für nichtkompetitive Immunoassays zur Auswertung verwendet werden, wobei sich das Vorzeichen der Steigung am Testmittelpunkt ändert. Betrachtet man das Fehlerprofil einer sigmoidalen Kalibrierkurve, so zeigt sich, daß der Variationskoeffizient im steilen Bereich der Kurve klein und relativ konstant ist, während er in den asymptotischen Randbereichen schnell sehr groß wird. Deshalb ist der Testmittelpunkt, der im steilsten Bereich der Kurve liegt, das wohl wichtigste Merkmal eines ELISAs. Er ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Kalibrierkurve mit der 50%-Achse der Extinktion bzw. dem Wendepunkt der sigmoidalen Kurve und wird auch IC_{50} -Wert (50 % inhibition, IC_{50}) genannt. Mit dem Testmittelpunkt C , der die Dimension einer Konzentration hat, läßt sich die Empfindlichkeit eines Tests sehr genau charakterisieren. Der Meßbereich von Immunoassays ist vergleichsweise beschränkt und stellt ungefähr zwei Zehnerpotenzen dar, deren Mittelpunkt der IC_{50} -Wert ist.

Die früher gängigste Methode der Auswertung erfolgte durch Linearisierung der Kalibrierdaten ("Logit/Log"-Methode) und wurde erstmals von BERKSON für Bioassays eingeführt [244]. Diese Methode hat den Nachteil, daß sie dazu verleitet, den Meßbereich in Bereiche unterhalb der Nachweisgrenze zu extrapolieren. Zudem bleibt nach Linearisierung oft eine signifikante Krümmung zurück [245]. Trotz ihrer Nachteile findet diese Methode auch heutzutage noch Anwendung, beispielsweise im Bereich der Allergiediagnostik.

Fehlerbetrachtung

Die bei ELISAs auftretenden Fehler sind einerseits statistisch und streuen daher um einen Mittelwert, andererseits werden oft auch sogenannte "Spots" oder "Ausreißer" beobachtet. Ausreißer können durch Spuren von Enzymmarkierung oder Partikel entstehen, die beispielsweise nicht sauber abgewaschen wurden bzw. in die Probe gelangten. Auch Pipettierfehler stellen eine mögliche Ursache dar. Da Ausreißer bei der Bildung des Mittelwertes stark ins Gewicht fallen und diesen verfälschen, wurden von DUDLEY et al. die Verwendung robuster statistischer Methoden vorgeschlagen [243]. Hierbei wird statt dem Mittelwert der Median (mittlerer Zahlenwert) verwendet, welcher gegenüber Ausreißern unempfindlich ist [246]. Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Kalibrierkurven bleiben Ausreißer durch das Auftragen der Spannweite als Fehlerbalken immer noch sichtbar.

Werden Realproben gemessen, so ist nicht nur die Angabe des Mittelwertes, sondern auch die Angabe des Fehlerbereiches wichtig. Hier stellen Ausreißer insofern ein Problem dar, als sie manchmal zu Werten außerhalb des Meßbereiches führen würden. In diesem Fall können die Mittelwerte und die Fehler nach der Methode des "trimmed mean" (gestutzter Mittelwert) [247] berechnet werden. Diese Methode ist geeignet, wenn eine genügend große Zahl von Replikaten gemessen wurde. Die Replikate werden zunächst auf- oder absteigend sortiert. Dann wird eine gleiche Anzahl von größten und kleinsten Werten entfernt. Die restlichen Daten werden zur Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung herangezogen. Werden beispielsweise von fünf Replikaten der höchste und der niedrigste Wert verworfen, so würde der Mittelwert der restlichen drei als 20%-gestutzter Mittelwert bezeichnet werden. Nach dieser Methode wurden die Fehler der gespikten Realproben in dieser Arbeit bestimmt.

3.2.4 Bestimmung der Affinitätskonstanten

Die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten einer Analyt-Antikörper-Bindung ist ein wichtiger Bestandteil der Charakterisierung dieses Antikörpers. Die Affinität des Antikörpers gibt Aufschluß über die maximale Empfindlichkeit, die mit einem Immunoassay unter Verwendung dieses Antikörpers erreicht werden kann. Zur Bestimmung der Gleichgewichts- oder Affinitätskonstanten gibt es unzählige Verfahren, die jeweils Vor- und Nachteile aufweisen. Eine sehr verbreitete Methode, die auf der Bestimmung der Konzentration des freien Liganden beruht, ist die Auftragung eines SCATCHARD-Plots [248]. Andere Möglichkeiten bestehen durch Messung der Veränderung der physikalischen Eigenschaften des gebundenen Liganden oder Antikörpers mittels Fluoreszenzspektroskopie, ESR, NMR oder Absorptionsmessungen. Eine Übersicht über die verschiedenen Methoden ist in [249] und in [194] zu finden. In den letzten Jahren hat zudem die Bestimmung der Affinitätskonstanten mit Sensoren weite Verbreitung gefunden.

1992 führte WELLER ein neues Verfahren zur Abschätzung der Affinitätskonstanten mittels kompetitivem Immunoassay ein [194]. Er konnte aus dem Massenwirkungsgesetz mathematisch herleiten, daß sich die Affinitätskonstante K aus dem Kehrwert des minimalen Testmittelpunktes C_{\min} ergibt (Gleichung 4). Dieser wird erreicht, wenn sowohl die Tracerkonzentration als auch die Antikörperkonzentration infinitesimal niedrig sind.

$$K = \frac{1}{C_{\min}} \quad \text{Gleichung 4}$$

für Konzentration des Tracers $\rightarrow 0$ und Konzentration des Antikörpers $\rightarrow 0$

Die experimentelle Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten mit dieser Methode erfolgt durch sequentielle Verdünnung der Tracer- und Antikörperkonzentration und Ermittlung des Testmittelpunktes. Ist der Testmittelpunkt am Minimum angelangt, so ändert er sich bei weiterer Verdünnung des Tracers bzw. des Antikörpers nicht mehr. Hingegen nimmt das maximale Signal aufgrund der Verdünnung stark ab. Diese Methode erreicht ihre Grenzen bei extrem hohen Antikörperaffinitäten. In diesem Fall beschränkt die Nachweisstärke des Tracers die exakte Bestimmung der Affinitätskonstanten. Trotzdem wird eine Mindestaffinität erhalten.

3.2.5 Kreuzreaktivität

Einen weiteren Beitrag zur Charakterisierung eines Antikörpers leistet die Bestimmung seines Kreuzreaktionsmusters, d. h. seiner Querempfindlichkeiten. Allgemein wird von *Kreuzreaktion* zwischen zwei Liganden (Analyten) bzgl. der Bindung zu einem Antikörper oder Rezeptor gesprochen, wenn beide Liganden dieselbe Bindungsstelle besetzen können und eine meßbare Affinität zu ihr aufweisen. Die Messung der Kreuzreaktionen ist sowohl von analytischem Interesse, als auch von Interesse für die molekularen Bindungsmechanismen des Antikörpers. Aus analytischer Sicht ist meist einer von zwei Grenzfällen erwünscht. Entweder soll der Antikörper selektiv einen einzigen Vertreter einer Stoffklasse binden ("Monospezifität") oder er soll alle Vertreter einer Stoffklasse gleich gut binden ("Gruppenspezifität"). In letzterem Fall spricht man auch von einem *Breitbandantikörper*. Die beiden extremen Anforderungen an Antikörper ergeben sich aus der Schwierigkeit, Mehrkomponentengemische zu quantifizieren, wenn diese Komponenten mit unterschiedlichen Kreuzreaktionen enthalten. Schon für eine binäre Mischung ist ein erheblicher Aufwand an Kalibration und Datenverarbeitung notwendig, um Einzelkonzentrationen zu ermitteln, da die Kreuzreaktionen nicht unbedingt additiv zusammenwirken [250]. Im Falle von Mehrkomponentengemischen kann lediglich die Angabe einer Äquivalentkonzentration erfolgen, die sich auf die Kalibriersubstanz bezieht. Das Problem der Kreuzreaktionen ist einer der Hauptgründe der Akzeptanzschwierigkeiten von Immunoassays im umweltanalytischen Bereich.

Am eindeutigsten ist die Kreuzreaktion CR durch das Verhältnis der Affinitätskonstanten von Kreuzreaktant K_{KR} und Standard $K_{Standard}$ zu einem gegebenen Antikörper definiert:

$$CR [\%] = \frac{K_{KR}}{K_{Standard}} \cdot 100 \% \quad \text{Gleichung 5}$$

Der reziproke Wert der durch Gleichung 5 definierten Kreuzreaktion wurde bereits 1976 von JOHNSTON und EISEN [251] als "Selektivität" eingeführt. In diesem Fall ist die Kreuzreaktion lediglich von der Temperatur abhängig, da die Affinitätskonstanten nach der VAN'T HOFFSchen Gleichung temperaturabhängig sind und diese Abhängigkeit für jede Antigen-Antikörper-Reaktion unterschiedlich ist. Da jedoch die Bestimmung der Affinitätskonstanten schwierig ist, werden in der Literatur zahlreiche weitere Definitionen verwendet, die eine leichtere Bestimmung der Kreuzreaktion ermöglichen. Die unterschiedlichen Definitionen können in zwei Kategorien eingeteilt werden. Eine Variante besteht darin, Konzentrationen zueinander ins Verhältnis zu setzen, die notwendig sind, um im Test das gleiche Signal zu erzeugen. Bei der anderen Kategorie von Definitionen werden Signale zueinander ins Verhältnis gesetzt, die von gleichen Mengen an Standard und Kreuzreaktant erzeugt werden. Beide Arten von Definitionen haben Vor- und Nachteile. Es existieren einige Übersichtsartikel zu diesem Thema [252, 253].

In der am weitesten verbreiteten Definition, die auch in dieser Arbeit verwendet wird, berechnet sich der Kreuzreaktion CR im kompetitiven Testformat über das Verhältnis der Testmittelpunkte von Standard C_{Standard} und Kreuzreaktant C_{KR} (Gleichung 6). Diese Definition wurde von ABRAHAM eingeführt [254]:

$$CR_{50\%} [\%] = \frac{C_{\text{Standard}}}{C_{\text{KR}}} \cdot 100 \% \quad \text{Gleichung 6}$$

Je nachdem, ob die Testmittelpunkte als massenbezogene oder molare Konzentrationen angegeben werden, wird eine massenbezogene oder molare Kreuzreaktion erhalten. Für analytische Zwecke wird die Kreuzreaktion meist massenbezogen angegeben, zur strukturellen Charakterisierung von Antikörpern ist jedoch die molare Angabe der Kreuzreaktion besser geeignet. Die ABRAHAM-Definition (Gleichung 6) ist der JOHNSTON-EISEN-Definition (Gleichung 5) äquivalent, wenn die Bedingungen der Gleichung 4 erfüllt sind. Unter diesen Bedingungen lassen sich bei bekannten Kreuzreaktionen und bekannter Affinität des Standards die Affinitäten der Kreuzreaktanden zu einem Antikörper berechnen.

3.2.6 Optimierung kompetitiver Immunoassays

Empfindlichkeit

Ist ein neuer Antikörper hergestellt worden, so muß der Immunoassay dafür optimiert werden. Die Optimierung kann anhand unterschiedlicher Kriterien erfolgen. Wie bereits bei der Bestimmung der Affinitätskonstante in Abschnitt 3.2.4 beschrieben, wird der kompetitive Immunoassay um so empfindlicher, je geringer die Antikörper- und Tracerkonzentrationen sind. Ab einer bestimmten Konzentration nimmt jedoch das maximale Signal stark ab [255]. Ein optimierter Assay sollte mit Antikörper- und Tracerkonzentrationen arbeiten, die eine empfindliche Detektion bei gleichzeitig hohem maximalen Signal erlauben. Ein Kompromiß zwischen Signalintensität und Empfindlichkeit muß daher getroffen werden.

Testdauer

Außer den Konzentrationen können auch die Inkubationszeiten optimiert werden. Kurze Tracerinkubationszeiten erhöhen die Empfindlichkeit durch geringe Störung des Analyt-Antikörper-Gleichgewichts und kommen somit einer schnellen Testdurchführung entgegen. Die Länge der Vorinkubationszeit des Analyten sollte die Gleichgewichtseinstellung der Analyt-Antikörper-Bindung gewährleisten, um maximale Empfindlichkeiten zu erreichen. Diese Zeit ist folglich abhängig von der Diffusionsgeschwindigkeit des Analyten und von der Stärke der Analyt-Antikörper-Bindung. Im Gegensatz dazu sollte die Tracerinkubationszeit möglichst kurz gewählt werden, um das eingestellte Gleichgewicht möglichst wenig zu stören.

Als Faustregel kann für die Optimierung der Konzentrationen und der Inkubationszeiten gelten, daß eine maximale Absorption von 1 bei Substratentwicklungszeiten von 15-20 Minuten nach dem Abstoppen erhalten werden sollte.

Kreuzreaktionen

Neben der Empfindlichkeit und der Testdauer kann die Einstellung bestimmter Kreuzreaktionen ein Optimierungskriterium sein. Kreuzreaktionen lassen sich durch die Wahl des Testformates, der Temperatur oder des pH-Wertes ändern. Die Veränderung des pH-Wertes der Analytlösung kann den Analyten in einen anderen Ladungszustand überführen. Veränderungen des Ladungszustandes haben einen großen Einfluß auf die Bindung durch den Antikörper, da ionische Wechselwirkungen ein Viertel einer Antigen-Antikörper-Bindung ausmachen können. WELLER konnte durch Veränderung des pH-Wertes die Kreuzreaktion zweier Triazinherbizide mit unterschiedlichen pK_a -Werten von 100 % bei neutralem pH-Wert auf unter 10 % bei pH 3 senken [194] und damit die Selektivität des Antikörpers wesentlich steigern.

Enzymtracer

Ein weiterer Optimierungsparameter kann die Struktur des Enzymtracers sein. Als Ausgangsstruktur kann zunächst ein dem Immunogen analoges Enzymkonjugat verwendet werden (*homologer* Tracer). Dieses ist dem Immunogen am ähnlichsten und sollte deshalb sehr gut erkannt werden. Hohe Affinitäten des Enzymtracers ermöglichen eine Reduktion der Konzentration und somit empfindliche Assays. Aus sterischen Gründen kann es jedoch manchmal von Vorteil sein, einen strukturell abweichenden Tracer (*heterologen* Tracer) zu verwenden. Beispielsweise band ein Enzymtracer mit einem langen Hexyl-(C₆)-Spacer wesentlich besser an einen TNT-Antikörper, als derjenige mit kurzem Propyl-(C₃)-Spacer [256], obwohl das Immunogen einen sehr kurzen Ethyl-(C₂)-Spacer beinhaltet hatte [255]. Allgemein stellt jedoch die Synthese verschiedener Enzymtracer einen großen, oft nicht gerechtfertigten Aufwand dar, da die Testoptimierung einfacher durch Variation der Konzentrationen und Inkubationszeiten erfolgen kann.

Matrixempfindlichkeit

Je nach Probenmatrix können unterschiedliche Maßnahmen die Tauglichkeit des Immunoassays für Realproben verbessern. Da sich die Probenvorbereitung bei Immunoassays oft nur auf die Verdünnung der Probe beschränkt, lassen sich extreme pH-Werte durch Verwendung geeigneter Verdünnungspuffer ausgleichen, vorhandene Schwermetallsalze durch Zusatz von Chelatbildnern komplexieren und Huminstoffe durch Zusatz von Proteinen (z. B. Rinderserumalbumin) maskieren. Durch den Verzicht auf phosphathaltige Verdünnungspuffer wird vermieden, daß schwerlösliche Calcium- und Magnesiumphosphate aus Proben mit hartem Wasser ausfallen. Weitere Matrixsubstanzen, wie z. B. Chlor im Trinkwasser mancher Regionen, müssen bei Analysen ebenfalls berücksichtigt werden.

4 Massenspektrometrie in der Peptid- und Proteinanalytik

4.1 Einführung

Massenspektrometrie ist eine analytische Methode zur Untersuchung freier gasförmiger Ionen im Hochvakuum, wobei ein Ionenstrahl in einem Massenanalysator aufgetrennt wird und die Masse/Ladungs-Quotienten der Ionen gemessen werden. Die Anwendung dieser Technik in den Biowissenschaften ist wesentlich jünger als immunanalytische Nachweisverfahren. Für ihre Einführung mußte das Problem gelöst werden, schwer flüchtige ionische und gleichzeitig thermisch labile Moleküle als Ionen in die Gasphase zu überführen. Die erzeugten Ionen sollten möglichst energiearm sein, um nicht zu fragmentieren. Dies konnte durch Einführung neuer Ionisierungstechniken erreicht werden. Wichtig dabei war die Einführung einer Probenmatrix, die im Falle von Chemischer Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) gasförmig, flüssig im Falle von Fast Atom Bombardment (FAB) oder fest im Falle von Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI) sein konnte. Weiterhin wurde eine schonende Ionisierung bzw. Desolvatisierung mit Hilfe einer elektrischen Potentialdifferenz (Elektrospray-Ionisation, ESI), eines Partikelstrahles (FAB) oder einer gepulsten Laserstrahlung (MALDI) in Kombination mit den verwendeten Matrices möglich. Die Kopplung von massenspektrometrischen Verfahren mit chromatographischen Verfahren stellte einen weiteren Durchbruch für die Anwendung in der Bioanalytik dar. Einerseits wurden chromatographische Verfahren dahingehend weiterentwickelt, mit geringeren Flüssen zu arbeiten, andererseits wurde massenspektrometrische Verfahren entwickelt, die eine kontinuierliche Ionisation aus der Flüssigphase erlaubten.

Nach der Art der Ionisierung lassen sich massenspektrometrische Verfahren in *homogene* Verfahren und sogenannte "*hot-spot*"-Verfahren einteilen. Bei den homogenen Verfahren treten während der Ionisierung keine großen Temperaturgradienten auf, während bei den "*hot spot*"-Verfahren lokal begrenzt sehr hohe Temperaturgradienten auftreten. Zu den homogenen Verfahren gehört die Elektronenstoß-Ionisation (EI), die Chemische Ionisation (CI), die Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) und die Elektrospray-Ionisation (ESI). *Hot-spot*-Verfahren werden bei Ionisierung mit FAB und MALDI eingesetzt.

Eine Anwendung der Massenspektrometrie in der Bioanalytik ist die Identifizierung bekannter Substanzen in komplexen Gemischen aufgrund ihres Molekulargewichts und ihres Fragmentierungsverhaltens. Bei Kopplungen mit der Chromatographie dient auch das Retentionsverhalten zur Identifizierung. Eine weitere Anwendung ist die Strukturanalyse unbekannter oder partiell unbekannter Verbindungen durch Molekulargewichtsgestimmung, Nachweis funktioneller Gruppen, Bestimmung der Linearsequenz von Peptiden oder durch Bestimmung des Modifizierungsgrades von Proteinen. Bei Molmassen bis ca. 800 Da und bei hoher Massenpräzision läßt sich auch die Elementaranalyse zur Strukturaufklärung nutzen. Schwieriger ist die Anwendung der Massenspektrometrie zur quantitativen Bestimmung bekannter Verbindung in komplexen Gemischen und zur Untersuchung nichtkovalenter Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen.

Massenspektrometer bestehen aus einem Probeneinlaßsystem, einer Ionenquelle, eventuell einer Ionentransferoptik, einem Massenanalysator und einem Massendetektor. Spektrometer, die gezielt eine Ionenart fragmentieren können, besitzen oft noch eine zusätzliche Stoßkammer. Da in der Bioanalytik verschiedene Ionenquellen mit verschiedenen Massenanalysatoren und Detektoren kombiniert werden, werden im folgenden die Prinzipien der am häufigsten verwendeten Ionenquellen und Massenanalysatoren getrennt erläutert.

4.2 Ionisierungsprinzip (Ionenquellen)

Als Ionisierungsprinzipien haben sich zwei Methoden durchgesetzt. Dies sind einerseits die Elektrospray-Ionisation (ESI) und andererseits die Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Ionisation (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation, MALDI). Die Ionisierung mittels ESI hat den Vorteil, daß sie an chromatographische Verfahren gekoppelt werden kann, während bei der MALDI-Methode nur eine off-line-Kopplung möglich ist.

4.2.1 Prinzip der Elektrospray-Ionisation (ESI)

Das Prinzip der Elektrospray-Ionisation ist in Abb. 15 dargestellt und in Übersichtsarbeiten beschrieben worden [257, 258, S. 99-132]. Die Probe wird mittels einer Silica-Kapillare in die Ionenquelle eingeführt. Die Silica-Kapillare befindet sich im Inneren einer Stahlkapillare, an deren Spitze Hochspannung anliegt. Als Gegenelektrode dient die Einlaßöffnung des Massenspektrometers, welche einige Millimeter entfernt liegt. Das Anlegen der Spannung an die Kapillare bewirkt eine Ladungstrennung der in der Probe vorhandenen Ionen und das Austreten von Tröpfchen mit positiver bzw. negativer Überschussladung, je nach Polarität der Elektrode. Zum Versprühen des Flüssigkeitsstroms dient ein schwach geheizter (ca. 50 °C) Stickstoffstrom, der konzentrisch um die Silica-Kapillare herum geführt wird. Im ersten Schritt erfolgt das Verdampfen des Lösungsmittels der Tröpfchen. Dieser Prozeß wird unterstützt von einem weiteren beheizten Stickstoffstrom (300-350 °C). Die Ionenquelle befindet sich dabei unter Atmosphärendruck. Entstehende Ionen können ihre Energie durch Stöße mit den Gasmolekülen abgeben. Trotz des beheizten Stickstoffstroms ist eine erfolgreiche Vernebelung abhängig von der Flußrate und dem verwendeten Lösungsmittel. Je höher die Flußrate ist, desto höher ist der Stickstoffverbrauch, während die Ionenausbeute nicht proportional zunimmt. Das Lösungsmittel sollte eine Mischung aus Wasser und einem leicht flüchtigen organischen Lösungsmittel sein. Wasser ist als protisches Lösungsmittel wichtig für die Ionisierung der Probe, während das organische Lösungsmittel zur Beschleunigung des Verdampfens dient.

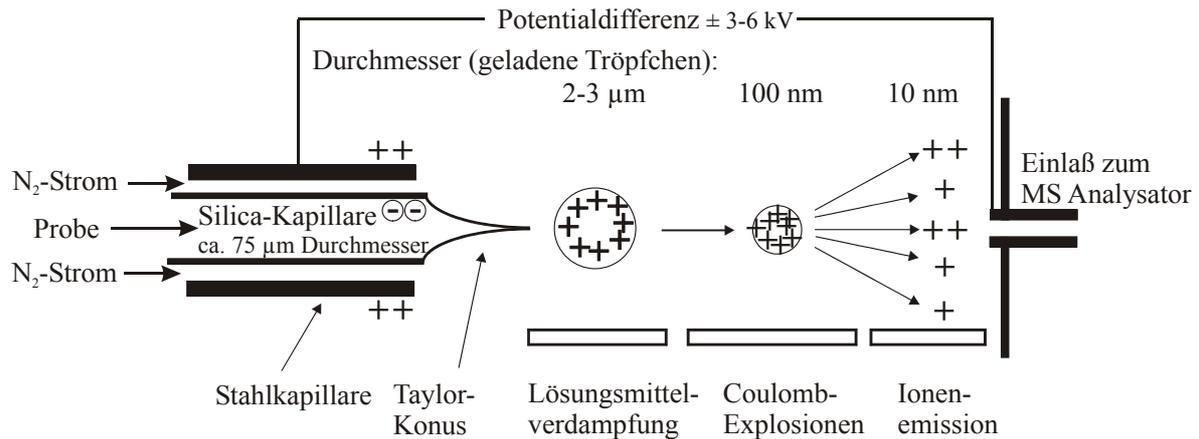


Abb. 15: Bildung gasförmiger Ionen aus geladenen Aerosoltröpfchen bei der Elektrospray-Ionisierung. Gezeigt ist die Bildung positiver gasförmiger Ionen. Negativ geladene Ionen werden durch Umkehrung der Spannung erhalten.

Durch das Verdampfen des Lösungsmittels werden die Ladungen auf ein immer kleineres Volumen konzentriert. Ab einem kritischen Ladungs/Volumen-Quotienten des Tröpfchens, der von der Oberflächenspannung des Lösungsmittels abhängig ist [257], wird das Tröpfchen instabil und beginnt seine Form durch Schwingungen zu verändern. Die elastischen Schwingungen stimulieren das Austreten sehr kleiner Tröpfchen. Die entstehenden Tröpfchen haben einen Durchmesser von einem Zehntel des ursprünglichen Tröpfchens. Für den weiteren Prozeß gibt es zwei unterschiedliche Theorien. DOLE et al. [259] gehen von einer Bildung extrem kleiner Tröpfchen (Durchmesser ca. 2 nm) aus, die nur noch ein solvatisiertes Ion enthalten. Das Analyt wird anschließend durch Desolvatisierung in die Gasphase überführt. Dieses Modell wird als Modell des geladenen Rückstandes (charged-residue model) bezeichnet. Es erklärt jedoch den Mechanismus der Bildung solch kleiner Tröpfchen nicht genau. Das zweite, jüngere Modell von IRIBARNE und THOMPSON [260, 261] geht von der Freisetzung der Ionen aus sehr kleinen (Durchmesser ca. 16 nm), hochgeladenen Tröpfchen aus, die noch mehrere Ionen enthalten. Hier erfolgt die Ionenemission ohne Hydrathülle. Das Modell wird Ionenemissionsmodell genannt. Beide Modelle dienen zur Erklärung einzelner Phänomene des ESI-Verfahrens. Ersteres Modell erklärt das Auftreten von Adduktionen (z. B. Dimeren oder Trimeren eines Moleküls, oder von nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen Makromolekülen) besser, da diese eher durch Verlust von Lösungsmittelmolekülen aus Mikrotropfen als durch Ionenemission entstehen. Mit letzterem Modell lassen sich die Ladungsverteilungen von Makromolekülen besser beschreiben. Es gehört zu den typischen Merkmalen des ESI-Verfahrens, daß Proteine und andere Makromoleküle eine Ladungsverteilung aufweisen, welche zu einer Serie von m/z -Werten im Massenspektrum führt. Nehmen die Moleküle in Tröpfchen mit homogener Ladungsverteilung einen größeren Raum ein, so können sie mehr Ladungen aufnehmen. Dies erklärt, warum Moleküle unterhalb von 1 000 Da eher einfach geladen, solche mit Molmassen über 1 000 Da häufiger als mehrfach geladene Ionen auftreten. Auch durch Denaturierung von Proteinen, welche meist zu einer Entfaltung und größeren räumlichen Verteilung führt, werden im Mittel höher geladene Ionenspezies erhalten [262]. Die Variation des Ladungszustandes ist nicht nur von der räum-

lichen Ausdehnung der Moleküle, sondern auch von den Gasflüssen der Vernebelungsgase abhängig. Eine Erhöhung des Gasflusses bewirkt ein schnelleres Verdampfen des Lösungsmittels, das Aufkonzentrieren der Ionen und somit das Auftreten von höheren Ladungszuständen [263].

Während früher die Entwicklungen in der ESI-Massenspektrometrie darauf ausgerichtet waren, möglichst hohe Flüsse (≥ 1 mL/min) zu gewährleisten, um eine Kopplung an die Standard-HPLC-Methoden zu ermöglichen, sind heutzutage die Entwicklungen in der Chromatographie dahingehend, die Verfahren zu miniaturisieren. Diese Entwicklung wird von dem Umgang mit kleinen Substanzmengen getrieben, die in der Bioanalytik meist zur Verfügung stehen. Sie kommt jedoch den massenspektrometrischen Verfahren sehr entgegen. Das Versprühen geringerer Flüsse ermöglicht die Reduktion der Gasflüsse für die Vernebelung und die Vergrößerung der Einlaßöffnung des Massenanalysators, was eine Erhöhung der Ionenausbeute zur Folge hat. Diese Öffnung des Massenanalysator ist kritisch für die Aufrechterhaltung des Vakuums im Massenspektrometer und soll auch das Eindringen von Verschmutzungen möglichst verhindern.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß das ESI-Verfahren zum massenspektrometrischen Nachweis von geladenen (ionischen) Substanzen besonders gut geeignet ist. Proteine und andere Makromoleküle treten im Gegensatz zu anderen Ionisierungsverfahren (z. B. MALDI) als mehrfach geladene Ionen auf und bilden m/z -Serien mit einer Intensitätsverteilung um eine mittlere Ladung. Diese Tatsache ist einerseits vorteilhaft, da auch sehr große Moleküle (Molmassen bis 10^6 Da [264]) bei niedrigen m/z -Werten messbar sind. Andererseits müssen die Massenspektren zunächst dekonvolutiert werden, um die Molmassen der Moleküle zu bestimmen. Die Nachweisempfindlichkeit ist niedriger als bei MALDI, da sich das Signal auf viele Peaks verteilt. Weiterhin läßt sich feststellen, daß dieses Ionisierungsverfahren aufgrund des oben beschriebenen Mechanismus besonders anfällig gegenüber anorganischen Salzen und Detergenzien ist. Detergenzien ändern die Oberflächenspannung des austretenden Flüssigkeitsstromes und der entstehenden Tröpfchen und besetzen die Oberflächenplätze der Tröpfchen, aus denen die Ionenemission erfolgt.

4.2.2 Prinzip der Matrix-unterstützten Laser-Desorption (MALDI)

Beim MALDI-Verfahren wird die Probe aus einer festen Matrix mittels Laser-Desorption in die Gasphase überführt und meist mit einem Flugzeit-Massenanalysator [258, S. 133-153, 265-268], jedoch auch mit Ionenfallen [269] und Ionen-Cyclotron-Resonanz-Massenanalysatoren (ICR) nachgewiesen. Der Flugzeit-Massenanalysator trennt die Ionen aufgrund ihrer unterschiedlichen Flugzeit zwischen der Quelle und dem Detektor, wie später noch beschrieben wird. Gepulste Laser, die zur Ionisierung eingesetzt werden, starten gleichzeitig die Zeitmessung. Als Matrix wird eine Substanz ausgewählt, die bei der Wellenlänge des Lasers eine starke Absorption besitzt. Sie hat die Aufgabe, die zur Desorption notwendige Energie auf die Probe zu übertragen. Gleichzeitig schützt sie die Probe vor photolytischer Zersetzung, liefert die zur Ionisierung notwendigen Protonen oder nimmt diese auf und reduziert die Wechsel-

wirkungen der Probenmoleküle untereinander. Matrixsubstanzen werden deshalb in 10^3 - 10^4 fachem Überschuß zu der Probe gegeben.

Probenpräparationen für die MALDI-Massenspektrometrie liefern heterogene Kristalle, da die Probe zunächst in flüssiger Form (0.5-10 μ L Probenvolumen) mit der Matrixlösung vermischt wird und dann auf einem Probenhalter durch Verdampfung des Lösungsmittels auskristallisiert. Der eingetrocknete Tropfen ist 1-3 mm im Durchmesser, wobei sich die Kristalle aus Matrix und Substanz meist am Rande des Tropfens konzentrieren. Die Kristallisation hat einerseits den Effekt der partiellen Probenreinigung, da Salze und Verunreinigungen sich gesondert abscheiden, andererseits erschwert die Heterogenität der Probe die Routineanalytik, da der jeweils richtige Bestrahlungsort gesucht werden muß. Häufig verwendete Matrixsubstanzen sind aromatische Säuren (z. B. Zimtsäurederivate, 2,5-Dihydroxybenzoesäure, Nicotinsäure), die bei den üblicherweise eingesetzten Laser-Wellenlängen (266 nm, 337 nm und 355 nm) gut absorbieren. Ein Problem bei der Verwendung dieser Matrices ist deren Acidität. Außerdem erhitzen manche Matrices die Probe zu stark und erschweren damit die Detektion.

Im Gegensatz zu dem ESI-Verfahren treten bei MALDI auch Moleküle mit hohen Molekulargewichten als einfach geladene Ionen auf. Dies ermöglicht einen sehr empfindlichen Nachweis von Molekülen mit hohen Molekulargewichten, da das Signal der Substanz sich in einem Peak konzentriert. Mit MALDI-Massenspektrometrie wurden Empfindlichkeiten bis in den niedrigen Attomol-Bereich erreicht [270, 271]. Schwierig hingegen ist der Nachweis von nichtkovalenten Ligand-Rezeptor-Bindungen, da der nichtphysiologische pH-Wert der Probenpräparation, die UV-Bestrahlung und die Stöße mit anderen Molekülen sich negativ auf die Adduktbildung auswirken. Ebenfalls schwierig ist eine Quantifizierung der Probe aufgrund der Inhomogenität der ausgebildeten Kristalle. Strukturaufklärung durch Untersuchung der Fragmentionen ist eingeschränkt möglich durch Änderung der Reflektorspannung des Flugzeit-Massenanalysator oder Einführung eines Bremsgitters vor dem Detektor im Falle von linearen Flugzeit-Massenanalysatoren.

4.3 Massenanalysatoren

Fünf Typen von Massenanalysatoren für freie gasförmige Ionen haben sich heutzutage durchgesetzt: a) Sektorfeldgeräte, die Ionen durch Kombination eines Magnetfeldes mit einem elektrischen Feld trennen, b) Quadrupolgeräte, die Ionen im Hochfrequenzfeld eines Quadrupol-Stabsystems trennen, c) elektrische Ionenfallen, auch PAUL-Fallen nach ihrem Erfinder genannt, die Ionen in einer Falle, bestehend aus einer ringförmigen Elektrode und zwei Endkappen, einfangen, d) magnetischen Ionenfallen, auch Ionenzyklotron-Resonanz-Zellen oder PENNING-Zellen genannt, welche Ionen im homogenen Magnetfeld eines supraleitenden Magneten einfangen und e) Flugzeit-Massenanalysatoren, die Ionen aufgrund ihrer Flugzeit bei konstanter Anfangsenergie trennen. Die charakteristischen Parameter der Massen-

analysatoren, wie z. B. Empfindlichkeit, Massenauflösung, Massengenauigkeit, dynamische Reichweite, Möglichkeit gezielt zu Fragmentieren, Preis der Anschaffung und Betriebskosten, sind sehr unterschiedlich. Von den oben beschriebenen Analysatoren ist der Flugzeit-Massenanalysator der einzige, der Ionen über einen großen Massenbereich ohne Änderung der Geräteparameter messen kann. Die anderen Massenanalysatoren trennen die Ionen durch Änderung des elektrischen beziehungsweise des magnetischen Feldes. Sie arbeiten entweder im sogenannten Scan-Modus, wo sie einen großen Massenbereich messen oder im Einzelionenmodus (selected ion monitoring, SIM), bei dem nur eine Masse detektiert wird. Letztere Analysatoren eignen sich deshalb zur gezielten Auswahl eines Ions, das anschließend fragmentiert und strukturell aufgeklärt werden kann. Besonders Ionenfallen eignen sich zur mehrfachen Auswahl und Fragmentierung einer Verbindung. Hingegen sind Flugzeit-Massenanalysatoren besser für die Detektion unbekannter Verbindungen oder von Substanzklassen mit vielen Vertretern geeignet. Die unterschiedlichen Eigenschaften der Massenanalysatoren werden durch Kopplung mehrerer Analysatoren hintereinander ausgenutzt. Der Flugzeit-Massenanalysator eignet sich zum Beispiel sehr gut zur Analyse von Fragmentationen und wird deshalb an Quadrupolgeräte mit Stoßkammern gekoppelt.

An dieser Stelle wird nur der Flugzeit-Massenanalysator genauer beschrieben, da er in dieser Arbeit zur Detektion der Microcystine eingesetzt wurde.

4.3.1 Prinzip des Flugzeit-Massenanalysators

Das Prinzip des Flugzeit-Massenanalysators (engl. Time-of-Flight, TOF) beruht auf der unterschiedlichen Zeit t , mit der Ionen der Masse m im Vakuum und feldfreien Raum die Strecke D zurücklegen, wenn sie eine bestimmte Anfangsenergie ($z \cdot e \cdot U$) erhalten haben [272, 273]. Die Anfangsenergie erhalten sie durch das Anlegen eines Spannungspulses. Aus der Energiebilanz (Gleichung 7) ergibt sich der Zusammenhang zwischen dem Masse-zu-Ladungsverhältnis und der Meßgröße Flugzeit:

$$\frac{1}{2} \cdot m \cdot \left(\frac{D}{t} \right)^2 = z \cdot e \cdot U \quad \text{Gleichung 7}$$

Daraus ergibt sich durch Umformen, daß die Flugzeit proportional der Wurzel aus dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) ist:

$$t = \left(\frac{m}{2 \cdot z \cdot e \cdot U} \right)^{1/2} \cdot D \quad \text{Gleichung 8}$$

Ein Flugzeit-Massenanalysator erfordert einen gepulsten, diskontinuierlichen Ionenstrahl mit einer sehr einheitlichen Anfangsenergie. Ursprünglich wurde er deshalb nur bei diskontinuier-

lichen Ionisierungsverfahren, wie der MALDI-Spektrometrie eingesetzt. Die orthogonale Anordnung der Ionenquelle, die Verwendung von Quadrupol- oder Hexapol-Ionenbrücken zum Ausbremsen und Fokussieren des Ionenstrahls und die Einführung des Ionen-Reflektors stellen wichtige Meilensteine in der Entwicklung der Kopplung von Elektrospray mit Flugzeit-Massenanalysatoren dar [274, 275]. Im Folgenden wird der Aufbau und die Funktionen der Bestandteile des ESI-TOF-Gerätes der Firma Micromass beschrieben, das in dieser Arbeit zur Analyse der Microcystine verwendet wurde. Der Aufbau des Massenspektrometers ist in Abb. 16 dargestellt.

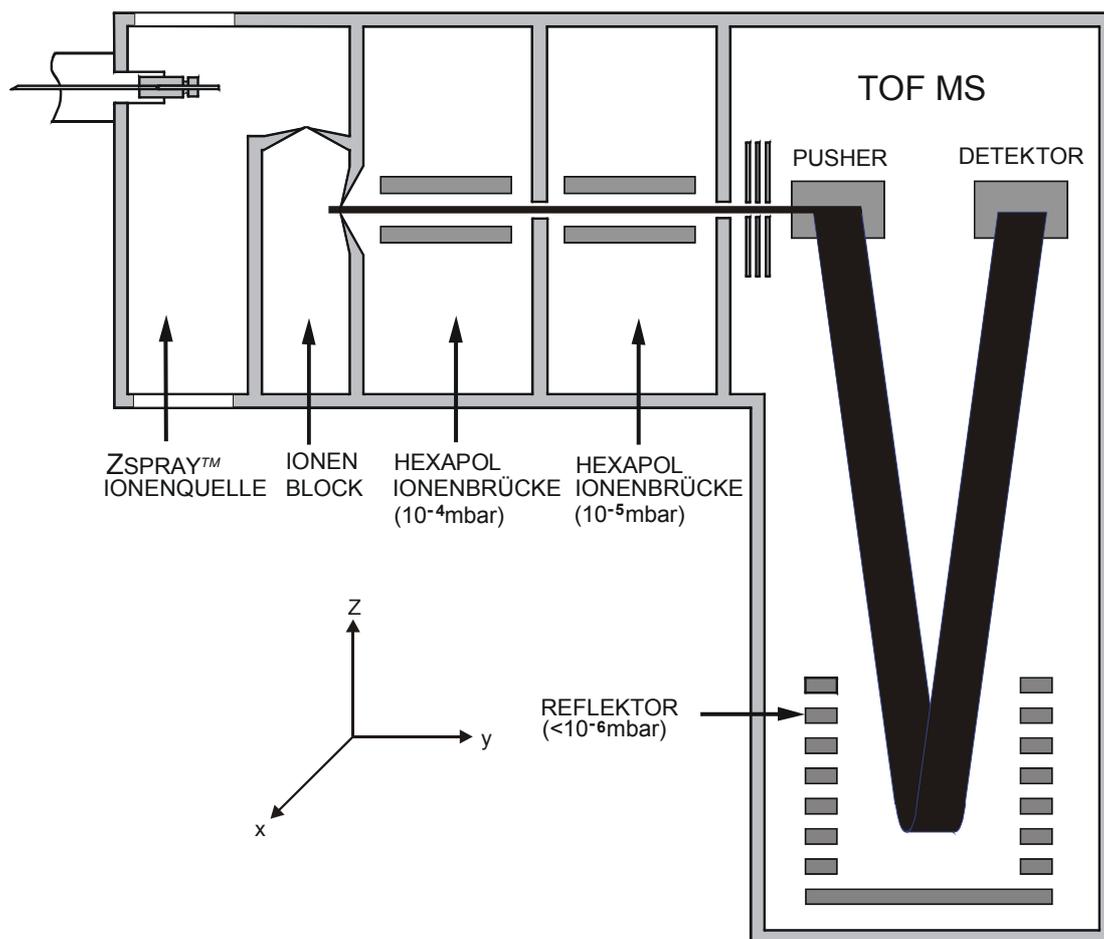


Abb. 16: Reflektor-Flugzeit-Massenanalysator mit Elektrospray-Ionenquelle, Ionentransferoptik und orthogonaler Ionenextraktion. Das Gerät LCT™ der Firma Micromass wurde in dieser Arbeit verwendet (Quelle: Micromass Limited, Manchester, UK).

Links befindet sich die bereits beschriebene Elektrospray-Ionenquelle. Der Einlaß in den Massenanalysator befindet sich nicht in der Flugrichtung der Ionen, sondern senkrecht dazu. Der Ionenstrahl wird im Ionenblock anschließend ein zweites Mal senkrecht abgelenkt, bevor er die Hexapol-Ionenbrücke erreicht. Diese Anordnung wird Z-Spray genannt. Die Z-förmige Anordnung minimiert das Eindringen von Verschmutzungen in den Massenanalysator. Neutralteilchen und überschüssige Puffersalze oder Matrixsubstanzen scheiden sich auf einer Prallplatte gegenüber der Silica-Kapillare ab.

Die beiden Hexapol-Ionenbrücken haben mehrere Funktionen. Zum einen wird hier der Druck von Atmosphärendruck in der Ionenquelle zu Hochvakuum im Flugrohr stufenweise minimiert. Zum anderen werden die Ionen durch Restgasmoleküle weiter abgebremst und in einem schmalen Strahl fokussiert. Anschließend gelangen sie in einem fast monoenergetischen Strom in der y-Richtung in eine Speicherregion (Pusher). Zunächst ist diese Region feldfrei, so daß die Ionen weiter in ihrer ursprünglichen Richtung driften. Wenn ein Spannungspuls am Pusher angelegt wird, werden die Ionen in z-Richtung beschleunigt. In diese Richtung hatten sie keine Ursprungsenergie und bekommen folglich alle dieselbe Anfangsenergie. Durch die geringe ursprüngliche kinetische Energie in y-Richtung fliegt das Ionenpaket in einem Winkel, der einige Grad von der z-Achse abweicht. Die Spannungspulse werden normalerweise mit einer Frequenz im Kilohertz-Bereich angelegt. Die Frequenz ist dadurch limitiert, daß sich einzelne Ionenpakete nicht überschneiden dürfen, d. h., die langsamsten Ionen des ersten Ionenpakets dürfen nicht von den schnellsten Ionen des folgenden Pakets überholt werden. Im feldfreien Flugrohr, der Driftregion, findet die Trennung der Ionen nach ihrer Trägheit statt. Im Reflektor liegt ein elektrisches Feld an, daß die Ionen zunächst abbremst und sie sodann auf den Detektor umlenkt. Der Reflektor ermöglicht einerseits die Reduzierung der Dimensionen des Flugrohrs, andererseits kann hier eine zusätzliche Massenfokussierung stattfinden. Bei Ionen gleicher Masse dringen diejenigen mit einer höheren Energie tiefer in den Reflektor ein, als diejenigen mit einer geringeren Energie. Durch die größere Eindringtiefe werden ursprüngliche Unterschiede in Driftgeschwindigkeiten und -zeiten kompensiert.

Als Massendetektoren dienen bei TOF-Geräten meist großflächige Mikrokanal-Platten (microchannel plates, MCP). Diese können entweder digital oder analog ausgelesen werden. Beide Auslesearten haben ihre Vor- und Nachteile. Digitale Datenverarbeitung mit einem Time-to-digital-Umwandler liefert hohe Auflösung, ist jedoch anfällig gegenüber hohen Zähl-(Ereignis-)Raten. Die analoge Datenverarbeitung hingegen ist eingeschränkt in der zeitlichen Auflösung oder der Repetitionsrate.

Das LCT von Micromass erreicht m/z -Werte bis 13 000, eine Massenauflösung von 5 000 bei m/z von 1 000 und eine Massengenauigkeit von 5 ppm. Eine Übersicht über die Parameter von kommerziell erhältlichen Massenspektrometern mit Elektrospray-Ionisierung und Flugzeit-Massenanalyse ist in einem Übersichtsartikel [276] zu finden.

Anders als bei der MALDI-TOF-Analyse ist bei der ESI-TOF-Analyse bisher kein metastabiler Zerfall der Ionen im Flugrohr beobachtet worden und eine Fragmentionenbestimmung mittels Post-Source-Decay (PSD) erübrigt sich. VERENTCHIKOV et al. führen dies auf die verhältnismäßig lange Zeit zurück, die die Ionen bei Elektrospray-Ionisierung in der Ionenquelle verbringen (ungefähr 100 μ s) [274]. Anders als bei MALDI, wo die Ionen direkt in den Analysator gelangen, haben sie folglich bei ESI-TOF Zeit zu fragmentieren, bevor sie in den Analysator gelangen. Die Beobachtung von Fragmentierungen ist hier durch Änderung der Spannung zwischen Silica-Kapillare und Einlaßöffnung in den Massenanalysator möglich.

4.4 Aspekte der bioanalytischen Massenspektrometrie

4.4.1 Massenkalisierung

Eine korrekte Massenkalisierung ist verantwortlich für die Richtigkeit der Molekulargewichtsbestimmung. Die Massenkalisierung erfolgt zunächst extern, d. h. Kalibriersubstanz und Probe werden sequentiell vermessen und die Parameter der Kalibrierung werden auf die Probe angewendet. Durch interne Massenkalisierung kann die Richtigkeit weiter verbessert werden. Interne Massenkalisierung wird durch Zugabe eines internen Standards, der im Massenbereich des Analyten liegt, erhalten. Die Massenkorrektur beinhaltet das Verschieben der Analytmassen um die Differenz zwischen theoretischer und gemessener Masse des internen Standards. In der Bioanalytik ergeben sich Probleme der Massenkalisierung besonders im Bereich von hohen Molekulargewichten, d. h. bei der Messung von Proteinen. Zum einen wird bei diesen Molmassen eine Auflösung des Isotopenmusters meist nicht mehr erhalten. Zum anderen ist ab Molekulargewichten von 1 500 Da das monoisotopische Signal (^{12}C -Isotop) nicht mehr dasjenige mit der höchsten relativen Häufigkeit, sondern eines mit ein oder mehreren ^{13}C -Atomen. Je höher das Molekulargewicht wird, desto weiter verschiebt sich das intensivste Signal hin zu höheren Massen. Wird eine Einzelmassenauflösung nicht mehr erreicht, so erfolgt eine Zentrumsbestimmung der gesamten Ionengruppe. Soll dieses Molekulargewicht theoretisch berechnet werden, so geht als wichtigster Faktor die ^{13}C -Isotopenhäufigkeit ein. Diese Häufigkeit schwankt je nach Herkunft der Probe um die mittlere natürlichen Häufigkeit von 1.1 %. Zusätzlich zu dieser Ungenauigkeit kommt die Ungenauigkeit der Bestimmung des Atomgewichts des Kohlenstoff von 12.011 ± 0.001 [277]. Bei einem Protein, wie z. B. Myoglobin (Molekulargewicht 16 951.5 Da), das 769 Kohlenstoffatome enthält, stellt diese Ungenauigkeit eine Unsicherheit von 0.77 Da (45 ppm) dar. Aus letzterem Grund empfiehlt Micromass [278] die Verwendung von Proteinen zur Kalibrierung von Proteinen. Die Hoffnung besteht hier, daß sich die Ungenauigkeit der Atommasse des Kohlenstoffs dadurch ausgleicht. LEHMANN hingegen warnt vor dem Einsatz von Proteinen zur Kalibrierung, da Proteine wenig stabil gegenüber Oxidation oder proteolytischem Abbau sind und verschiedene Proteinchargen sich in ihrem Salzgehalt unterscheiden, der die Kalibrierung durch Bildung von Adduktionen verfälschen kann [258, S. 265-274].

Die Kalibrierung im Bereich von Molekularmassen, die eine Auflösung des Isotopenmusters ermöglichen, kann hingegen mit Polyethylenglykolen oder anorganischen Salzen wie NaI oder CsI erfolgen. Die Clusterionensalze der Iodide erlauben eine sehr genaue Zentrumsbestimmung, da sie monoisotopisch sind. Die Auswahl der geeigneten Kalibriersubstanz richtet sich nach dem zu messenden Massenbereich. Sowohl Polyethylenglykole als auch die Iodide decken einen weiten Massenbereich ab (z. B. CsI von 100 bis 2500 Da). Für die interne Kalibrierung werden meist Substanzen verwendet, die dem Analyt sowohl in der Masse als auch in den chemischen Eigenschaften ähnlich sind. Wird mit LC-MS-Kopplung gearbeitet, so kann der interne Standard über eine Spritzenpumpe kontinuierlich zu dem Eluat der Chromatographie zugemischt werden. Auf diese Weise wird ein kontinuierliches Signal über die gesamte Dauer der Chromatographie erhalten.

4.4.2 Quantifizierung und Matrixeffekte

Obwohl die Technik der Elektrospray-Ionisation weit verbreitet ist und viel Arbeit auf diesem Gebiet geleistet wurde, ist es immer noch schwierig, die Effekte von Lösungsmitteln, Analyten und Elektrolyten auf die Peakintensitäten vorherzusagen. Oft korrelieren die im Massenspektrum beobachteten relativen Intensitäten nicht mit den relativen Konzentrationen der Ionen in Lösung. Dies erschwert die Quantifizierung und muß insbesondere bei Arbeiten mit internen Standards berücksichtigt werden. Die maximale Konzentration der bei Elektrospray-Prozessen gebildeten Ionen ist gegeben durch die Konzentration der gebildeten Überschlußladungen. Diese maximale Konzentration ist proportional zu dem Spraystrom und indirekt proportional zu dem verwendeten Fluß [279, 280]. Die Konzentration der gasförmigen Analytionen ist jedoch auch von den Eigenschaften des Analyten (Oberflächenaktivität, Solvatationsenergie, Polarität und Ladungsdichte) abhängig. Ist die Analytkonzentration in Lösung geringer als die Konzentration der Überschlußladungen, so ist die Konzentration der gebildeten gasförmigen Analytionen proportional ihrer Konzentration in Lösung. Wenn die Analytkonzentration in Lösung größer ist als die Konzentration der Überschlußladungen, kann eine Sättigung auftreten. Dieser Zusammenhang konnte mittels des "Modells der Gleichgewichtsverteilung" von CONSTANTOPOULOS hergeleitet werden [280]. Die an die Kapillarspitze angelegte Spannung und der Fluß bestimmen folglich beim Elektrospray-Prozeß den Konzentrationsbereich, innerhalb dessen die Quantifizierung eines Analyten erfolgen kann.

Matrixeffekte werden durch Substanzen hervorgerufen, die entweder in der Probe vorhanden sind oder der Probe zur Analyse zugegeben werden. Zwei Arten von Matrixeffekten können unterschieden werden: Zum einen diejenigen, die zu einer Unterdrückung des Signals führen und zum anderen diejenigen, die Adduktionen mit dem Analyt bilden. Beide Effekte erschweren die Quantifizierung. Für die Unterdrückung des Signals kann man sich bei Elektrospray-Ionisation mehrere Mechanismen vorstellen. Die Wirkung von oberflächenaktiven Substanzen (Detergenzien) wurde bereits beschrieben. Sie reichern sich an der Oberfläche von Mikrotröpfchen an und hindern die Analytmoleküle an den Ort der Ionenbildung zu gelangen. Oberflächenaktive Substanzen können bei biologischen Proben aus den Membranteilen des Zell-Lysats stammen. Ein anderer Mechanismus liegt bei dem Vorhandensein von Ionenpaarreagenzien vor. Diese können durch Ionenpaarbildung die Analytionen neutralisieren, so daß sie in den angelegten elektrischen Feldern nicht mehr beschleunigt werden. Da bei den chromatographischen Methoden an Umkehrphasen die Ionenbildung nicht erwünscht ist, werden oft Ionenpaarreagenzien wie z. B. Trifluoressigsäure dem Laufmittel zugesetzt. Diese stellen ein Kompatibilitätsproblem zwischen Chromatographie und Massenspektrometrie dar. Ein Lösungsansatz ist die Verwendung von Säulen, die möglichst wenig Restsilanolgruppen enthalten, mit denen Ionen wechselwirken können. Dadurch kann die Menge des Ionenpaarreagenzes minimiert werden. Signaleinbußen sind jedoch auch bei geringen Konzentrationen von Trifluoressigsäure (TFA) noch zu beobachten und mindern die Empfindlichkeit des Analytnachweises. Werden hohe Empfindlichkeiten gefordert, so muß auf Ionenpaarreagenzien verzichtet werden und statt dessen andere organische Säuren, wie Ameisensäure, verwendet werden.

Die Wirkung von anorganischen Puffersalzen auf die Ausbeute der Analytione ist komplex und von CONSTANTOPOULOS et al. untersucht worden [280]. Einerseits konkurrieren die anorganischen Ionen mit den Analytione um die Überschlußladungen und vermindern dadurch deren Ausbeute. Andererseits erhöhen Salze die Ionenstärke in der Lösung. Wird die Ladungsverteilung der Überschlußladungen analog zu der Ausbildung von Doppelschichten an Grenzflächen bei Elektrodenvorgängen betrachtet, so ist die Dicke der diffusen Grenzschicht abhängig von der Ionenstärke der Lösung. Durch Erhöhung der Ionenstärke vermindert sich diese Dicke und alle Überschlußladungen können an die Oberfläche des Tröpfchens gelangen (vgl. Abb. 17). Dadurch kann es zu einer experimentell nachgewiesenen Zunahme der Ausbeute an Analytione bei Erhöhung der Salzkonzentration kommen.

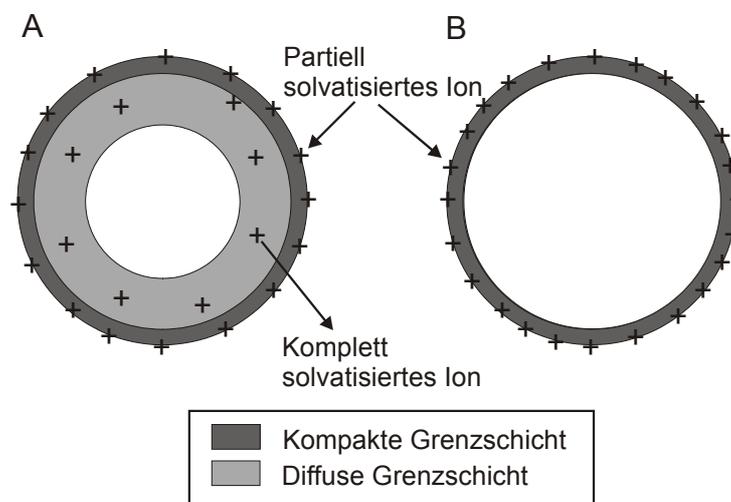


Abb. 17: Effekt der Ionenstärke auf eine elektrische Doppelschicht bei gleicher Anzahl von Überschlußladungen nach CONSTANTOPOULOS [280]. Die Überschlußladungen sind in der diffusen und der kompakten Grenzschicht verteilt. **A:** Niedrige Ionenstärke führt zu einer breiteren diffusen Grenzschicht und weniger Überschlußladungen befinden sich an der Oberfläche des Tröpfchens. **B:** Hohe Ionenstärke führt zu einer schmalen diffusen Grenzschicht und alle Überschlußladungen befinden sich an der Oberfläche des Tröpfchens.

Bei sehr hohen Salzkonzentrationen kann es zu einer verstärkten Abstoßung der Tröpfchen innerhalb des Elektrosprays kommen, was eine Erweiterung des Spraykegels zur Folge hat und die Dichte der Ionen, die in die Einlaßöffnung des Massenspektrometers gelangen, vermindert. Zusätzlich können die anorganischen Salze auskristallisieren und Analytione irreversibel einschließen.

Neben den Effekten auf die Ausbeute der Analytione, können anorganische Salze auch zur Adduktionenbildung durch Ersatz eines sauren Protons oder durch Chelatisierung beitragen. Adduktionenbildung ist vornehmlich im positiven Ionenmodus zu beobachten und erschwert die Quantifizierung, da das Signal mehrerer Ionenspezies berücksichtigt werden muß und eine Kalibrierung der Adduktionen schwierig ist. Chromatographische Verfahren sollten infolgedessen nicht mit anorganischen Puffern durchgeführt werden, wenn eine massenspektrometrische Detektion geplant ist.

In komplexen Umweltproben ist die Identität der Matrixkomponenten meist nicht bekannt. Deshalb können ihre Auswirkungen nicht mechanistisch erklärt werden. In diesen Fällen wird oft mit internen Standards gearbeitet, die die Quantifizierung zwar wesentlich verbessern, jedoch die Matrixsuppression nicht verhindern. CHOI und Mitarbeiter untersuchten die Suppressionseffekte durch Analyse von Pestiziden in komplexen Umweltmatrices mittels LC-MS [281]. Sie kamen zu dem Schluß, daß Matrixkomponenten, die polarer als die Analyten sind und vor ihnen eluieren, die stärkste Signalunterdrückung hervorrufen. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Additive im Laufmittel die Matrixsuppression unterdrücken können. Ameisensäure, Ammoniumformiat und Ammoniumhydroxid erwiesen sich als sehr geeignet zur Angleichung des Signals mit und ohne Matrix, während reine Wasser-Acetonitril-Mischungen drastische Unterschiede des Signals mit und ohne Matrixsubstanzen zeigten. Allerdings wurde die Angleichung der Signale mit und ohne Matrix nicht durch eine Signal-erhöhung bei Vorhandensein der Matrix, sondern durch Erniedrigung des Signals ohne Matrix erreicht. Die verwendeten Additive wirkten folglich selber als Signalunterdrücker. CHOI et al. kommen jedoch zu dem Schluß, daß Matrixsuppression in der Chromatographie ein Problem der Überladung der Säule mit Matrixsubstanzen ist und nicht des Vorhandenseins von sehr vielen Einzelsubstanzen, die den gesamten Polaritätsbereich abdecken. Sie empfehlen deshalb, Signalunterdrückung durch LC-LC-Kopplungen zu vermeiden.

4.4.3 Sequenzierung von Peptiden mittels Massenspektrometrie

Anhand von Fragmentationen können die Peptidsequenzen mittels Massenspektrometrie aufgeklärt werden. Fragmentierung kann durch Stoßaktivierung oder durch Erhöhung von Beschleunigungs- bzw. Ionisierungsspannungen geschehen. Für lineare Peptide ist die Aufklärung der Sequenz vergleichsweise einfach. Die Fragmentierung tritt hauptsächlich entlang der Peptidkette auf und kann dabei vor dem Carbonylkohlenstoff der Amidbindung, in der Amidbindung und nach dem Amid-Stickstoff der Amidbindung auftreten. Je nachdem, ob der Bindungsbruch vom C-terminalen oder vom N-terminalen Ende her erfolgt, werden die Fragmente entweder als A, B, C oder X, Y, Z bezeichnet (s. Abb. 18). Zusätzlich mit dem Bindungsbruch übertragene Wasserstoffatome werden durch Striche (C' oder C'' Fragmente) symbolisiert. Tiefgestellte Indizes geben die Zahl der im Fragment enthaltenen Aminosäuren an, also z. B. "X₃"-Fragment in Abb. 18. Diese Nomenklatur ist von ROEPSTORFF und FOHLMANN [282] eingeführt worden. Da meist die Amidbindung bricht, sind die B- und Y-Ionenserien die am häufigsten entstehenden Fragmente.

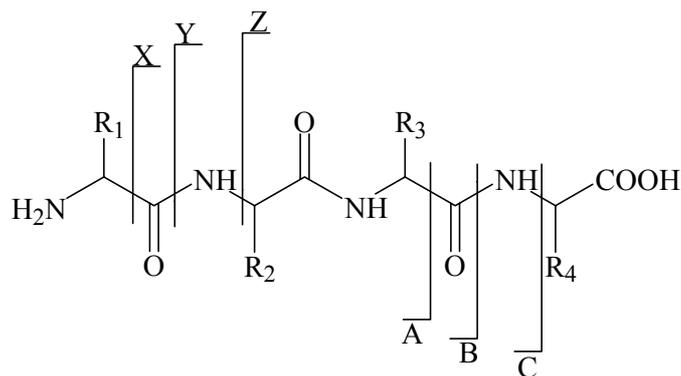


Abb. 18: Nomenklatur der Fragmente, die bei Fragmentierung von linearen Peptiden im Massenspektrum auftreten können, nach ROEPSTORFF und FOHLMANN [282].

Viel schwierigere Verhältnisse liegen bei cyclischen Peptiden vor. Hier kann nicht zwischen N-terminalem und C-terminalem Ende unterschieden werden. Oft ist auch eine viel höhere Aktivierungsenergie notwendig, um den Ring zu spalten. Allerdings kann die Massenspektrometrie gerade bei diesen Peptiden wertvolle Hilfestellung bei der Strukturaufklärung leisten, da diese Peptide dem EDMAN-Abbau nicht zugänglich sind.

Prinzipiell kann die Ringöffnung an jeder Amidbindung erfolgen. Ein cyclisches Pentapeptid kann somit fünf isobare Ringöffnungsprodukte liefern, wie in Abb. 19 dargestellt. Erst die Fragmente dieser Ringöffnungsprodukte haben unterschiedliche Massen und ihre Sequenz läßt sich aufklären.

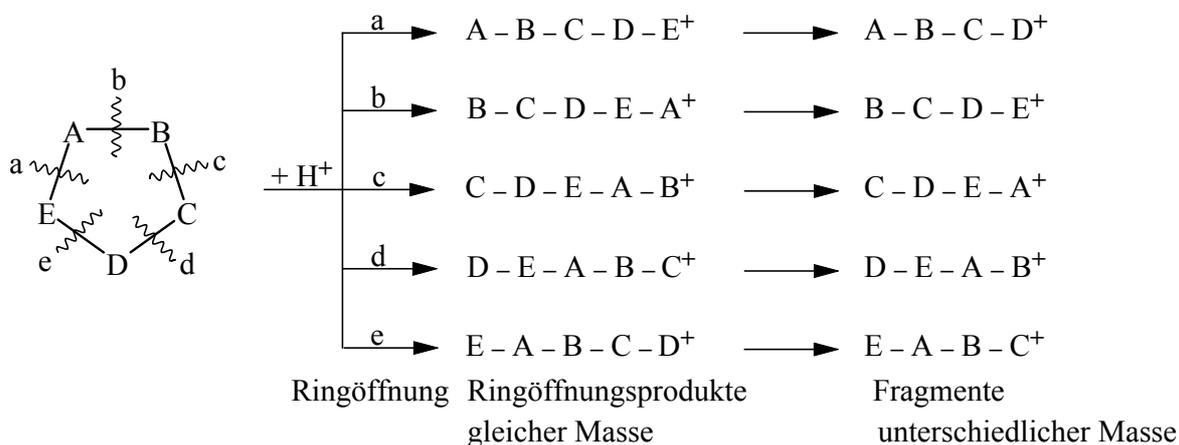


Abb. 19: Möglichkeiten der Ringöffnung bei einem cyclischen Pentapeptid nach [283].

Allerdings kann auf die Weise nicht zwischen Sequenz und retro-Sequenz (z. B. c[A-B-C-D-E] und c[E-D-C-B-A]) unterschieden werden. D. h., man kann nicht erkennen, ob bei der Amidbindung zwischen A und B die Aminogruppe von A oder von B stammt. Dies wird nur möglich, wenn bestimmte Fragmente im Spektrum auftreten, die nicht zur B- oder Y-Serie gehören [283].

Zwei Möglichkeiten der Ringöffnung wurden von ECKART beschrieben [283]. Zunächst erfolgt in beiden Fällen die Protonierung eines Amidstickstoffes. Anschließend kann entweder die Bindung vor dem Carbonylkohlenstoff geöffnet werden (Abb. 20, links) oder die Amidbindung des protonierten Amidstickstoffs (Abb. 20, rechts). Es entsteht entweder ein Immoniumion oder ein Acyliumion. Acyliumionen und Immoniumionen können wechselseitig durch CO-Abspaltung oder Abspaltung eines neutralen Aminosäurerestes ineinander übergehen.

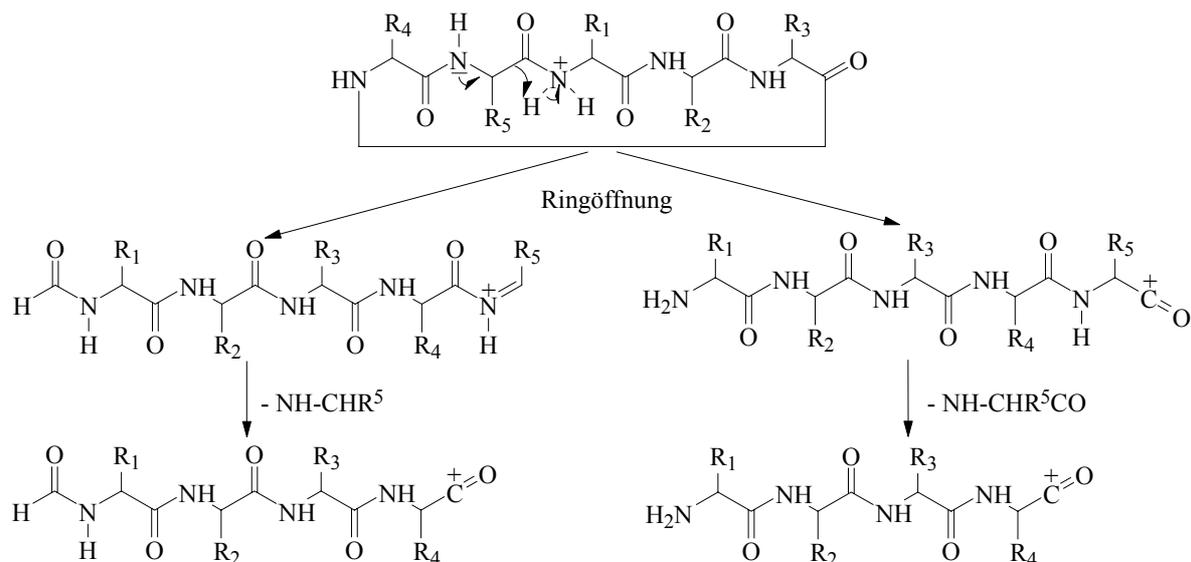


Abb. 20: Möglichkeiten der Ringöffnung von cyclischen Peptiden in der Massenspektrometrie.

Im negativen Ionenmodus sind Ringöffnungsmechanismen in der Massenspektrometrie bisher nicht beschrieben worden. Um die Aufklärung der Fragmentationsspektren eines cyclischen Peptids zu erleichtern, wurden Computerprogramme entwickelt, die allerdings oft als Vorinformation die Aminosäurezusammensetzung des Peptids benötigen und dann alle möglichen Fragmente berechnen und mit den gemessenen Daten vergleichen. Eine andere Möglichkeit, die bei Microcystinen zur Strukturaufklärung angewandt wurde, ist die gezielte chemische Ringöffnung an einer Position [64] und anschließende massenspektrometrische Analyse.

Die Strukturaufklärung mittels Fragmentationanalyse ist bei Peptiden und insbesondere bei cyclischen Peptiden folglich komplizierter als oft angenommen wird. Die Aufklärung von Stereozentren oder geometrischen Isomeren von Doppelbindungen ist nur nach Derivatisierung der Aminosäuren und vorherige chromatographische Trennung möglich [284]. Für die Strukturaufklärung sind deshalb ein- und zweidimensionale NMR-Messungen unentbehrlich, trotz des Nachteils, daß die NMR-Methode recht unempfindlich ist und daher große Substanzmengen erfordert.

5 Immunologische Detektion in der Chromatographie

Kopplungen analytischer Verfahren werden schon lange angewendet und sind vor allem dann nützlich, wenn die Methoden komplementär (*orthogonal*) zueinander sind. Die Kopplung von Flüssig- und Gaschromatographie mit Massenspektrometrie sind solche Beispiele, jedoch auch LC-LC- oder GC-GC-Kopplungen werden zur Reduktion der Matrix komplexer Proben oder der Peaks im Chromatogramm eingesetzt. Immunologische oder andere bioanalytische Verfahren haben sich in Kombination mit chromatographische Verfahren ebenfalls bewährt. Diese sogenannten *immunchromatographischen* Methoden verbinden zwei weitgehend komplementäre Verfahren. Immunoassays sind schnell, billig und hochempfindlich. Allerdings sind sie keine Trennverfahren und eine Unterscheidung mehrerer Kreuzreaktanden ist sehr schwierig. Als quantitatives Ergebnis wird ein Summenparameter erhalten, der die Kreuzreaktionen der einzelnen Komponenten beinhaltet. Die Standardchromatographie ermöglicht hingegen als Trennverfahren eine Quantifizierung von Einzelsubstanzen. Nachteilig bei dieser Methode ist die oft zu unempfindliche Detektion. Im Gegensatz zu immunologischen Methoden, wo die Proben oft noch verdünnt werden können, ist bei chromatographischen Verfahren meist eine Aufkonzentrierung und Aufreinigung erforderlich. Dies verlängert die Analysenzeiten und birgt die Gefahr zusätzlicher Fehlerquellen. Außerdem sind die meist verwendeten Detektionsverfahren (UV- bzw. Fluoreszenzdetektion) in der Regel nicht substanzspezifisch, so daß die Identität von Peaks in weiteren Schritten überprüft werden muß.

Kopplungen können entweder sequentiell (off-line) oder direkt hintereinander (on-line) erfolgen. Immunchromatographische Techniken können nach WELLER [285] weiterhin eingeteilt werden in Vorsäulen-Techniken, wie zum Beispiel die Immunaффinitätsextraktion (IAE), wo Antikörper zum Aufreinigen und Aufkonzentrieren der Probe eingesetzt werden und Nachsäulen-Techniken, wie z. B. die immunchemischen Detektoren (ICD), die Antikörper im Immunoassayformat einsetzen. Die Immunaффinitätsextraktion eignet sich besonders für die gruppenselektive Probenaufbereitung. Einen aktuellen Überblick dieser Methode liefert DELAUNAY-BERTONCINI und HENNION in [286]. Kreuzreaktionen werden hier dadurch ausgeglichen, daß der im Säulenmaterial immobilisierte Antikörper im Überschuß gegenüber dem Analyt vorliegt und somit auch Substanzen mit geringerer Kreuzreaktion bindet. Trotzdem muß eine relativ breite Erkennung durch den Antikörper gewährleistet sein, wenn eine komplette Substanzklasse untersucht werden soll. Weiterhin muß die Antigen-Antikörper-Bindung reversibel sein, d. h. die Affinität des Antigens zu dem Antikörper muß unter bestimmten Bedingungen niedrig sein. Vorteilhaft wäre es, wenn der Antikörper unter den Elutionsbedingungen reversiblen Strukturänderungen unterliegt, da die in den Säulen eingesetzten Antikörpermengen hoch sind und eine einmalige Verwendung der Säulen die Methode sehr verteuert. Bei on-line-Kopplungen sollten die Elutionsbedingungen von der Immunaффinitätssäule ein Retardieren der Analyten auf der Trennsäule gewährleisten. Der hohe Verbrauch von Antikörpern und der hohe Optimierungsaufwand stellen Nachteile der Vorsäulen-Kopplung von immunologischen Verfahren dar.

Immunchemische Detektoren in der Chromatographie gehören zu den neueren Entwicklungen. Der Durchbruch dieser Verfahren beruht auf der wenig matrixabhängigen, sehr

empfindlichen Identifizierungs- und Quantifizierungsmöglichkeit von Analyten in komplexen Mischungen. Die Kopplung kann nicht nur im umweltanalytischen, sondern auch im medizinischen Bereich oder zum Wirkstoffscreening von Naturstoffen eingesetzt werden. Sie ist keineswegs nur für Immunoassays geeignet, sondern läßt mit allen Ligand-Rezeptor-Assays durchführen. Frühe Arbeiten wurden im biomedizinischen Bereich zum Nachweis von Steroiden wie Digoxin [287, 288], 19-Nortestosteron [289, 290] oder Eicosanoiden [291] durchgeführt. In der Lebensmittelchemie wurde die Kopplung zum Nachweis von Mycotoxinen eingesetzt [292, 293]. Die Kopplung der beiden Methoden erfolgte meist off-line durch manuelle Fraktionensammlung, Verdampfung des Lösungsmittels und Aufnahme der Fraktionen in einem geeigneten Puffer. Im Bereich der Umweltanalytik wurde eine HPLC-ELISA-Kopplung erstmals von KRÄMER et al. für den Nachweis von Nitrophenolen eingesetzt [294]. Die Autoren führten eine isokratische HPLC-Trennung mit anschließender off-line-Kopplung des Immunoassays durch. Die HPLC-Fraktionen wurden lediglich neutralisiert, jedoch nicht eingedampft oder verdünnt. Zur Quantifizierung mußten deshalb Kalibrierlösungen der gleichen Lösungsmittelzusammensetzung verwendet werden. Gradientenelutionen sind mit dieser Methode nur sehr kompliziert durchzuführen.

Grundsätzlich ist es nicht notwendig, die HPLC-Fraktionen einzudampfen oder isokratische HPLC zu betreiben und entsprechende Kalibrierlösungen zu verwenden, sondern eine Verdünnung der Fraktionen in einem geeigneten Puffer ist ausreichend. Die Verdünnung der Fraktionen mit Puffer neutralisiert saure Laufmittel, reduziert den Anteil an organischem Lösungsmittel und dient zur Überführung der Analytkonzentration in den Meßbereich des Immunoassays.

Jüngere Bemühungen auf diesem Arbeitsgebiet konzentrieren sich auf die Nachsäulen-online-Kopplung von Ligand-Rezeptor-Assays in der HPLC [295-299]. Bei on-line-Kopplungen muß nach einer Inkubationszeit die freie von der gebundenen Markerkomponente (markierter Antikörper oder markiertes Hapten) getrennt werden. Wird mit markierten Antikörpern gearbeitet, so kann dies mit Hilfe einer nachgeschalteten Säule, die immobilisierte Antigene enthält, erfolgen. Freie Antikörper werden auf der Säule gebunden und tragen nicht zu dem Signal am Ausgang der Säule bei [300]. Wird mit markierten Analyten gearbeitet, so können die freien Marker von den Antikörper-Marker-Komplexen mittels RAM-Phasen (restricted access materials) getrennt werden. Diese Phasen ähneln im Prinzip den Gelchromatographie-materialien und ermöglichen ein Eindringen von kleinen Molekülen in die Poren der Partikel, während große Moleküle (Antikörper) ausgeschlossen werden und früh eluieren. Eine weitere Trennmöglichkeit besteht in dem Einsatz von porösen Hohlfasern, die den freien vom gebundenen Analytmarker ebenfalls aufgrund der Größe trennen. Neuerdings wurde von GRAEFE et al. eine Methode vorgestellt, die ohne Trennung von freiem und gebundenem Marker auskommt [301]. Bei dieser Methode wird das Phänomen des Fluoreszenz-Energietransfers ausgenutzt, um freien von gebundenem Marker selektiv nachzuweisen.

On-line-Kopplungen immunchemischer Detektoren an die Chromatographie können auch mit markierungsfreien Methoden durchgeführt werden [285]. Ein Beispiel hierfür wäre die Anwendung des Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Sensors zur Detektion. Diese Sensoren haben jedoch oft Probleme mit veränderlichen Brechungsindices oder pH-Werten, wie sie bei Gradiententrennungen auftreten.

Prinzipiell ist eine immunchemische Detektion nicht nur bei chromatographischen, sondern auch bei anderen Trennverfahren möglich. Ein Beispiel wäre hier die Detektion einer kapillarelektrophoretischen Trennung. Gerade diese Methode hat unter geringer Nachweisempfindlichkeit zu leiden, da aufgrund des Kapillardurchmessers die Weglänge, die für Lichtabsorption zur Verfügung steht, gering ist. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß dieses Gebiet vielversprechende Möglichkeiten zur Verbesserung des Nachweises von Einzelsubstanzen in komplexen Mischungen bietet. Möglichkeiten, wie die Kopplung an andere (außer chromatographischen) Trennverfahren oder die mehrdimensionale, parallele Detektion mit verschiedenen biochemischen Rezeptoren sind bisher wenig untersucht worden. Zu den bisher bestehenden Verfahren gibt es Übersichtsarbeiten jüngerer Datums von FISHMAN et al. [302], SHAHDEO et al. [303], HAGE [304, 305] und WELLER [285].

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1 HPLC mit UV-Detektion

HPLC an Umkehrphasen mit UV-Detektion gehört zu den Standardverfahren zum Nachweis von Microcystinen. Aus diesem Grund wurde zunächst eine HPLC-Methode etabliert, mit der alle kommerziell erhältlichen Microcystine sowie die Microcystinkomponente Adda getrennt werden können. Adda bestimmt nicht nur maßgeblich die hydrophoben Eigenschaften der Microcystine, sondern liefert auch das wichtigste Chromophor, die all-*trans*-konjugierte Doppelbindung.

1.1 Microcystine und ihre UV-Absorption

Das Absorptionsmaximum von Microcystinen, die keine aromatischen Aminosäuren außer Adda enthalten, liegt bei 238 nm. Der molare Extinktionskoeffizient für Microcystin-LR und Microcystin-RR in Methanol beträgt nach HARADA und Mitarbeitern $39\,800\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ [105]. Abb. 21 zeigt einen Vergleich der Absorptionsspektren von Microcystin-LR und Adda. Bei höheren Wellenlängen als 275 nm ist die Absorption sehr niedrig. Hingegen ist die Absorptionsbande der konjugierten Doppelbindung sehr breit und umfaßt ca. 40 nm. Diese Bande beinhaltet auch die Absorption des Phenylrestes, dessen Maximum bei 257 nm liegt.

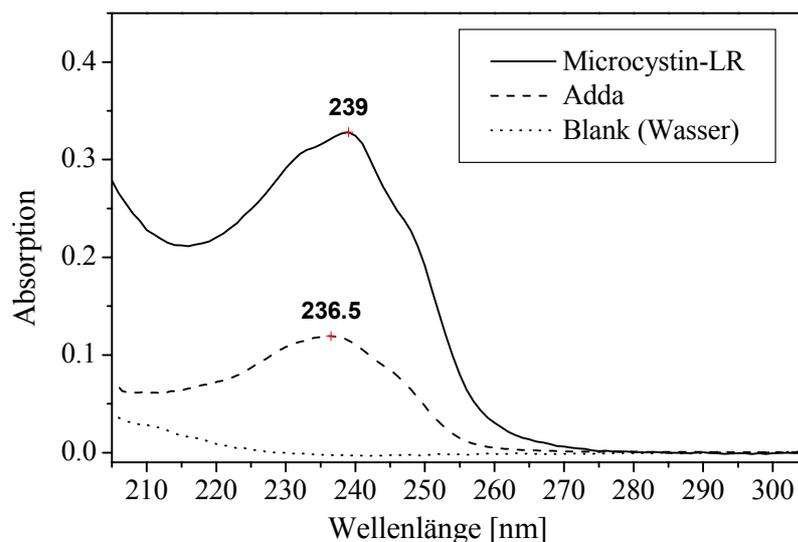


Abb. 21: Vergleich der Absorptionsspektren von Microcystin-LR und Adda.

Veränderungen in der Konformation einer Doppelbindung der Adda-Seitenkette haben eine Verschiebung der Absorptionsmaximums zur Folge. Die Absorptionsmaxima des 6(Z)-Adda-Isomeren von Microcystin-LR und -RR liegen bei 242 nm und haben niedrigere molare Extinktionskoeffizienten (21 900 für Microcystin-LR und 30 200 für Microcystin-RR [105]). Eine Isomerisierung der konjugierten Doppelbindung, die beispielsweise mittels Massenspektrometrie nicht detektiert wird, kann folglich anhand des Absorptionsspektrums nachgewiesen werden.

Die Spektren anderer Microcystine, die keine zusätzlichen aromatischen Aminosäuren enthalten, sehen demjenigen von Microcystin-LR sehr ähnlich und werden hier nicht gesondert dargestellt. Microcystine, die zusätzliche aromatische Aminosäuren an den variablen Positionen 2 oder 4 enthalten, weisen je nach Aminosäure zusätzliche Maxima auf. Da der Extinktionskoeffizient von Microcystin-LR bei 238 nm oft zum Quantifizieren der Microcystine in der Chromatographie dient, ist es wichtig, abzuschätzen, welche Auswirkungen zusätzliche aromatische Aminosäuren haben. Phenylalanin (F), Tyrosin (Y) und Tryptophan (W) treten als aromatische Aminosäurekomponenten der Microcystine auf. Abb. 22 zeigt die Absorptionsspektren äquimolarer Mengen von Microcystin-LF und Phenylalanin (F).

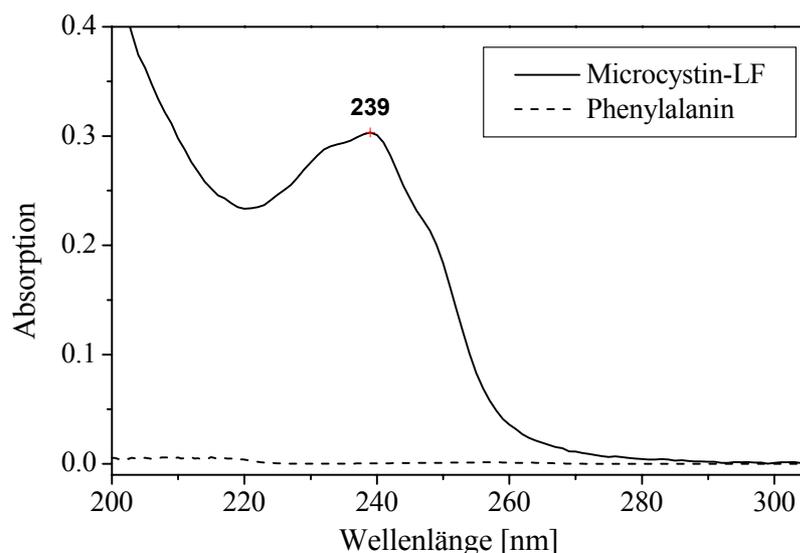


Abb. 22: Absorptionsspektren von äquimolaren Mengen Microcystin-LF bzw. Phenylalanin (F).

Der molare Extinktionskoeffizient (ϵ_{molar}) von Phenylalanin bei 238 nm beträgt $63 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ und stellt damit 0,16 % des molaren Extinktionskoeffizienten des Microcystins bei dieser Wellenlänge dar. Phenylalanin besitzt bei 257,5 nm ein Maximum ($\epsilon_{\text{molar}} = 200 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) und bei 231 nm ein Minimum der Absorption. Es kann folglich davon ausgegangen werden, daß der Fehler der Quantifizierung von Microcystin-LF bei Verwendung des Extinktionskoeffizienten von Microcystin-LR vernachlässigbar gering ist.

Ein Beispiel für ein tyrosinhaltiges Microcystin ist in Abb. 23 dargestellt. Zwei Veränderungen des Microcystinspektrums sind hier zu beobachten: Zum einen die Schulter bei 275 nm, die dem Absorptionsmaximum von Tyrosin entspricht (molarer Extinktions-

koeffizient $\epsilon_{\text{molar}} = 1\,420\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$ bei 274.6 nm [306]) und zum anderen das breite Absorptionsmaximum zwischen 230 und 240 nm. Letzteres beruht auf dem steilen Anstieg der Absorption des Tyrosins unterhalb von 245.5 nm ($\epsilon_{\text{molar}} = 229\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$). Bei 238 nm beträgt der molare Extinktionskoeffizient von Tyrosin $563\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$ und stellt damit 1.4 % der Microcystinabsorption dar. Auch dieser Fehler ist sehr gering und meist gegenüber anderen Fehlern zu vernachlässigen. Bei 231 nm beträgt der molare Extinktionskoeffizient von Tyrosin jedoch schon $3\,396\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$ und damit 8.5 % der molaren Absorption des Microcystins bei 238 nm. Dies erklärt das breite Plateau der Absorption von tyrosinhaltigen Microcystinen im Bereich von 230 bis 240 nm.

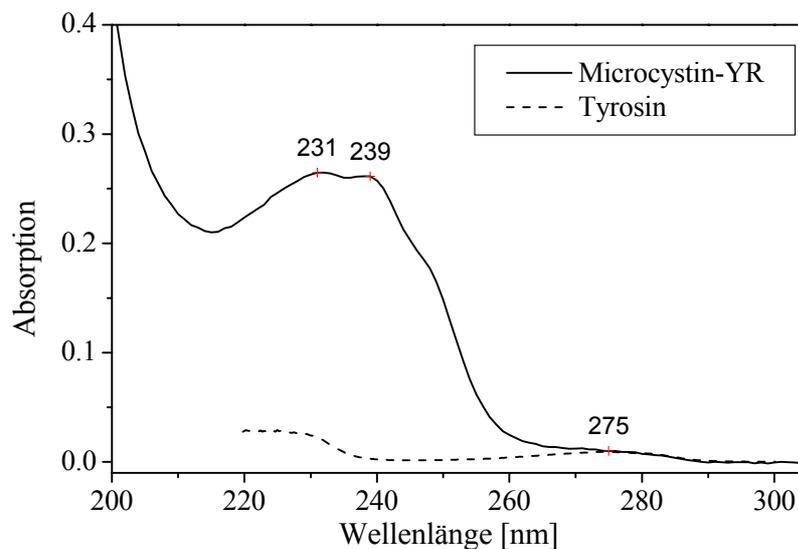


Abb. 23: Absorptionsspektren von äquimolaren Mengen Microcystin-YR bzw. Tyrosin (Y).

Die Schulter bei 275 nm und das breite Plateau zwischen 230 und 240 nm können als Indiz zur Identifizierung tyrosinhaltiger Microcystine dienen, wenn ein Photodiodenarray-Detektor der chromatographischen Trennung zur Verfügung steht. Die Detektion bei 275 nm ist allerdings keine empfindliche Nachweismethode, da der molare Extinktionskoeffizient sehr niedrig ist. Das Absorptionsspektrum eines weiteren untersuchten tyrosinhaltigen Microcystins (Microcystin-LY) sieht demjenigen von Microcystin-YR sehr ähnlich.

Von den aromatischen Aminosäuren besitzt Tryptophan aufgrund seiner Indol-Seitenkette die ausgeprägteste Absorption im UV-Bereich. Das Maximum der Absorption liegt bei 278.5 nm ($\epsilon_{\text{molar}} = 5\,600\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$), das Minimum bei 240.5 nm. Zu niedrigeren Wellenlängen hin erfolgt ein steiler Anstieg, der dazu führt, daß die Absorption der tryptophanhaltigen Microcystine bei 238 nm nur noch ein lokales Maximum oder eine Schulter darstellt (vgl. Abb. 24).

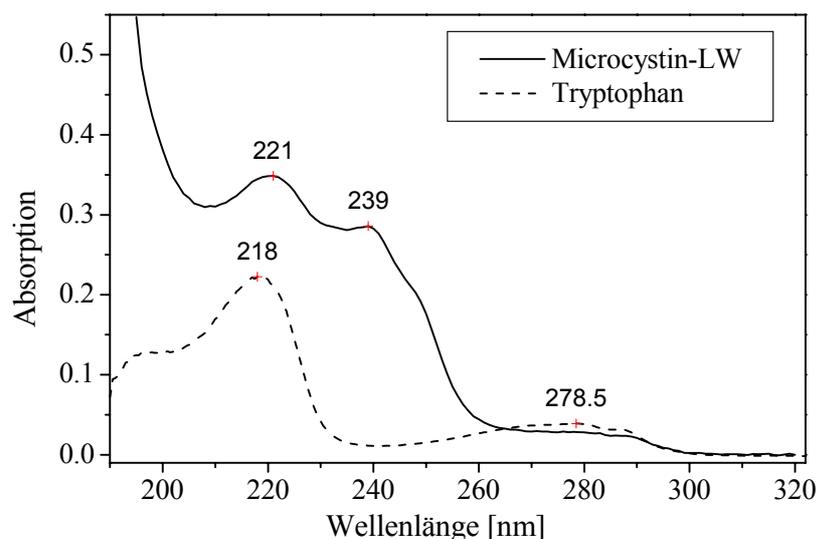


Abb. 24: Absorptionsspektren von äquimolaren Mengen Microcystin-LW bzw. Tryptophan (W).

Bei 238 nm beträgt der molare Extinktionskoeffizient von Tryptophan $1\,697\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ und stellt damit 4.2 % der Microcystinabsorption dar. Wird diese zusätzliche Absorption des Tryptophans nicht bei der Quantifizierung berücksichtigt, so kommt es zu einer Überbestimmung tryptophanhaltiger Microcystine. Diese können jedoch leicht anhand ihres charakteristischen Absorptionsmaximums bei 221 nm identifiziert werden. Bei 218 nm, dem Absorptionsmaximum von Tryptophan beträgt der molare Extinktionskoeffizient $31\,906\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ und ist damit ähnlich hoch wie das Absorptionsmaximum der Microcystine bei 238 nm.

1.2 Optimierung des Laufmittelgradienten

Microcystine besitzen wie viele Peptide sowohl saure als auch basische Gruppen. Da bei der Chromatographie an Umkehrphasen geladene Analyten aufgrund ihrer besseren Löslichkeit in dem wässrigen Laufmittel und ihrer Wechselwirkung mit Restsilanolgruppen der Festphase eine schlechte Trenneffizienz aufweisen, werden häufig saure Ionenpaarreagenzien, z. B. perfluorierte organische Säuren, dem Laufmittel zugesetzt. In dieser Arbeit wurde Trifluoressigsäure (TFA) als Laufmitteladditiv verwendet. TFA besitzt eine hohe UV-Durchlässigkeit und kann als flüchtiger Zusatzstoff aus HPLC-Fractionen durch Verdampfen des Lösungsmittels entfernt werden. Zur Elution wurde ein Wasser/Acetonitril-Gradient eingesetzt. Problematisch bei der Verwendung von TFA als Additiv sind die unterschiedlichen Absorptionsspektren in Wasser und Acetonitril, wie Abb. 25 zeigt. Zwei Elektronenübergänge sind für die Absorption von TFA verantwortlich: Zum einen der Übergang von Elektronen des freien Elektronenpaars (n) in das angeregte π^* -Orbital bei 216 nm und zum anderen der Übergang der π -Elektronen nach π^* . Das Absorptionsmaximum und die Intensität des letzteren ist von der Delokalisierung der π -Elektronen abhängig.

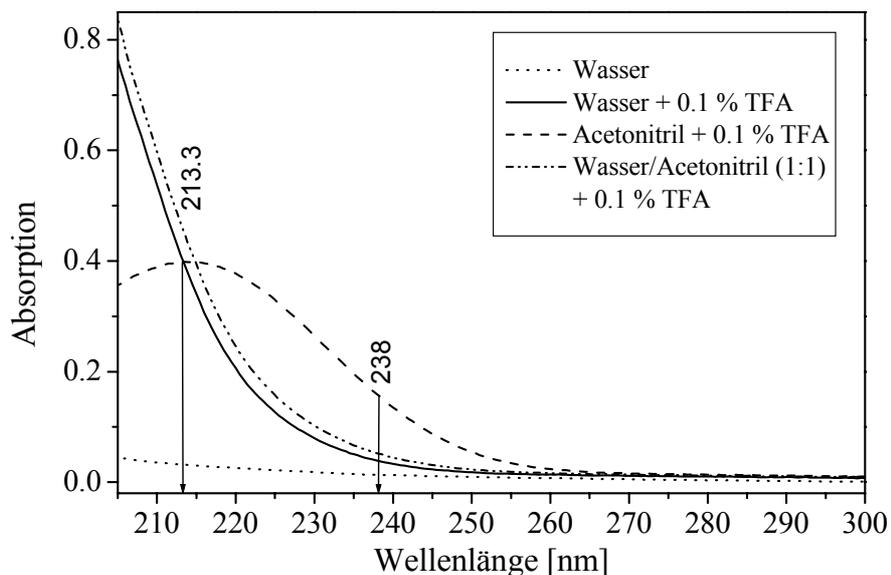


Abb. 25: Absorptionsspektren von 0.1 % TFA in Wasser bzw. Acetonitril und in einer 1:1-Mischung aus Wasser und Acetonitril.

Blank: Luft; Detektionswellenlänge für Microcystine: 238 nm; isosbestischer Punkt: 213.3 nm.

Der Übergang vom "wäßrigen" Spektrum der deprotonierten Spezies zum "organischen" Spektrum der protonierten Spezies ist nicht kontinuierlich, da TFA als starke Säure selbst bei geringen wäßrigen Anteilen hochgradig dissoziiert vorliegt. Abb. 25 zeigt, daß das Spektrum von TFA in einer Mischung aus gleichen Anteilen Wasser und Acetonitril, sich sehr ähnlich zu demjenigen von TFA in reinem Wasser verhält und keinesfalls durch Linearkombination des wäßrigen und des organischen Spektrums erklärt werden kann. Für Gradientenelutionen bedeutet dies, daß die Grundlinie bei Detektionswellenlängen größer 214 nm ab einer kritischen Acetonitrilkonzentration stark ansteigt, während sie bei Detektionswellenlängen kleiner 214 nm zunächst ansteigt und dann drastisch abfällt. Beim isosbestischen Punkt sollte die Basislinie flach bleiben. Der isosbestische Punkt liegt in Abb. 25 bei 213.3 nm und ist damit vergleichbar zu dem in der Literatur bekannten Wert von 215 nm [107]. Allerdings wurde auch bei dieser Wellenlänge eine schwache Basisliniendrift von WINKLER beobachtet, die auf TFA-Dimer-Bildung zurückgeführt wurde.

Bei 238 nm, der Detektionswellenlänge der Microcystine, unterscheidet sich das wäßrige und das organische Spektrum sehr deutlich. Während noch kein Anstieg der Absorption im wäßrigen Spektrum zu beobachten ist, zeigt das organische Spektrum einen deutlichen Anstieg. Hingegen zeigt das Absorptionsspektrum der Microcystine bei 215 nm, dem isosbestischen Punkt von TFA in Wasser und Acetonitril, ein Minimum. Eine Detektion der Microcystine bei dieser Wellenlänge würde die Nachweisempfindlichkeit der Microcystine um ca. ein Drittel erniedrigen und die Selektivität der Detektion stark reduzieren. Beide Wellenlängen sind folglich nicht optimal für die Verwendung von TFA-Lösungsmittelgradienten zur Detektion von Microcystinen.

Eine Möglichkeit, die Basisliniendrift bei Gradientenelutionen auszugleichen, ist die Verwendung von unterschiedlichen TFA-Konzentrationen im wäßrigen bzw. organischen Laufmittel. Da eine theoretische Vorhersage schwierig ist, müssen die Konzentrationen experimentell optimiert werden. Dabei kann das Retentionsverhalten der Microcystine berücksichtigt werden. Müssen z. B. die hydrophoben Microcystine (Microcystin-LF und -LW) nicht in die Analysenmethode integriert werden, so sind die Auswirkungen der Basisliniendrift bei hohen Acetonitrilanteilen weniger störend. Die hier entwickelte Methode sollte jedoch auch die hydrophoben Microcystine einschließen, die im Falle von RP-C₁₈-Phasen bei ca. 62-68 % Acetonitril im Laufmittel eluieren. Die besten Ergebnisse wurden mit 0.1 % TFA in der wäßrigen Phase und 0.04 % TFA in der Acetonitrilphase erhalten. Die Basislinie verläuft bis zu Anteilen von 58 % Acetonitril flach und steigt dann mit zunehmender Acetonitrilkonzentration an.

1.3 Auswahl des Säulenmaterials

Zunächst wurde zur Trennung der Microcystine ein herkömmliches RP-C₁₈-Material verwendet. Die Chromatographie mit diesem Material ist sehr weit verbreitet, so daß eine Übertragung der Methode in andere analytische Laboratorien leicht möglich ist. Die optimierte Trennung von acht Toxinstandards ist in Abb. 26 zu sehen. Es ist auffallend, daß Adda fast zeitgleich mit Microcystin-LR eluiert. Dies läßt darauf schließen, daß die Wechselwirkung der Analyten mit der stationären Phase vornehmlich auf die hydrophobe Seitenkette des Adda zurückzuführen ist. Alle Microcystine, die das positiv geladene Arginin enthalten, haben sehr ähnliche Retentionszeiten. Erst das hydrophobere Microcystin-LA und die Tryptophan-(W)- und Phenylalanin-(F)-haltigen Microcystine haben wesentliche längere Retentionszeiten.

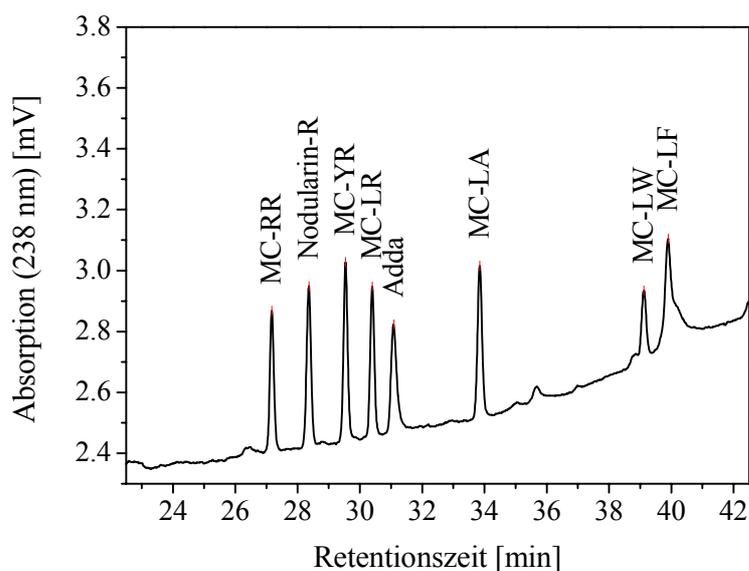


Abb. 26: UV-HPLC-Chromatogramm der z. Zt. kommerziell erhältlichen Toxinstandards inklusive der β -Aminosäure Adda an RP-C₁₈-Phasen.

Die verwendete Säule enthielt eine herkömmliche RP-C₁₈-Phase (Merck LiChrocart). Die Toxinstandards wurden in einer Konzentration von je 1 mg/L eingesetzt, wobei 20 μ L eingespritzt wurden, der Fluß war 1 mL/min und folgender Gradient wurde gefahren: 0 Minuten: 90 % A, 10 % B, 60 Minuten: 10 % A, 90 % B (A = Reinstwasser + 0.1 % TFA; B = Acetonitril + 0.04 % TFA). (MC = Microcystin).

Um eine bessere Trennung von Microcystin-LR und Adda zu erreichen, wurde eine etwas hydrophilere stationäre Phase eingesetzt (Abb. 27), die den Peptidring und die Seitenketten der Aminosäuren stärker berücksichtigt.

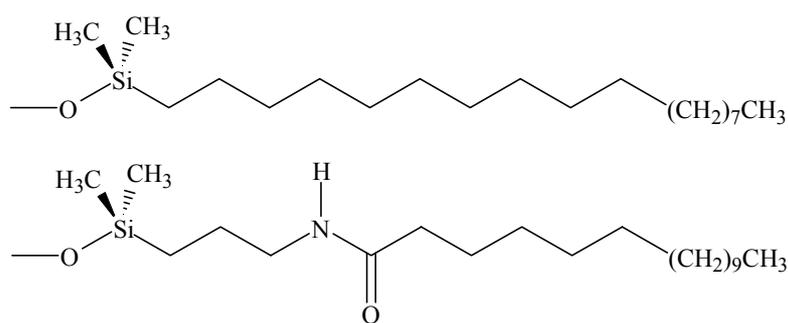


Abb. 27: Ligand der stationären Phase einer herkömmlichen C₁₈-Säule (oben) und der hydrophileren Amid-C₁₆-Säule (unten).

Das erst kürzlich kommerziell erhältliche Säulenmaterial ist aufgrund der Amidbindung polarer als herkömmliche stationäre Phasen. Da die Amidbindung einen partiellen Doppelbindungscharakter besitzt, bestehen auch Hoffnungen, daß mit diesem Material Doppelbindungsisomere getrennt werden können. Dies wäre insbesondere für die Trennung der wenig toxischen 6(Z)-Adda-Varianten der Microcystine interessant. Diese werden bisher nicht

chromatographisch getrennt und verfälschen somit die Ergebnisse der UV- und MS-Detektion. Wie Abb. 28 zeigt, lassen sich Adda und Microcystin-LR mit dieser Säule wesentlich besser trennen, was von Vorteil sein könnte, wenn Microcystinfragmente gemeinsam mit Microcystin-LR untersucht werden sollen. Die Retentionsreihenfolge von Adda und Microcystin-LR verhält sich umgekehrt zu derjenigen auf der RP-C₁₈-Phase.

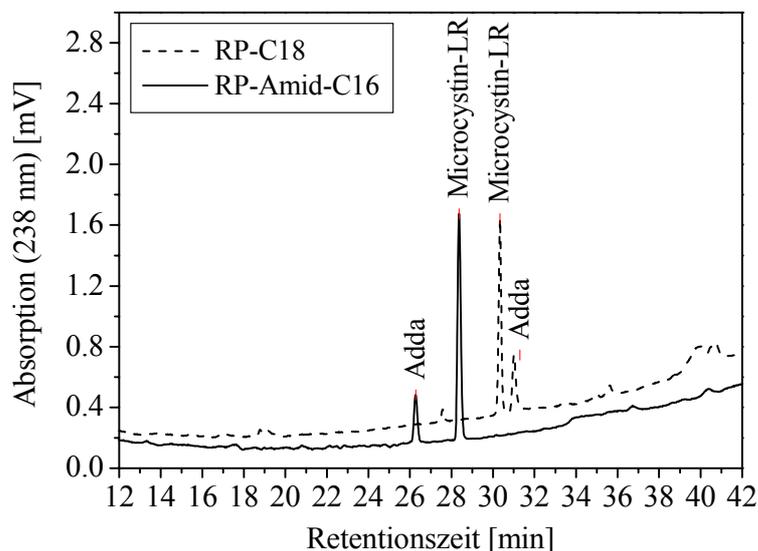


Abb. 28: Vergleich der UV-HPLC-Chromatogramme einer hydrophoben C₁₈-Phase und einer etwas hydrophileren Amid-C₁₆-Phase (Discovery RP Amid C16).

Die Konzentration von Adda ist 1 mg/L, die von Microcystin-LR 2.5 mg/L. Laufmittelgradient s. Abb. 26. Amid-C₁₆-Säule(250 x 4 mm).

Das Retentionsverhalten der übrigen Toxine verändert sich nicht, wie Abb. 29 zeigt.

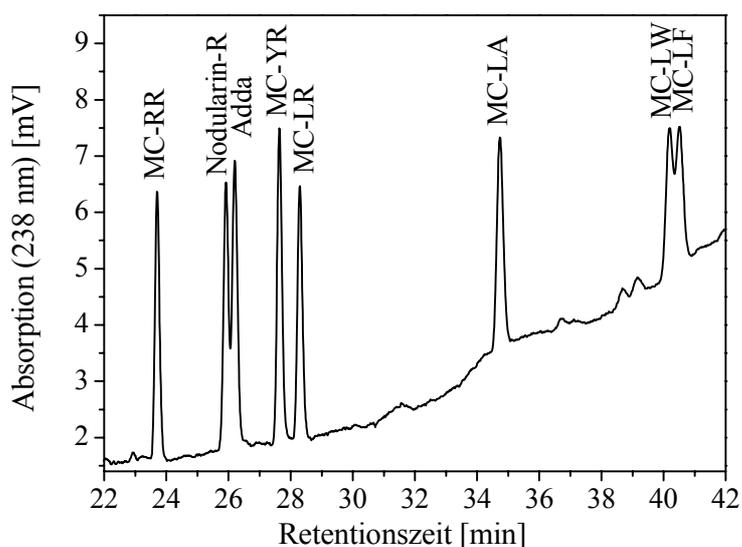


Abb. 29: UV-HPLC-Chromatogramm der z. Zt. kommerziell erhältlichen Toxinstandards inklusive der β -Aminosäure Adda an einer Amid-C₁₆-Phase. Verwendete Säule s. Bildunterschrift Abb. 28.

Allerdings werden mit diesem Säulenmaterial schlechtere Trennungen der hydrophoben Microcystine -LW und -LF erhalten. Auch das Peakpaar Nodularin/Adda ist hier nicht basisliniengetreunt. Angesichts dieser Ergebnisse kann keine der beiden Festphasen generell bevorzugt werden. Beide Festphasen haben ihre Vor- und Nachteile. Die Wahl der Festphase muß sich nach der jeweiligen analytischen Fragestellung richten. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangten SPOOF et al., die die Trennung von Microcystinen und Nodularin auf C₁₈- und Amid-C₁₆-Material untersuchten [307]. Sie untersuchten auch die desmethylierten Varianten von Microcystin-LR und -RR und fanden, daß diese auf Amid-C₁₆-Phasen besser von den methylierten Microcystinen getrennt wurden als auf C₁₈-Phasen, während die Trennleistung der hydrophoben Microcystine abnahm. Da in ihren Wasserproben häufig desmethylierte Varianten auftraten, entschieden sie sich für die Amid-C₁₆-Phasen für die Routineanalytik.

Die Selektivität einer chromatographischen Trennung kann nicht nur durch die Wahl der Festphase beeinflusst werden, sondern auch durch die Säurekonzentration. Die Säulen der jüngeren Generation besitzen sehr wenig Restsilanolgruppen und erlauben die Reduktion des Anteils an Additiven, wie z. B. TFA. Da TFA bei massenspektrometrischer Detektion die Ionenbildung unterdrückt, führt eine Verringerung der TFA-Konzentration zu einer Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit mittels Massenspektrometrie. Aus diesem Grund wurde untersucht, welchen Einfluß die Reduktion der TFA-Konzentration im Laufmittel auf die chromatographische Trennung hat. Abb. 30 zeigt die chromatographische Trennung einer Toxinmischung bei 0.01 % TFA in der wäßrigen Phase und ohne TFA in der organischen Phase.

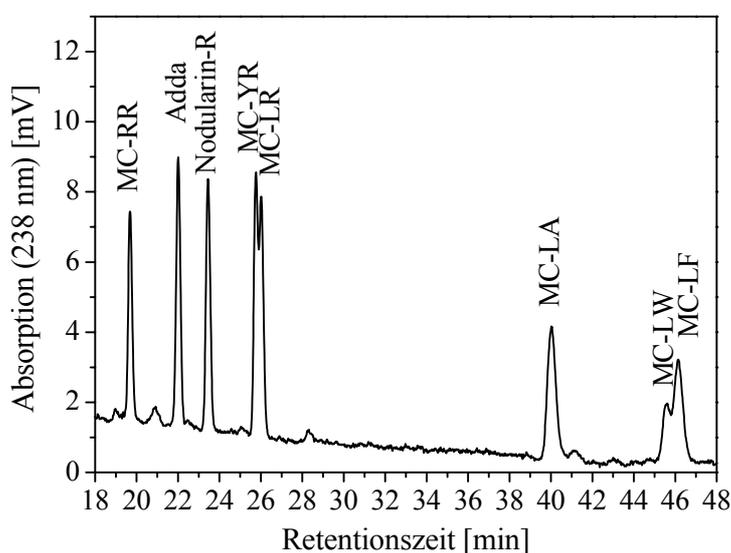


Abb. 30: UV-HPLC-Chromatogramm der z. Zt. kommerziell erhältlichen Toxinstandards inklusive der β -Aminosäure Adda an einer Amid-C₁₆-Phase.

Verwendete Säule s. Bildunterschrift Abb. 28; chromatographische Bedingungen s. Bildunterschrift Abb. 26; Laufmittel: A = Reinstwasser + 0.01 % TFA; B = Acetonitril.

In diesem Fall ist das Peakpaar Nodularin/Adda im Gegensatz zu der Trennung bei Verwendung höherer TFA-Konzentrationen basisliniengetrennt. Hingegen ist die Trennung des Peakpaares Microcystin-LR und -YR wesentlich schlechter. Hydrophile Microcystine eluieren unter diesen Bedingungen früher, während die Retentionszeit der hydrophoben Microcystine wesentlich länger ist als bei Trennungen, die TFA in der organischen Phase enthalten. Die Peakform der hydrophilen Microcystine bleibt unverändert, während die Peaks der hydrophoben Microcystine breiter werden. Da die Acetonitrilphase kein TFA enthält, drifft die Basislinie schwach nach unten.

Daß die TFA-Konzentration im Laufmittel ein empfindlicher Parameter zur Einstellung der Trennleistung ist, zeigt die chromatographische Trennung mit 0.02 % TFA in der wäßrigen Phase und ohne TFA in der organischen Phase (Abb. 31).

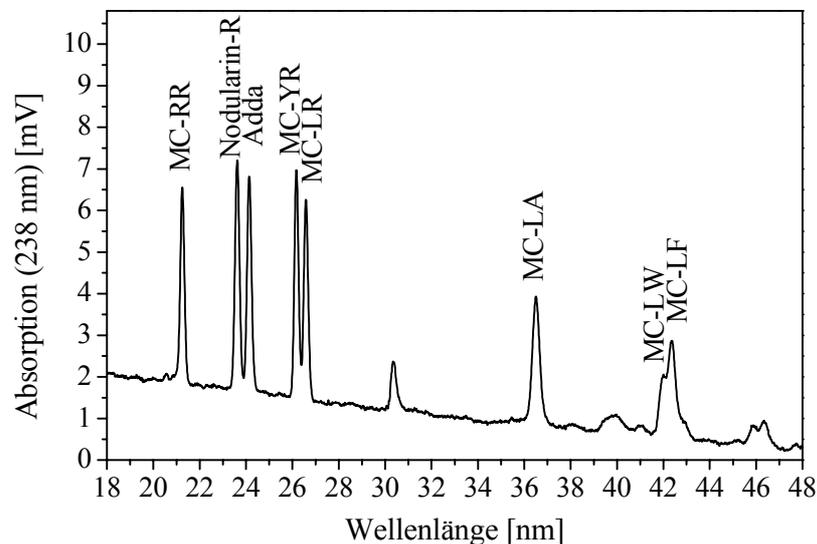


Abb. 31: UV-HPLC-Chromatogramm der z. Zt. kommerziell erhältlichen Toxinstandards inklusive der β -Aminosäure Adda an einer Amid- C_{16} -Phase.

Verwendete Säule s. Bildunterschrift Abb. 28; chromatographische Bedingungen s. Bildunterschrift Abb. 26; Laufmittel: A = Reinstwasser + 0.02 % TFA; B = Acetonitril. Die Elutionsreihenfolge von Adda und Nodularin wurde hier nicht eindeutig bestimmt und kann auch umgekehrt wie dargestellt sein.

In diesem Falle sind beide Peakpaare (Nodularin/Adda und Microcystin-YR und -LR) nahezu basisliniengetrennt. Die hier beschriebenen Änderungen der Trennleistung können auch unbeabsichtigt durch Verflüchtigung von TFA aus dem Laufmittel auftreten. Die Laufmittel sollten infolgedessen verschlossen aufbewahrt und regelmäßig neu angesetzt werden.

1.4 Bestimmung der Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze der HPLC-UV-Methode wurde nur für Microcystin-LR bestimmt. Da die anderen Microcystine sehr ähnliche Extinktionskoeffizienten bei der Detektionswellenlänge 238 nm aufweisen, kann davon ausgegangen werden, daß ihre Nachweisgrenzen gleichfalls sehr ähnlich sind. Die Nachweisgrenze wurde durch sequentielles Vermessen immer niedrigerer Microcystin-LR-Konzentrationen in der HPLC bestimmt. Die Konzentration 0.1 mg/L Microcystin-LR (20 µL Injektionsvolumen) konnte noch deutlich detektiert werden und lieferte ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 10. Wird die Nachweisgrenze als Konzentration bei einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 3 definiert, so kann eine Nachweisgrenze von 33 µg/L oder 0.6 ng Microcystin-LR absolut abgeleitet werden. Dieser Wert wurde durch Chromatographie an der C₁₈-Phase mit 0.1 % TFA im wäßrigen Laufmittel und ohne TFA im organischen Laufmittel erhalten. Der Gradient ist in der Bildunterschrift von Abb. 26 beschrieben. Die hier erhaltene Nachweisgrenze ist niedriger als in der Literatur beschriebene Werte (vgl. Abschnitt II.2.2; Umkehrphasen-Chromatographie) von 10-20 ng absolut, was daran liegen könnte, daß nicht mit einem Multiwellenlängendetektor gearbeitet wurde, sondern bei 238 nm detektiert wurde.

1.5 Monitoring der enzymatischen Spaltung von Microcystinen mittels HPLC

Die UV-HPLC wurde als Referenzanalytik zur systematischen Untersuchung der Spaltung von Microcystinen mit verschiedenen Methoden eingesetzt. Gemeinsame Spaltprodukte der Microcystine könnten zur Entwicklung eines immunologischen Summentests dienen. Die gemeinsamen Strukturfragmente sollten möglichst groß sein, um eine selektive Erkennung durch einen Antikörper zu gewährleisten. Aus diesem Grund wurde beispielsweise auf eine oxidative Spaltung der Doppelbindung des Adda verzichtet. Das hierbei entstehende Adda-Fragment (*erythro*-2-Methyl-3-methoxy-4-phenylbuttersäure, MMPB) hätte eine kleinere und unspezifischere Erkennungsstruktur für einen Antikörper als die intakte Adda-Aminosäure.

Als Modellsubstanz wurde mit Microcystin-LR gearbeitet, da dieses Microcystin kommerziell am besten verfügbar ist. Zunächst wurde versucht, Microcystin enzymatisch zu spalten, da hierbei die einzelnen Aminosäuren nicht modifiziert werden. Dazu wurden verschiedene, kommerziell erhältliche Proteasen und Proteasengemische getestet, wie in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Enzymatische Spaltung von Microcystinen. AS = Aminosäure.

Enzym	Spezifität (-P ₁ -P ₁ '-) [308, 309]	Microcystinspaltung
Trypsin	P ₁ = Lys, Arg	negativ
Papain	P ₁ = Lys, Arg	negativ
Proteinase K	P ₁ ' = hydrophobe, aromatische AS	negativ
Endoproteinase Arg-C	P ₁ = Arg	negativ
Thermolysin	P ₁ ' = Leu, Phe, Ile, Val, Met, Ala	negativ
Subtilisin	P ₁ = neutrale und saure AS bevorzugt	negativ
Pronase (Enzymgemisch)	alle AS	negativ
Carboxypeptidase Y	C-terminal; alle AS	negativ

Mit Ausnahme von Carboxypeptidase Y sind alle verwendeten Proteasen sogenannte Endopeptidasen, die nicht auf N- oder C-terminale Enden des Proteins bzw. Peptids angewiesen sind. Diese stehen in den Microcystinen aufgrund der cyclischen Struktur nicht zur Verfügung. Carboxypeptidase Y wurde in der Hoffnung eingesetzt, daß die über die Seitenketten in das Peptidgerüst eingegliederten Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure als quasi C-terminale Enden dienen könnten. Die Experimente wurden nach Vorschriften für die jeweiligen Enzyme durchgeführt. Die Spaltung wurde mittels HPLC-UV verfolgt, wobei auf das Erscheinen neuer Peaks im Chromatogramm, sowie auf die Abnahme des Microcystin-LR-Peaks geachtet wurde. Leider konnte mit keinem der untersuchten Enzyme eine Spaltung festgestellt werden. Andere Enzyme, wie z. B. Pepsin und Chymotrypsin, sind bereits in der Literatur als nicht Microcystin-aktiv beschrieben worden und sind hier nicht mehr getestet worden [310]. Allerdings konnte der Befund von TAKENAKA [310] nicht bestätigt werden, daß Microcystin-LR von Trypsin enzymatisch hydrolysiert wird. Auch die von ihm publizierte chemische Hydrolyse mit Hilfe einer salzsauren Eisen(III)chloridlösung [311] konnte nicht nachvollzogen werden.

1.6 Monitoring der chemischen Hydrolyse von Microcystinen mittels HPLC

Die chemische Hydrolyse der Microcystine sollte Aufschluß darüber geben, ob Adda hydrolysestabil ist oder definierte Hydrolyseprodukte liefert. Da die chromophore Gruppe von Adda die konjugierte Doppelbindung ist, läßt sich am Vorhandensein von Peaks, die bei 238 nm absorbieren, erkennen, ob das Molekül an der Doppelbindung verändert wurde oder nicht. Sowohl Microcystin-LR als auch Adda wurden in 6 N Salzsäure mit einem Zusatz von 0.1 % TFA fünf Stunden bei 125 °C hydrolysiert, anschließend neutralisiert und die Spaltung mittels UV-HPLC verfolgt. Das Absorptionsmaximum der Hydrolyseprodukte verschiebt sich dabei um 8 nm zu niedrigerer Wellenlänge (vgl. Abb. 32).

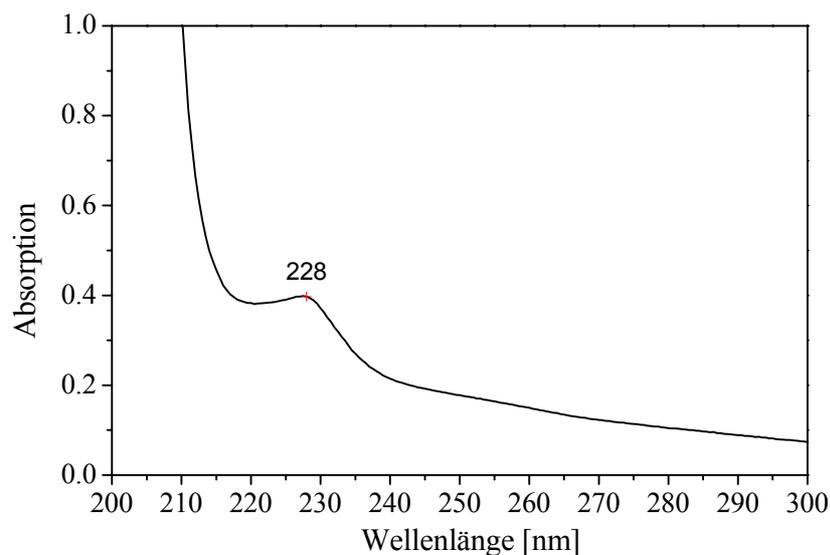


Abb. 32: UV-Spektrum des Microcystin-LR-Hydrolysats. Hydrolyselösung: 6.6 M HCl, 0.044 % TFA, 5.55 mg/L Microcystin-LR, Gesamtvolumen 5.5 mL. 5 h unter Rückfluß bei 120-130 °C gekocht, neutralisiert mit 25%iger Ammoniaklösung.

Die Hydrolyseprodukte von Microcystin-LR und Adda liefern im Chromatogramm zwei identische Peaks, deren Retentionszeit derjenigen von Adda sehr ähnlich, jedoch nicht identisch ist (Abb. 33). Es kann folglich davon ausgegangen werden, daß diese Hydrolyseprodukte vom Adda-Teil des Microcystins stammen und allen Microcystinen gemeinsam sind.

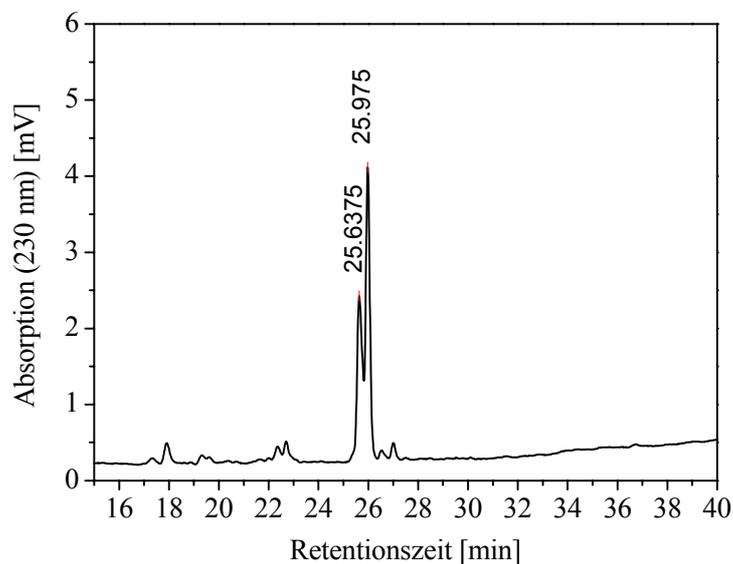


Abb. 33: UV-HPLC-Chromatogramm des Adda-Hydrolysats. Als stationäre Phase wurde die RP-Amid-C₁₆-Säule verwendet.

Die Lage des Absorptionsmaximums bei 228 nm spricht dafür, daß die konjugierte Doppelbindung noch vorhanden ist und die Adda-ähnliche Retentionszeit des Doppelpeaks dafür,

daß der Phenylring, der die Polarität des Moleküls maßgeblich beeinflusst, ebenfalls noch vorhanden ist. Die Identität des gemeinsamen Hydrolyseprodukts von Microcystin-LR und Adda konnte nicht aufgeklärt werden, da die zur Verfügung stehenden Substanzmengen zu gering waren. In der Literatur gibt es lediglich Hinweise darauf, daß Adda nicht hydrolysestabil ist [312]. Mögliche Hydrolyseprodukte wurden nicht aufgeklärt.

Eine weitere Möglichkeit, cyclische Peptide schonend zu linearisieren, wurde von HAVLICEK et al. vorgestellt [313]. Die Autoren öffneten und analysierten Cyclosporin A durch BF₃-katalysierte Methanolyse. Die Ringöffnung erfolgte selektiv an zwei benachbarten Amidbindungen. Die BF₃-katalysierte Ringöffnung könnte auch der Grund sein, warum TAKENAKA et al. in ihren Arbeiten zur Spaltung von Microcystinen Desmethoxy-Adda unter sehr milden Spaltbedingungen erhalten haben [310, 311, 314]. In ihren Arbeiten erfolgte der Nachweis der Spaltung mittels GC-MS, wozu die Reaktionsprodukte mittels methanolischer BF₃-Lösung in ihre Methylester überführt wurden. Möglicherweise wurde die Ringöffnung erst durch diese Behandlung hervorgerufen. Eigene Spaltversuche von Microcystin-LR, -LA und Adda mittels BF₃-katalysierter Methanolyse konnten zwar belegen, daß das Edukt verschwindet, gemeinsame Produktpeaks konnten jedoch nicht nachgewiesen werden.

1.7 Messung von Realproben mittels HPLC-UV

Drei Realproben wurden exemplarisch mit der entwickelten HPLC-UV-Methode untersucht. Es handelte sich dabei um lyophilisiertes Zellmaterial einer *Microcystis-sp.*-Blüte vom März 1993 aus Australien, einer Blüte unbekannter Spezies aus Shepparton (Victoria, Australien 1993) und einer Blüte mit mehreren nicht zugeordneten Spezies vom Bergknappweiher (Bayern, 1998). Die Microcystine wurden mit einer Mischung aus Methanol und Wasser (3:1) im Ultraschallbad extrahiert, zentrifugiert, dann im Stickstoffstrom eingedampft und mit 5%iger Essigsäure aufgenommen. Anschließend wurden die Proben nach einer Literaturvorschrift [96] durch Extraktion an einer C₁₈-Silica-Kartusche aufgereinigt.

Abb. 34 zeigt das HPLC-UV-Spektrum des Extrakts der *Microcystis-sp.*-Blüte (1993). Im Bereich der Retentionszeiten der Microcystine erscheinen vier Peaks bei einer flachen Grundlinie. Die Peaks bei 30.26 Minuten und bei 33.74 Minuten können aufgrund ihrer Retentionszeiten (RT) dem Microcystin-LR (RT des Standards 30.39 Minuten) und dem Microcystin-LA (RT des Standards 33.84 Minuten) zugeordnet werden. Der Peak bei 28.27 Minuten würde am ehesten der Retentionszeit des Nodularins entsprechen (28.35 Minuten), doch ist bisher nicht bekannt, daß Nodularin von *Microcystis sp.* produziert wird. Es handelt sich hierbei vermutlich um ein Microcystin, das nicht kommerziell als Standard verfügbar ist.

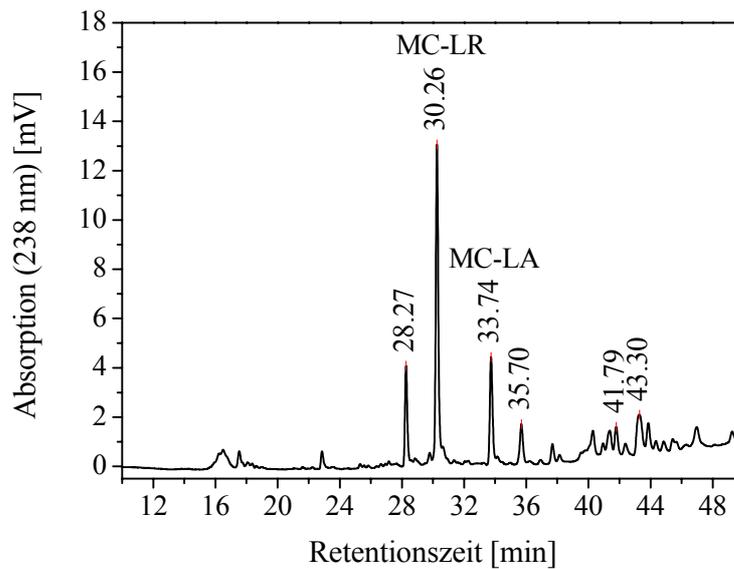


Abb. 34: HPLC-UV-Chromatogramm eines Extrakts einer *Microcystis*-sp.-Blüte (Australien 1993). Chromatographische Bedingungen s. Abb. 26.

Ebenso kann es sich bei dem Peak mit der Retentionszeit 35.7 Minuten um ein hydrophobes Microcystin handeln, daß nicht als Standard verfügbar ist. Werden diese vier Peaks als potentielle Microcystinpeaks quantifiziert, so werden 1.9 µg Toxin pro Milligramm Zelltrockenmasse erhalten (entsprechend 0.19 %). Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit dem Wert von 1.82 µg Toxin/mg Zelltrockenmasse, der in einem australischen Laboratorium bestimmt wurde [315]. Die Hälfte des Toxingehaltes ist hierbei auf Microcystin-LR zurückzuführen.

Die zweite australische Realprobe ist in Abb. 35 dargestellt. Microcystin-LR ist hier eindeutig zu identifizieren. Ebenso wie bei der vorhergehenden Probe erscheint auch hier der Peak bei 35.56 Minuten Retentionszeit, der in Blankmessungen jedoch fehlt. Die Peaks bei Retentionszeiten über 40 Minuten können nicht zugeordnet werden. Die hydrophoben Microcystine-LF und -LW würden früher eluieren. Der Toxingehalt der Probe ist unter Berücksichtigung der ersten beiden Peaks 0.4 µg Toxin/mg Zelltrockenmasse.

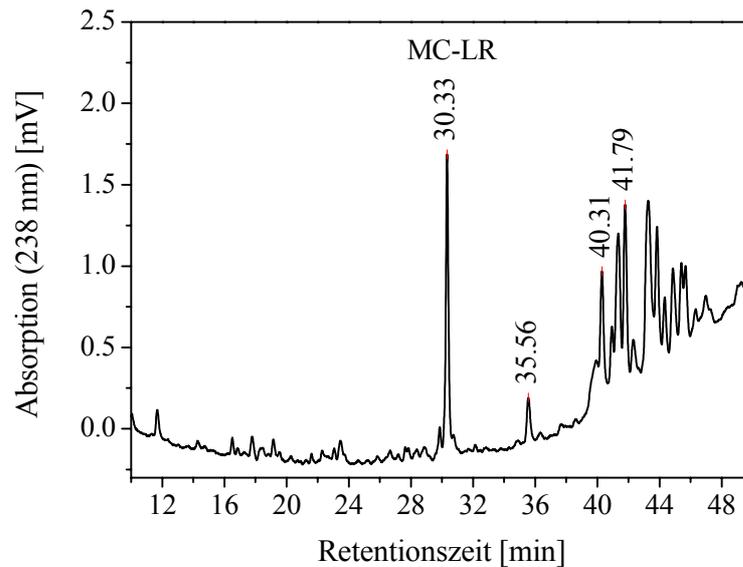


Abb. 35: HPLC-UV-Chromatogramm eines Extrakts einer Cyanobakterienblüte unbekannter Spezies (Shepparton, Australien 1993). Chromatographische Bedingungen s. Abb. 26.

Bereits diese beiden Beispiele für Messungen von cyanobakteriellen Extrakten zeigen einige Einschränkungen dieser analytischen Methode. Existieren keine Toxinstandards, so läßt sich die Identität von unbekanntem Peaks nicht belegen. Dies kann sich fehlerhaft auf die Bestimmung der Gesamttoxinstoffmenge einer Probe auswirken. Ein weiteres Beispiel einer Realprobe aus einem bayerischen Oberflächengewässer (vgl. Abb. 36) zeigt, daß mit dieser Methode nicht nur eine falschpositive Zuordnung von Proben erfolgen kann, sondern auch eine falschnegative Einstufung einer Probe. Die bayerische Realprobe war durch Lyophilisieren einer sich im Absterben befindenden Algenblüte gewonnen worden. Es handelte sich dabei um mehrere Spezies, die aufgrund des Zustandes der Zellen nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Mittels Immunoassay wurde festgestellt, daß 4.9 µg Microcystin-LR-Äquivalente pro mg Zelltrockenmasse vorhanden waren, entsprechend einem Anteil von 0.5 %. Der Toxingehalt lag damit höher als derjenige der australischen *Microcystis-sp.*-Blüte von 1993. Abb. 36 zeigt das HPLC-UV-Chromatogramm der mittels SPE aufgereinigten Probe. Da bei dem normalerweise verwendeten Injektionsvolumen von 20 µL keine Peaks zu erkennen waren, wurde das Injektionsvolumen auf 100 µL erhöht.

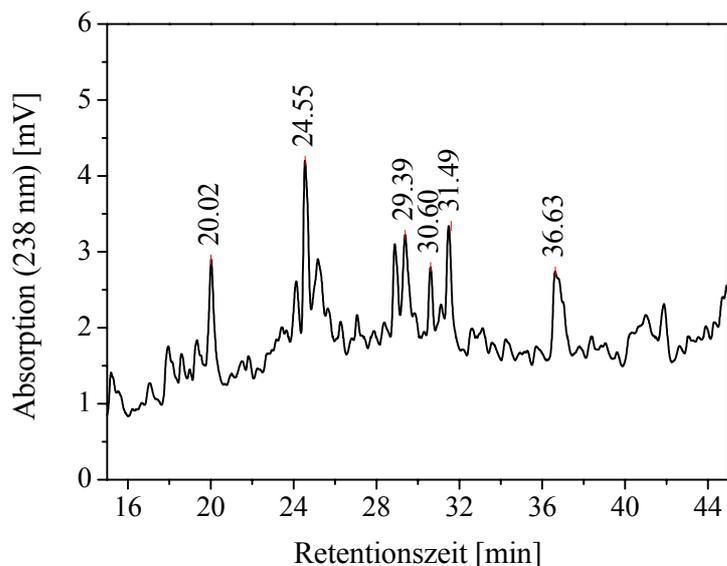


Abb. 36: HPLC-UV-Chromatogramm eines Extrakts einer gemischten cyanobakteriellen Blüte (Bergknappweiherr, Landkreis Weilheim, Bayern 1998). Chromatographische Bedingungen s. Abb. 26; Injektionsvolumen 100 μ L.

Keiner der Peaks im Retentionsbereich der Microcystine liegt über einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 3 und damit über der Nachweisgrenze. Dies bedeutet einerseits, daß die verwendete Aufreinigungsmethode mittels C_{18} -Silicagel nicht ausreicht, um die Matrix zu entfernen. Andererseits kann auch geschlossen werden, daß die Detektion der Absorption bei 238 nm nicht selektiv genug ist, um die Microcystine zu detektieren. Schon TSUJI et. al wiesen darauf hin, daß eine Aufreinigung mittels Umkehrphasen-SPE die Matrix oft nicht ausreichend entfernt [96]. Sie verwendeten eine kombinierte Extraktion an Umkehr- und Normalphasen. Dies jedoch macht die Analyse von Microcystinproben langwierig, teuer und fehleranfällig.

1.8 Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

Zwei HPLC-Methoden mit UV-Detektion wurden zur Analyse von kommerziell erhältlichen Microcystinen und Nodularin sowie der Aminosäure Adda untersucht und optimiert. Die Quantifizierbarkeit der UV-Absorption bei 238 nm wurde überprüft. Generell können Microcystine, auch solche mit zusätzlichen aromatischen Aminosäuren, bei dieser Wellenlänge unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten von Microcystin-LR quantifiziert werden. Der größte Fehler der Quantifizierung tritt bei tryptophanhaltigen Microcystinen auf. Isomere der konjugierten Adda-Doppelbindung haben ebenfalls ein anderes Absorptionsspektrum und müssen gesondert quantifiziert werden.

Um die Trenneffizienz zu steigern, wurde ein Wasser/Acetonitril-Gradient zur Elution der Microcystine verwendet. TFA wurde als Säure und Ionenpaarreagenz zugesetzt. Der Anteil an TFA in dem wäßrigen bzw. organischen Lösungsmittel beeinflusst sowohl den Verlauf der Basislinie der Chromatographie als auch die Trennung der Microcystine.

Zwei Festphasen wurden zur Trennung der Microcystine getestet: Zum einen eine C₁₈-Umkehrphase und zum anderen eine etwas hydrophilere Amid-C₁₆-Umkehrphase. Zur Trennung der hydrophilen Microcystine sind beide Phasen gut geeignet. Eine Umkehr der Retentionszeiten von Adda und Microcystin-LR ist zu beobachten. Die hydrophoben Microcystine-LF und -LW werden allerdings auf der polareren Amid-C₁₆-Phase schlechter getrennt. Auffallend am Retentionsverhalten der hydrophilen Microcystine ist die Tatsache, daß ihre Retention an der Festphase nahezu ausschließlich von der hydrophoben Adda-Seitenkette dominiert wird. Dies wurde daraus geschlossen, daß Adda im Retentionsfenster der hydrophilen Microcystine eluiert und daß trotz Verwendung von langen, flachen Gradienten die hydrophilen (argininhaltigen) Microcystine sehr eng hintereinander eluieren.

Die Nachweisgrenze, die für Microcystin-LR auf der C₁₈-Umkehrphase abgeschätzt wurde, beträgt 33 µg/L bei 20 µL Injektionsvolumen oder 0.6 ng absolut, wenn ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 3 gefordert wird. Es wird davon ausgegangen, daß sich die übrigen Microcystine ähnlich verhalten. Mit dieser Methode kann folglich ohne vorherige Probenanreicherung der von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) vorgeschlagene Grenzwert von 1 µg/L Microcystin-LR nicht erreicht werden.

Die HPLC-UV-Methode wurde angewendet, um die enzymatische sowie chemische Spaltung der Microcystine zu überprüfen. Keines der verwendeten, kommerziell erhältlichen Enzyme war in der Lage, den Peptidring der Microcystine zu spalten. Dies kann einerseits auf die starre Ringkonformation und andererseits auf die hohe Anzahl von D-Aminosäuren im Ring zurückgeführt werden und ist auch für andere Cyclopeptide, wie Cyclosporin A [313], bekannt. Die chemische Hydrolyse von Microcystin-LR und von Adda liefert in beiden Fällen zwei Produkte, deren Absorptionsmaxima zu niedrigen Wellenlängen verschoben sind und deren Retentionsverhalten demjenigen von Adda sehr ähnlich ist. Eine Strukturaufklärung dieser Produkte konnte aufgrund der geringen Substanzmengen nicht erfolgen.

Die Untersuchung von drei Realproben (Extrakten von lyophilisierter Trockenmasse) zeigte Möglichkeiten und Einschränkungen der HPLC-UV-Methode auf. Diese Methode läßt sich für reine Cyanobakterienblüten meist gut anwenden, ist allerdings auf die Bestimmung derjenigen Microcystine limitiert, die als Standards zur Verfügung stehen. Komplexe Realproben sind hingegen nur nach aufwendiger Probenvorbereitung oder durch Verwendung selektiverer Detektoren zu analysieren. Daher besteht bei diesem Verfahren sowohl die Gefahr falsch negativer als auch falsch positiver Einschätzung einer Probe.

2 ELISA mit monoklonalen M8H5-Antikörpern zur Bestimmung von Microcystinen

Dieses Kapitel beschreibt die Entwicklung und Validierung eines direkten kompetitiven ELISAs für Microcystine in Mikrotiterplatten. Es wird sowohl auf die Herstellung von Tracern als auch auf die Charakterisierung des Antikörpers eingegangen.

2.1 Antikörper M8H5

Der monoklonale Antikörper M8H5 wurde von einer japanischen Arbeitsgruppe (Prof. UENO und Dr. NAGATA) zur Verfügung gestellt [149-151]. Der Antikörper wurde durch Immunisierung von Mäusen mit einem Microcystin-LR-Rinderserumalbumin-Konjugat und anschließender Fusion der B-Lymphozyten hergestellt. Das Immunogen wurde durch direkte Kopplung einer der beiden Carboxylgruppen der Microcystine an primäre Aminogruppen des Rinderserumalbumins (BSA) synthetisiert, vermittelt durch ein wasserlösliches Carbodiimid. Die Kopplungsdichte des Immunogens betrug 1.3 Mol Microcystine-LR pro Mol Proteinemolekül. Da Microcystin-LR zwei Carboxylgruppen besitzt, ist die Struktur der Immunogens nicht eindeutig. Die Interpretation des Kreuzreaktionsmusters spricht jedoch dafür, daß die Microcystine über die Carboxylgruppe der Aminosäure 3 (*D-erythro*- β -Methylaspartat) gekoppelt wurden.

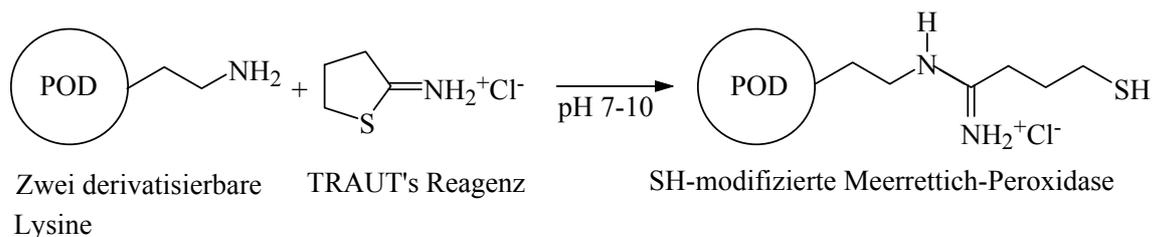
Die Antikörper gehören zu der Subklasse IgG₁ und wurden sowohl als Zellkulturüberstand als auch affinitätsgereinigt geliefert und eingesetzt. Die Affinitätskonstante für Microcystin-LR beträgt $3.1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$. Die bisher von NAGATA und UENO verwendeten Testformate sind der indirekte, kompetitive ELISA [149, 150] und ein anti-Immunkomplex-ELISA, der einem Sandwich-ELISA analog ist [151]. M8H5 ist im indirekten ELISA-Format als Testkit kommerziell erhältlich [316].

2.2 Herstellung des Tracers

Für die Durchführung des direkten ELISAs war die Synthese eines Enzymtracers notwendig. Als Enzym wurde Meerrettich-Peroxidase verwendet, da es einen hohen Substratumsatz hat und Haptene mit unterschiedlichen Syntheseverfahren an das Enzym gekoppelt werden können. Zunächst wurde versucht, die Synthese des Enzymtracers analog zu der Synthese des Immunogens durch Kopplung der Carboxylgruppen an Aminogruppen des Enzyms durchzuführen. Diese Syntheseroute war allerdings nicht erfolgreich. In der Literatur (z. B. [111])

wird immer wieder berichtet, daß sich die Carboxylgruppen der Microcystine vermutlich aus sterischen Gründen nicht für eine reproduzierbare Kopplung an andere Moleküle eignen. Aus diesem Grund wurde eine andere Syntheseroute gewählt. Microcystin-LR besitzt mit dem Dehydroalanin (Aminosäure 7, Abb. 5) einen MICHAEL-Akzeptor, der von Nukleophilen, wie z. B. Thiolen, angegriffen werden kann. Dies wurde ausgenutzt, um Microcystin-LR an SH-modifizierte Peroxidase zu koppeln. Das Reaktionsschema ist in Abb. 37 dargestellt.

1. Schritt: SH-Modifizierung der Meerrettich-Peroxidase (POD)



2. Schritt: Kopplung mit dem Microcystin

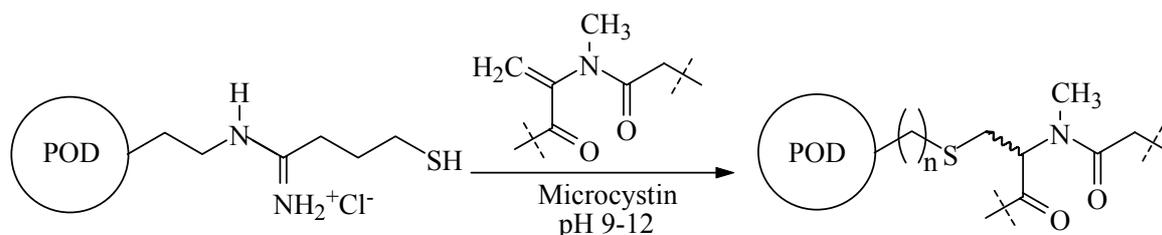


Abb. 37: Synthese des Microcystin-LR-Enzymtracers (MC-LR-POD) über SH-Aktivierung der POD und nukleophile Addition an die α,β -ungesättigte Carbonylgruppe des Microcystins.

Für die SH-Modifizierung des Enzyms wurde das TRAUT's Reagenz (2-Iminothiolan Hydrochlorid) eingesetzt [238, S. 57-60]. Dieses führt gleichzeitig einen Abstandhalter (C_3 -Alkylkette, Thiol und Imid-Kohlenstoff) und eine kationische Gruppe zwischen Protein und Microcystin ein. Der Iminothiolanring bildet die Schutzgruppe für das Thiol. Die SH-Modifizierung des Proteins erfolgt bei leicht alkalischem pH-Wert (pH 8). Der hierfür verwendete Puffer darf keine Aminogruppen enthalten und die Reaktion sollte unter Schutzgas durchgeführt werden, um eine Oxidation der Thiole zu verhindern. Zusätzlich kann der Puffer mit Chelatbildnern versetzt werden, um Schwermetallionen zu komplexieren. Nach dem ersten Reaktionsschritt muß das SH-modifizierte Enzym gereinigt werden, um eine Reaktion von überschüssigem, hydrolysiertem TRAUT's Reagenz mit Microcystin-LR zu verhindern. Die Aufreinigung kann mittels Sephadex-Gelchromatographie (PD-10) durchgeführt werden, wobei die Enzymfraktionen visuell durch die braune Farbe oder spektrometrisch im Mikrotiterplatten-Auslesegerät bei 405 nm detektiert werden können. Die Gelchromatographie sollte in einem neutralen Puffer erfolgen und zügig durchgeführt werden, um eine Oxidation der Thiole zu vermeiden. Anschließend werden die Enzymfraktionen vereinigt und mit Schutzgas gespült. Eine Überprüfung der Reaktion mit ELLMANN's Test auf SH-Gruppen ist in diesem Fall aufgrund der Eigenabsorption des Enzyms nicht möglich.

Im zweiten Schritt erfolgt die nukleophile Addition des Thiols an die α,β -ungesättigte Carbonylgruppe des Microcystins. Dadurch entsteht am α -Kohlenstoff des ehemaligen Dehydroalanins ein Stereozentrum. Die Reaktion ist abhängig vom pH-Wert und oft wird angenommen, daß MICHAEL-Additionen in wäßrigen Lösungsmitteln umso höhere Ausbeuten liefern, je höher der pH-Wert ist. DA SILVA et al. [317] zeigten jedoch, daß der optimale pH-Wert von der Art der Nukleophils abhängt. Sie fanden, daß Thiole bei pH 7.5 die höchsten Ausbeuten des Additionsprodukts liefern. In dieser Arbeit wurden Kopplungen bei pH 7.5 und bei pH 9.2 durchgeführt. Eine höhere Kopplungsausbeute bei pH 7.5 konnte nicht reproduzierbar nachgewiesen werden. Bei hohen pH-Werten nimmt die Stabilität des Enzyms durch Denaturierung ab, weshalb auf höhere pH-Werte als pH 9.2 verzichtet wurde. Ebenso wie bei dem pH-Wert ist bei der Aufreinigung des Reaktionsansatzes Vorsicht geboten. Die Trennung des ungekoppelten Microcystins-LR (Molmasse 994) von dem Enzymtracer (Molmasse 46 000 Da) mittels Gelchromatographie an kommerziell erhältlichen Sephadex-PD-10-Säulen kann zu einer unvollständigen Abtrennung des Microcystins führen. Das Material dieser zum Entsalzen von Proteinlösungen vorgesehenen Säulen ist Sephadex G25-F und umfaßt einen Trennbereich von 1 000 bis 5 000 Da. Proteine mit Molmassen größer 5 000 Da werden vollständig ausgeschlossen, Moleküle unter 1 000 Da werden am stärksten zurückgehalten. Microcystine liegen in dem Molmassenbereich von Molekülen, die nur partiell in die Poren eindringen. Abb. 38 zeigt das Elutionsverhalten Microcystin-LR an einer kommerziell erhältlichen Sephadex-PD-10-Säule (Material Sephadex G25-F, Säulenhöhe 10 cm, Säulendurchmesser 1 cm). Microcystin-LR eluiert teilweise im Bereich von Proteinen.

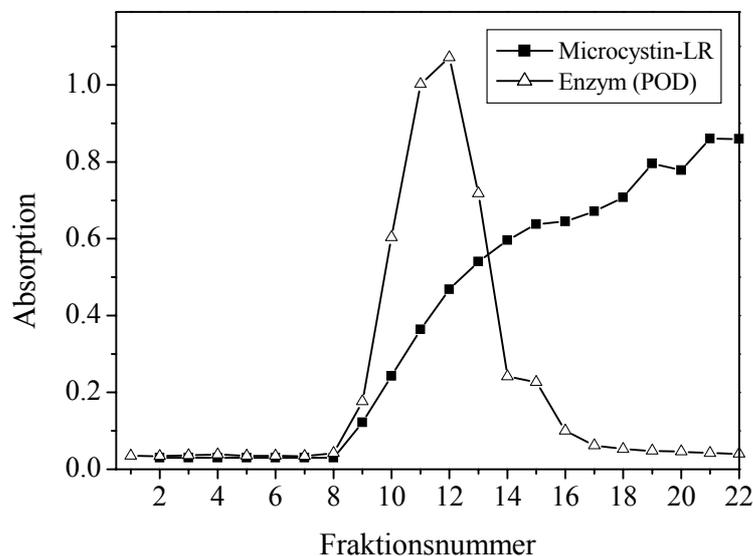


Abb. 38: Gelchromatographie von Microcystin-LR (Absorption bei 238 nm) und Meerrettich-Peroxidase (POD, Absorption bei 405 nm) an kommerziell erhältlichen Sephadex-PD-10-Säulen (Material Sephadex G25-F). Bedingungen: Äquilibration und Elution mit Reinstwasser, aufgefangene Menge ca. 250 μ L pro Fraktion.

Alternativ wurde die Verwendung zweier anderer Gele getestet. Die Verwendung von Sephadex G50, einem Material mit einem Trennbereich zwischen 1 500 und 30 000 Da für Proteine, lieferte sehr breite Proteinpeaks und wurde aus diesem Grund nicht verwendet. Toyopearl HW50F (Trennbereich für globuläre Proteine 100-10 000 Da), verhielt sich hingegen sehr ähnlich wie Sephadex G25-F, zeigte jedoch einen wesentlich höheren Rückdruck. Die Aufreinigung des Tracers wurde schließlich durch mehrmaliges Chromatographieren der Enzymfraktionen an Sephadex-PD-10-Säulen oder durch Verwendung einer selber hergestellten, längeren Säule (Material: Sephadex G25-F, Höhe: 22 cm, Durchmesser: 1 cm) durchgeführt. Die Trennung der Fraktionen wurde mittels UV-Absorption bei 238 nm überprüft.

Da Meerrettich-Peroxidase wie fast alle Proteine eine starke Eigenabsorption beim Absorptionsmaximum von Microcystinen besitzt, ist eine Überprüfung des Kopplungserfolges mittels UV-Spektroskopie kaum möglich. Der Kopplungserfolg wurde deshalb durch Vergleich der Microcystin-LR-Konzentration vor und nach der Reaktion ermittelt. Die Quantifizierung erfolgte mittels HPLC-UV. Ein Aliquot der Reaktionslösung wurde hierzu entnommen, das Enzym durch Zusatz von organischen Lösungsmitteln denaturiert und abgetrennt, die Probe wurde entsprechend verdünnt und in der HPLC vermessen. Die Kopplungsausbeute lag bei durchschnittlich 0.5 Molekülen Microcystin-LR pro Peroxidase-molekül.

Die Stabilität des Enzymtracers gegenüber Salzgehalt, pH-Wert, Huminsäure, Wasserstoffperoxid und Acetonitril wurde von EIKENBERG getestet [92] und in [318] veröffentlicht. Es zeigte sich, daß die Enzymstabilität im direkten ELISA-Format oft kritischer als die Antikörperstabilität ist, da der Enzymtracer in einer homogenen Lösung mit der Probe und damit mit möglichen Störsubstanzen in Kontakt kommt. Betrachtet man eine Signalabnahme von 10 % als Stabilitätsgrenze, so ist der Enzymtracer bis zu 5 Vol.% Acetonitril, bis 50 g/L NaCl, 1 mg/L Huminsäure und 0.001 Gew.% Wasserstoffperoxid stabil. Im pH-Bereich von 4-8 kann der Enzymtracer als stabil betrachtet werden, wenn eine Signalabnahme von 30 % als Stabilitätsgrenze gilt. Die Stabilität gegenüber Huminsäure kann durch Zugabe von BSA wesentlich verbessert werden [319]. Im Falle des Microcystin-LR-Enzymtracers bewirkt ein Zusatz von 26 mM BSA eine Verbesserung der Huminsäureverträglichkeit um einen Faktor größer 100 [92]. Auch die Zugabe des Substrats 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) kann die Stabilität des Tracers in manchen Fällen verbessern [320].

2.3 Optimierter direkter ELISA

Mit dem synthetisierten Tracer wurde ein direkter kompetitiver ELISA etabliert. Sowohl die Tracerkonzentration, als auch die Antikörperkonzentration wurde dahingehend optimiert, eine hohe Empfindlichkeit des Assays bei relativ hohen Signalintensitäten zu erreichen. Weiterhin wurde getestet, ob sich die Adsorption der monoklonalen Microcystin-LR-Antikörper an die

Oberfläche der Polystyrolplatte durch Vorbeschichten mit polyklonalem anti-Maus-Serum verbessern läßt. Dieses Vorgehen steigerte das Signal um das Achtfache.

Auch der Einfluß der Vorinkubationszeit des Analyten wurde untersucht. Bei hochaffinen Antikörpern oder bei Analyten mit niedrigen Diffusionskoeffizienten kann die Einstellung des Gleichgewichtes länger dauern und die Empfindlichkeit des Tests mit zunehmender Vorinkubationszeit des Analyten zunehmen. Bei diesem ELISA wurde keine Änderung des Testmittelpunktes von Microcystin-LR bei Variation der Vorinkubationszeit zwischen 30 Minuten und 16 Stunden festgestellt. Eine Vorinkubationszeit des Analyten von länger als 30 Minuten ist infolgedessen unkritisch für die Empfindlichkeit des Tests. Die Kalibrierkurve des optimierten direkten kompetitiven ELISA für Microcystin-LR ist in Abb. 39 dargestellt.

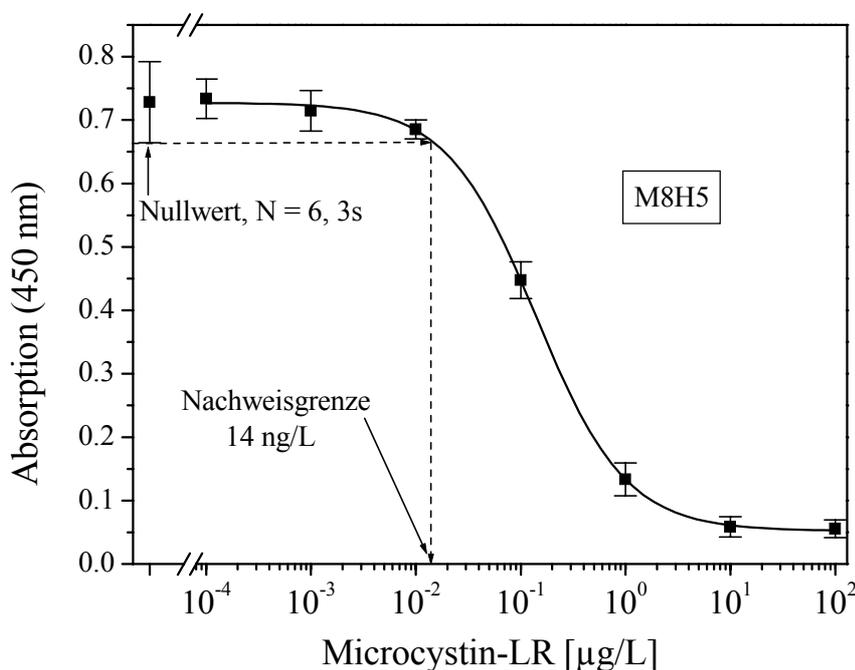


Abb. 39: Kalibrierkurve des direkten kompetitiven Microcystin-LR-ELISA mit monoklonalen Antikörpern M8H5.

Bedingungen: Anti-Maus-IgG, 1:3 000, 200 µL, 30 h; M8H5-Ak (Zellkulturüberstand), 1:10 000, 200 µL, 1,5 h; Microcystin-LR-Standard, 200 µL, 30 min; MCLR-SH-POD, 1:5 000, 50 µL, 15 min; Substrat TMB/H₂O₂, 200 µL, 22 min; Abstoppen 100 µL. Testparameter: maximale Absorption = 0,73, minimale Absorption = 0,05, Testmittelpunkt = 0,14 µg/L, Steigung = 1,01; Fehler: Spannweite außer Nullwert. Hier Fehler 3s. Nachweisgrenze (Nullwert - 3s): 14 ng/L.

Der Testmittelpunkt des optimierten ELISA liegt mit 0,14 µg/L deutlich unterhalb des von der WHO vorgeschlagenen Grenzwertes von 1 µg/L Microcystin-LR. Die Nachweisgrenze und der Testmittelpunkt der dargestellten Kurven sind nahezu identisch den von NAGATA et al. [149] für den indirekten, kompetitiven ELISA publizierten Werten. Die kurzen Inkubationszeiten machen im Gegensatz zu dem indirekten ELISA eine Testdurchführung innerhalb von zwei Stunden möglich, wenn Antikörper-vorbeschichtete Mikrotiterplatten verwendet werden.

Wird die Tracerkonzentration weiter verringert (halbiert), so sinkt sowohl die maximale Absorption als auch der Testmittelpunkt (s. Abb. 40). Die maximale Absorption sinkt dabei um 25 % während der Testmittelpunkt um 20 % sinkt. Daraus kann geschlossen werden, daß der minimale Testmittelpunkt, dessen Kehrwert der Affinitätskonstanten entspricht, noch nicht erreicht ist.

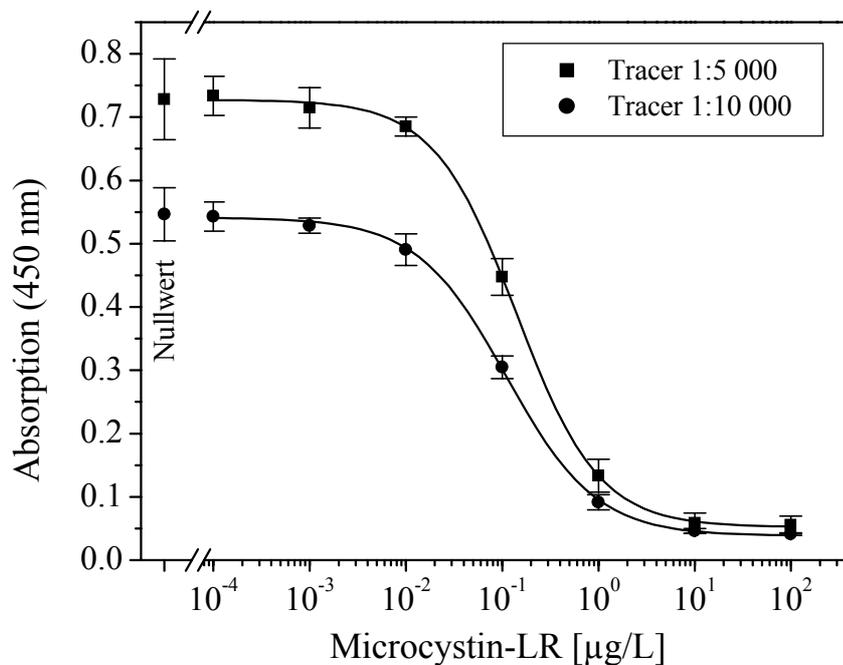


Abb. 40: Einfluß der Tracerverdünnung auf die Kalibrierkurven im ELISA für Microcystin-LR mit M8H5-Antikörpern (Fehlerbalken: Spannweite, $n = 6$).

Bedingungen s. Abb. 39. Testparameter: Tracer 1:5 000: maximale Absorption = 0.73, Testmittelpunkt = 0.14 µg/L; Tracer 1:10 000: maximale Absorption = 0.54, Testmittelpunkt = 0.11 µg/L.

2.4 Kreuzreaktionen

Zur weiteren Charakterisierung des Antikörpers M8H5 im direkten ELISA-Format wurden die Kreuzreaktionen (Tabelle 7) von kommerziell erhältlichen Microcystinen, Nodularin, Adda und *N*-Acetyl-Adda bestimmt. Im Gegensatz zum indirekten Immunoassay, in dem beispielsweise Microcystin-LA (MC-LA) eine molare Kreuzreaktion von nur 26 % besitzt, sind im direkten ELISA-Format keine signifikanten Unterschiede im Bezug auf Microcystin-LR (100 % Kreuzreaktion) zu erkennen. Die Microcystine und auch Nodularin zeigen Kreuzreaktionen von 152 % bis 96 %, wobei der 100%-Wert bis auf zwei Ausnahmen im Fehlerbereich enthalten ist.

Tabelle 7: Vergleich der Kreuzreaktionen [%] von Antikörper M8H5 im indirekten und direkten Assayformat.

Kreuzreaktand	Kreuzreaktion molar [149] CR ₅₀ %, molar [%] ⁽¹⁾	Kreuzreaktion molar CR ₅₀ %, molar [%] ⁽¹⁾	Kreuzreaktion CR ₅₀ % [%] ⁽²⁾
	Indirektes Format	Direktes Format	Direktes Format
MC-LR	100	100	100
[D-Asp ³ ,Dhb ⁷]MC-RR	-	156 ± 31	152 ± 30
MC-WR	-	147 ± 58	137 ± 53
MC-LF	-	123 ± 17	124 ± 17
MC-LY	-	122 ± 35	121 ± 35
MC-YR	44	118 ± 48	112 ± 46
MC-LA	26	115 ± 35	126 ± 39
MC-RR ⁽³⁾	106	114 ± 22	109 ± 21
[D-Asp ³]MC-LR	51	114 ± 18	115 ± 18
MC-LW	-	104 ± 10	101 ± 10
Nodularin-R	20	102 ± 36	124 ± 44
[D-Asp ³]MC-HtyR	-	101 ± 46	96 ± 44
N-Acetyl-Adda	-	0.18 ± 0.03	0.49 ± 0.08
Adda	-	0.10 ± 0.02	0.30 ± 0.18

⁽¹⁾ CR₅₀ %, molar [%] = $C_{MC-LR} \cdot M_{KR} / C_{KR} \cdot M_{MC-LR} \cdot 100$ %; C_{MC-LR} entspricht dem Testmittelpunkt in [g/L] von Microcystin-LR (MC-LR) des jeweiligen Tests. C_{KR} entspricht dem Testmittelpunkt in [g/L] des Kreuzreaktanden. M_{KR} und M_{MC-LR} sind die molaren Massen des Kreuzreaktanden bzw. von Microcystin-LR.

⁽²⁾ CR₅₀ % [%] = $C_{MC-LR} / C_{KR} \cdot 100$ %;

Die Fehler wurde über das Fehlerfortpflanzungsgesetz aus den Fehlern der Testmittelpunkte ermittelt.

⁽³⁾ vgl. [92]

Änderungen des Ladungszustandes des Microcystins, beispielsweise durch Ersatz des positiv geladenen Arginins (R) haben keinen Einfluß auf die Bindung durch den Antikörper. Die nichttoxische Aminosäure Adda wird allerdings ebenso wie N-Acetyl-Adda stark diskriminiert. Dies kann einerseits auf eine Ladungsabstoßung durch die negativ geladene Carboxylgruppe zurückgeführt werden, andererseits kann es darauf hindeuten, daß der Peptidzyklus für die Bindung an den Antikörper wichtig ist.

Die Unterschiede der Kreuzreaktionen im direkten und indirekten Format können theoretisch nur schwer erklärt werden. Eine mögliche Erklärung ist die Verwendung sehr unterschiedlicher Inkubationszeiten im kompetitiven Schritt des Tests. Im indirekten Assayformat erfolgte die Konkurrenz über 12 h, während im direkten Assayformat der kompetitive Schritt (Enzymtracer-Inkubation) 15 min dauerte. Numerische Simulationen zeigen, daß der Einfluß der Tracerinkubationszeit auf die Kreuzreaktionen sehr komplex ist und wesentlich von den kinetischen Konstanten und den Testbedingungen abhängt. Da viele dieser Parameter für einen realen Assay nicht bekannt sind, können die Auswirkungen der Tracerinkubationszeiten auf die Kreuzreaktionen nicht vorhergesagt werden. Im direkten ELISA-Format zeigte ein Vergleich der Kreuzreaktionen bei unterschiedlich langen Tracerinkubationszeiten keinen

Einfluß auf die Kreuzreaktion (vgl. Tabelle 8). Als Kreuzreaktand wurde Microcystin-LA gewählt, da hier die stärkste Abweichung der Kreuzreaktion im direkten und indirekten Format vorliegt.

Tabelle 8: Vergleich der Testmittelpunkte (C) von Microcystin-LR und Microcystin-LA und der Kreuzreaktion von Microcystin-LA im direkten ELISA-Format bei zwei verschiedenen Tracerinkubationszeiten.

Inkubationszeit [h] Tracer	C_{MC-LR} [$\mu\text{g/L}$]	C_{MC-LA} [$\mu\text{g/L}$]	Kreuzreaktion $CR_{50\%}$ [%]
0.25	0.25 ± 0.02	0.22 ± 0.02	115 ± 16
19	0.46 ± 0.14	0.42 ± 0.09	110 ± 57

Zwar steigt der Testmittelpunkt (C_{MC-LX}) bei der langen Inkubationszeit von 19 h um nahezu das Doppelte an, was einer Abnahme der Empfindlichkeit entspricht, doch tritt keine Änderung der Kreuzreaktion auf. Es kann folglich vermutet werden, daß die Abhängigkeit der Kreuzreaktion von der Tracerinkubationszeit im indirekten Format stärker ausgeprägt ist als im direkten Format.

2.5 Einfluß von Störungen (Salzgehalt, Tenside, Huminstoffe, pH-Wert)

Je nach dem Einsatzgebiet des Immunoassays kann der Antikörper und der Enzymtracer verschiedenen Störkomponenten ausgesetzt sein. Zum einen sind das Komponenten von natürlichen Gewässern im Falle der Messung von Realproben. Es kann sich jedoch auch um organische Lösungsmittel handeln, wenn cyanobakterielle Extrakte untersucht werden oder wenn der Immunoassay als Detektor einer chromatographischen Trennung an Umkehrphasen eingesetzt wird. Die Störung der Analyt-Antikörper-Bindung kann manchmal durchaus erwünscht sein, z. B. wenn im Falle der Immunoaffinitäsextraktion die Bindung gelöst werden soll, um den Analyten zu eluieren.

Prinzipiell können Störkomponenten zweierlei Auswirkungen auf Immunoassays haben. Einerseits können sie die Stabilität von Antikörpern und Enzymen schwächen und zu deren Denaturierung führen. Andererseits können sie Auswirkungen auf die Affinität der Ligand-Rezeptor-Bindung (Analyt-Antikörper- oder Enzym-Substrat-Bindung) haben. Dies kann damit erklärt werden, daß hydrophobe und ionische Wechselwirkungen an der Ligand-Rezeptor-Bindung beteiligt sind und sich daher der Zusatz von organischen Lösungsmitteln, die Änderung der Ionenstärke oder des pH-Wertes auf die Bindungsstärke unmittelbar auswirkt. Nimmt beispielsweise der Testmittelpunkt eines Assays bei Zusatz von organischen Lösungsmitteln stark zu, was bedeutet, daß die Affinität abnimmt, so kann davon ausgegangen

werden, daß hydrophobe Wechselwirkungen maßgeblich am Zustandekommen der Analyt-Antikörper-Bindung beteiligt sind. Die Auswirkungen von "Störungen" auf die Affinität eines Antikörpers zu verschiedenen Analyten ist von WELLER in einem interessanten Experiment beschrieben worden [194, S. 198]. Er zeigte, daß sich der Ladungszustand von Analyten durch Änderung des pH-Wertes einstellen läßt und sich dadurch die Stärke der Analyt-Antikörper-Bindung drastisch ändert. Störkomponenten beeinflussen folglich auch die Kreuzreaktionen eines Antikörpers.

EIKENBERG untersuchte den Einfluß von möglichen Störkomponenten auf die Stabilität des Antikörpers M8H5 [92, 321], indem sie diese als Analyten behandelte und das Signal bei unterschiedlichen Konzentrationen jeweils einer Störkomponente bestimmte. Um sicherzustellen, daß nur die Stabilität des Antikörpers und nicht des Enzymtracers bestimmt wurde, erfolgte zwischen der Vorinkubation der Störkomponente und der Tracerinkubation ein Zwischenwaschschritt. Das Tracervolumen und die Tracerkonzentration wurde an diese Testdurchführung angepaßt.

Tabelle 9: Stabilität des Antikörpers M8H5 im direkten ELISA (vgl. [92, 321]).

	10 % Inhibition (IC₁₀)*	50 % Inhibition (IC₅₀, Testmittelpunkt)*
Huminsäure	300 mg/L	20 000 mg/L
Salzgehalt (NaCl)	gesättigte Lösung	-
pH-Wert	2-10	-
Acetonitril	23 % (v/v)	31 % (v/v)

* Inhibitionsdauer: 30 Minuten bei Raumtemperatur.

Bei diesen Experimenten kommt der auf einer Oberfläche immobilisierte Antikörper mit der Störkomponenten aus der Lösung in Kontakt. Es handelt sich folglich um eine heterogene Interaktion. Möglicherweise erklärt sich hieraus, daß der Antikörper wesentlich robuster gegenüber Störeinflüssen ist als der Enzymtracer. Die Ergebnisse aus Tabelle 9 können nicht ungeprüft auf das indirekte Format übertragen werden, da bei letzterem Assayformat Wechselwirkungen in homogener Lösung möglich sind.

Der kombinierte Einfluß einer Störkomponente auf die Affinität und Stabilität von Tracer und Antikörper wurde beispielhaft für Methanol untersucht. Methanol wird sehr häufig zur Extraktion von cyanobakteriellen Trockenmassen verwendet und ist daher Bestandteil dieser Extraktproben. Abb. 41 zeigt Kalibrierkurven für Microcystin-LR, die für verschiedene Methanolkonzentrationen erhalten wurden.

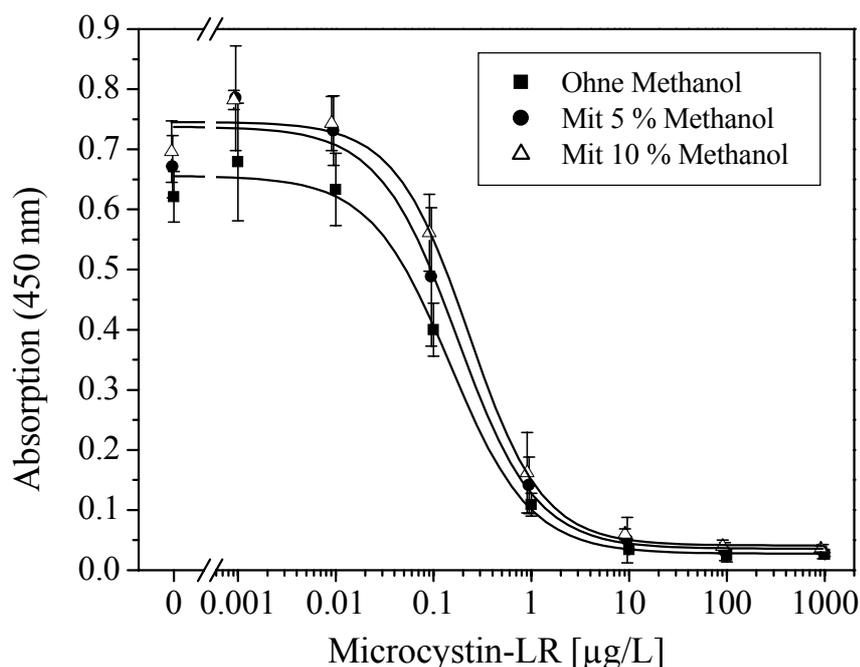


Abb. 41: Einfluß von Methanol auf die Affinität von Antikörper M8H5 zu Microcystin-LR im direkten ELISA.

Bedingungen: s. Abb. 39; M8H5 wurde affinitätsgereinigt 1:500 000 eingesetzt. Testmittelpunkt: ohne Methanol: $0.15 \pm 0.02 \mu\text{g/L}$; mit 5 % Methanol: $0.17 \pm 0.05 \mu\text{g/L}$; mit 10 % Methanol: $0.23 \pm 0.05 \mu\text{g/L}$.

Durch Zusatz von 10 % Methanol erhöht sich der Testmittelpunkt um Faktor 1.53. Dies entspricht einer Abnahme der Bindungsenergie um 1 kJ/mol und liegt damit durchaus im Bereich von Energiebeiträgen hydrophober Wechselwirkungen. Als Vergleich kann der Wert von 3 kJ/mol dienen, der beim Entfernen einer CH_2 -Gruppe aus wäßriger Lösung frei wird [1, S. 173-180]. Das Ergebnis zeigt jedoch nicht nur, daß hydrophobe Wechselwirkungen mit großer Wahrscheinlichkeit an der Analyt-Antikörper-Bindung beteiligt sind, sondern daß die Empfindlichkeit des Immunoassays auch bei Zusatz von 10 % Methanol (v/v) ausreicht, um die Erfordernis der Messung des vorläufigen Grenzwertes für Microcystin-LR von $1 \mu\text{g/L}$ zu erfüllen.

2.6 Messung von Wasserproben

Für die Messung von Wasserproben muß die in Abschnitt 2.3 beschriebene Testdurchführung des optimierten direkten ELISA leicht abgewandelt werden. Statt Phosphatpuffer wird TRIS-Puffer zur Verdünnung des Enzymtracers verwendet, um dem Ausfallen schwerlöslicher Calciumphosphate aus kalkhaltigen Wasserproben vorzubeugen. Um Störungen durch

Huminstoffe, Schwermetalle, Variation der Ionenstärke oder extreme pH-Werte zu vermindern, wird eine konzentrierte Pufferlösung eines neutralen TRIS-Puffers mit Zusätzen von Rinderserumalbumin (BSA), Chelatbildnern wie EDTA und Salz vorgelegt, bevor die Probe zugegeben wird.

Die Tauglichkeit des etablierten ELISA ist in Abb. 42 anhand einer mit verschiedenen Konzentrationen Microcystin-LR gespikten Probe (Kirchsee, Landkreis Ebersberg, Bayern) veranschaulicht.

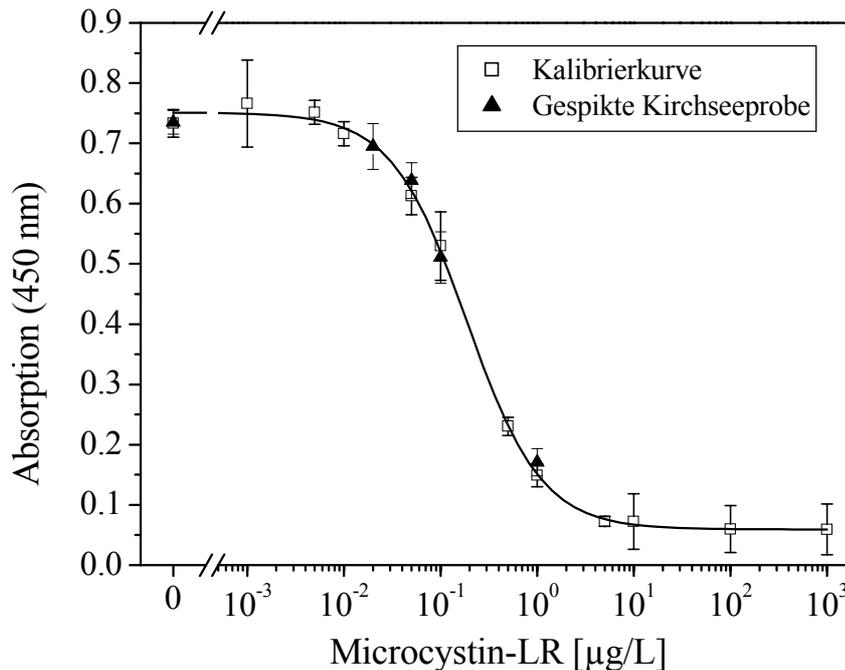


Abb. 42: Vergleich der Kalibrierkurve für Microcystin-LR und einer mit Microcystin-LR gespikten Realprobe.

Bedingungen: Anti-Maus-IgG in Coatingpuffer, 1:3 000, 200 µL, 6 h; M8H5-Ak (affinitätsgereinigt, in PBS), 1:500 000, 200 µL, 1.5 h; vorgelegter Blockingpuffer: TRIS (1 M, pH 7.4), 1 % (m/v) BSA, 1 % (m/v) EDTA Natriumsalz, 87.6 g/L NaCl, 20 µL/Napf; Microcystin-LR-Standard, 200 µL, 35 min; MCLR-SH-POD in TRIS (1 M, pH 7.4), 1:2 000, 50 µL, 15 min; Substrat TMB/H₂O₂, 200 µL, 9 min; Abstoppen 100 µL. Testparameter: maximale Absorption = 0.75, minimale Absorption = 0.06, Testmittelpunkt = 0.19 µg/L, Steigung = 1.11; Fehler: Spannweite. Nachweisgrenze (Nullwert - 3s): 27 ng/L, n = 13; Wiederfindung: 95 ± 13 % (n = 4).

Wasser des Kirchsees, aufgestockt mit Microcystin-LR in vier verschiedenen Konzentrationen des Meßbereichs, wurde getestet. Für alle Konzentrationen gibt es eine gute Übereinstimmung mit Absorptionswerten, die für Microcystinstandards in Reinstwasser erhalten wurden. Die niedrigste Konzentration (0.02 µg/L) liegt allerdings bei diesem Assay knapp unterhalb der Nachweisgrenze von 27 ng/L. Um den Nullwert statistisch besser abzusichern und um sicherzugehen, daß kein systematischer Trend der Absorptionen zu kleineren oder größeren Werten auf der Mikrotiterplatte auftritt, wurden insgesamt 13 Nullwerte, verteilt auf der Mikrotiterplatte gemessen. Die Kalibrierkurve des direkten ELISAs zeigt bei dieser Testdurchführung keine wesentlichen Änderungen der Parameter gegenüber derjenigen ohne

Blockingpuffer. Bei dem Vergleich der Testmittelpunkte muß berücksichtigt werden, daß durch den Zusatz des Blockingpuffers eine Verdünnung der Microcystinstandards erfolgt. Dies hat jedoch keine Auswirkungen auf die Bestimmung der Konzentration von Realproben, da Standards und Proben gleichermaßen verdünnt werden. Die hier vorgestellte Testdurchführung ist sehr gut für die Messung von Microcystin in Oberflächengewässern geeignet.

2.7 Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

Ein direkter kompetitiver ELISA zur Bestimmung von Microcystinen mit monoklonalen M8H5-Antikörpern wurde entwickelt und charakterisiert. Die Kreuzreaktionen des Antikörpers in diesem Assayformat sind sehr ähnlich und erlauben eine Summenbestimmung von Microcystinen in einer Probe. Der Testmittelpunkt des Assays liegt bei 0.14 µg/L Microcystin-LR, die Nachweisgrenze beträgt 14 ng/L. Diese Werte liegen deutlich unter dem vorläufigen Grenzwert von 1 µg/L Microcystin-LR, der von der Weltgesundheitsorganisation vorgeschlagen wurde. Der Antikörper M8H5 ist im pH-Bereich zwischen 2 und 10 stabil, ebenso gegenüber 20 % Acetonitril, 300 mg/L Huminsäure und gesättigter Natriumchloridlösung. Die Tauglichkeit des Assays zur Messung von Oberflächengewässern wurde am Beispiel einer mit Microcystin-LR aufgestockten Wasserprobe des Kirchsees demonstriert.

3 Herstellung von monoklonalen Microcystin-LR-Antikörpern

Dieses Kapitel beschreibt die Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper, die [Arg⁴]Microcystine hochempfindlich und sehr selektiv erkennen. Die Herstellung mehrerer Antikörper, die eine Substanzklasse mit unterschiedlicher Selektivität erkennen, ist insbesondere für die Entwicklung von Immunosensor-Arrays [232] und für eine partielle Strukturklärung mittels immunologischer Verfahren von Interesse. Zudem muß oft eine eigene Herstellung von Antikörpern oft erfolgen, da bereits existierende Antikörper nicht oder nur unter Einschränkungen erhältlich sind.

3.1 Auswahl der Haptenstruktur und des Trägerproteins

Als Hapten wurde Microcystin-LR gewählt, da dieses sehr häufig in Wasserproben cyanobakteriell belasteter Gewässer vorkommt, der vorläufige Grenzwert der Weltgesundheitsorganisation sich auf dieses Microcystin bezieht und es kommerziell am besten verfügbar ist. Als Kopplungsstelle wurde wie bei der Synthese des Enzymtracers die α,β -ungesättigte Carbonylgruppe der Aminosäure 7 (vgl. Abb. 43) gewählt. Diese Kopplungsstelle liegt auf der gegenüberliegenden Seite der Aminosäure Adda, die die gemeinsame Teilstruktur der Microcystine darstellt, jedoch auch gegenüber der variablen Aminosäure Arginin, die die positiv geladene Guanidiniumgruppe besitzt. Der Vorteil, dieser Kopplungsstelle gegenüber den Carboxylgruppen, die von NAGATA et al. [149] zur Kopplung gewählt wurden, besteht darin, daß der Ladungszustand des Moleküls während der Kopplung erhalten bleibt. Dies ist wichtig für die optimale Erkennung des ungekoppelten Analyten durch die gebildeten Antikörper. Zudem ist die Immunogenstruktur besser definiert.

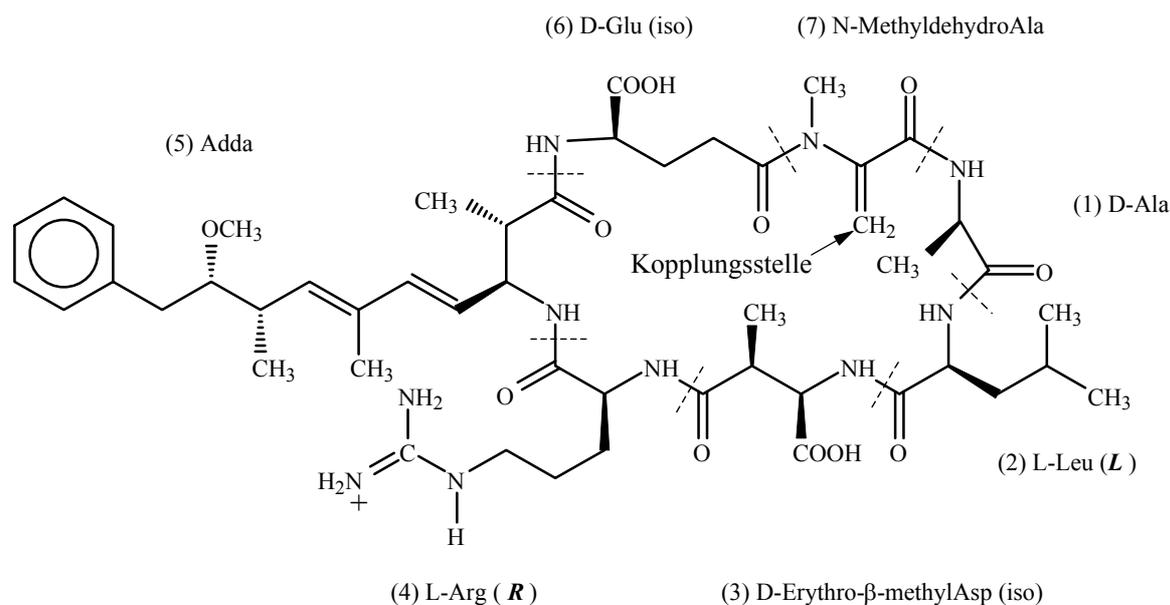


Abb. 43: Struktur von Microcystin-LR mit Kopplungsstelle für das Trägerprotein.

Als Trägerproteine wurden im Verlaufe der Immunisierungen unterschiedliche Proteine eingesetzt. Tabelle 10 zeigt eine Übersicht häufig verwendeter Trägerproteine und ihrer Eigenschaften.

Tabelle 10: Anzahl der Aminogruppen für ausgewählte Proteine.

Protein (Molmasse [kDa])	Amino- gruppen	Lysine pro Proteinmasse [%]
KLH-Untereinheiten (350-390) ⁽¹⁾	67	0.018
BSA (66.5) [322]	60	0.090
OVA (45) [238, S. 426]	20	0.044
cOVA (48) [238, S. 426]	68	0.142

⁽¹⁾ Die Anzahl der Lysine wurde aus der Aminosäureanalyse des Lieferanten der KLH Untereinheiten (Biosyn, Fellbach, Deutschland) berechnet.

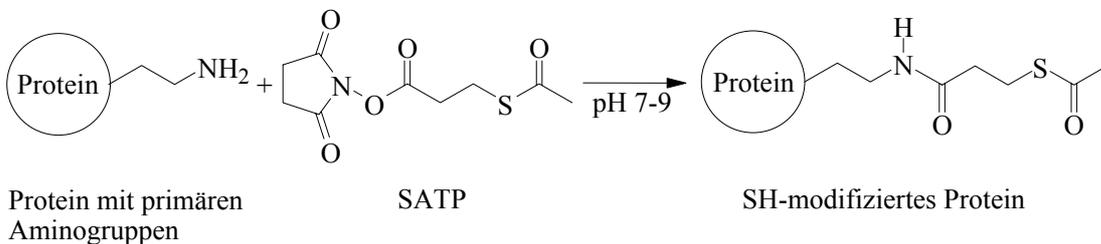
Abkürzungen: KLH: Keyhole Limpet Hemocyanin; BSA: Rinderserumalbumin; OVA Ovalbumin; cOVA kationisiertes Ovalbumin.

KLH ist ein sehr großes Protein, dessen Untereinheiten Molmassen zwischen 350 und 390 kDa besitzen. Die Anzahl der Lysine, aus der die maximale Kopplungsdichte abgeschätzt werden kann, ist im Vergleich dazu jedoch gering. KLH-Untereinheiten besitzen nahezu gleich viele Lysine wie BSA, welches eine fünfmal kleinere Molmasse besitzt. Die geringe Zahl der Lysine pro Proteinmolekül trägt nicht nur zu niedrigen Kopplungsdichten pro Molmasse, sondern auch zu einer relativ schlechten Löslichkeit von Kopplungsprodukten bei. Die größte Anzahl von kopplungsfähigen Aminogruppen pro Proteinmasse wird durch Derivatisierung der Carboxylgruppen mit einem Diamin erhalten, wie dies für cOVA in Tabelle 10 dargestellt ist. Kopplungsdichte und Verfügbarkeit des Haptens für das Immunsystem können folglich durch die Wahl des geeigneten Trägerproteins gesteuert werden.

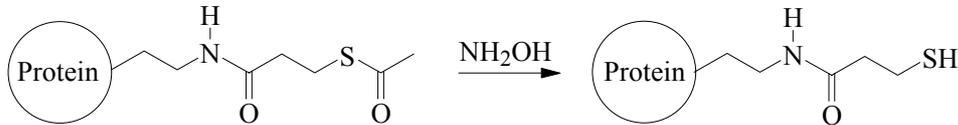
3.2 Synthese und Charakterisierung des Immunkonjugats

Das allgemeine Reaktionsschema der Synthese von Microcystin-LR-Immunkonjugaten ist in Abb. 44 dargestellt. Im Unterschied zu der Derivatisierung der Meerrettich-Peroxidase wurde die Thiolgruppe nicht über das TRAUT'S Reagenz, sondern über Succinimidylacetylthio- propionat (SATP) eingeführt, welches nicht geladen ist. Dadurch sollte verhindert werden, daß die Struktur des Verbindermoleküls (Spacers) miterkannt wird. Im zweiten Reaktions- schritt wird die Acetylschutzgruppe mit Hydroxylamin gespalten. Anschließend wird das Thiol an die α,β -ungesättigte Carbonylgruppe des Microcystins gekoppelt, wobei ein neues Stereozentrum am α -Kohlenstoff der Aminosäure 7 entsteht.

1. Schritt: SH-Modifizierung des Proteins



2. Schritt: Spaltung des Thioesters



3. Schritt: Kopplung des Microcystins (Nukleophile Addition an vinyloge Carbonylverbindung)

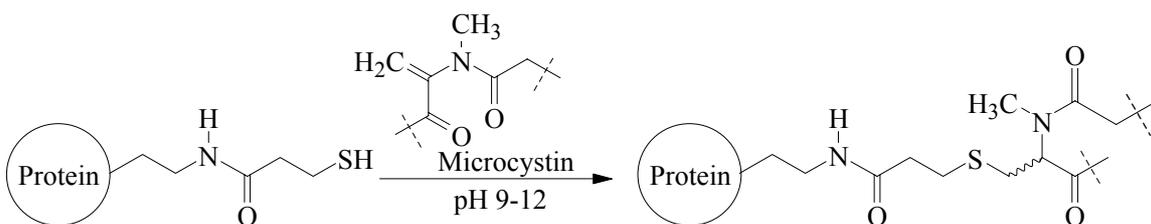


Abb. 44: Reaktionsschema zur Synthese von Microcystin-LR-Immunkonjugaten.

Werden kationisierte Trägerproteine eingesetzt, so erfolgt im ersten Schritt die Derivatisierung der Carboxylgruppen des Proteins, wie in Abb. 45 dargestellt.

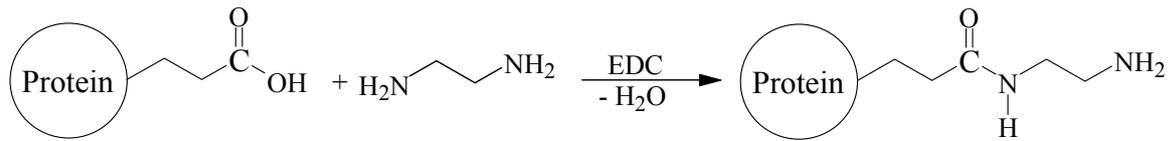


Abb. 45: Synthese von kationisierten Proteinen [238, S. 100-114]. EDC: N-Ethyl-N'-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimid.

Die Aufreinigung des kationisierten Proteins erfolgt mittels Gelchromatographie an Sephadex-PD-10-Säulen. Die Proteinfractionen und die Fractionen des ungekoppelten Diamins können sichtbar gemacht werden, indem von jeder Fraction ein Aliquot in eine zweite Mikrotiterplatte übertragen wird, welche eine basische TNBS-Lösung (2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure) enthält (vgl. Abb. 46).

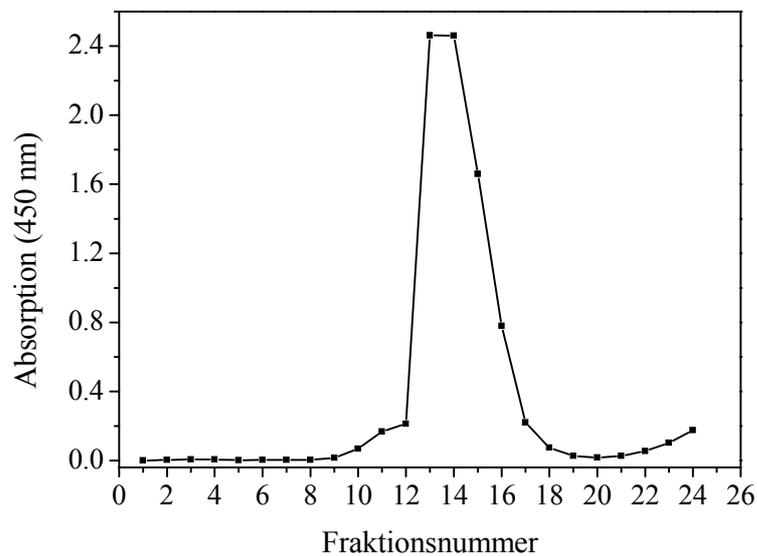


Abb. 46: Detektion der gelchromatographischen Reinigung von kationisiertem Ovalbumin (cOVA) an Sephadex-PD-10 mittels TNBS [238, S. 112-113]. Hier ist nur der Proteinpeak dargestellt.

Bedingungen für Gelchromatographie von cOVA: Aufgabevolumen 0.6 mL (4 g/L cOVA), Fraktionsgröße 4 Tropfen/Napf (ca. 220 μ L), Fractionen werden in Kavitäten einer Mikrotiterplatte aufgefangen. Bedingungen für Detektion mit TNBS: 100 μ L/Napf TNBS-Lösung (1 g/L in Boraxpuffer pH 9.2), 5 μ L/Napf der gelchromatographischen Fractionen zugeben, 10 Minuten schütteln, bei 450 nm messen.

Der Erfolg der Kationisierung kann ebenfalls mit Hilfe der TNBS-Methode überprüft werden. Hierbei wird sowohl das native als auch das derivatisierte Protein mit TNBS in basischem Puffer versetzt und die Absorptionsspektren der Proteine mit und ohne TNBS gemessen. Durch Reaktion einer Aminogruppe mit TNBS entsteht ein gelbes 2,4,6-Trinitrophenylaminderivat, welches bei 420 nm ein lokales Absorptionsmaximum besitzt (vgl. Abb. 47). Setzt man die Absorption des TNBS-modifizierten kationisierten Proteins ins Verhältnis zu der Proteinabsorption bei 278 nm und vergleicht dieses Verhältnis mit demjenigen, das für

das native Protein erhalten wird, so erhält man den Faktor, um den sich die Anzahl der zugänglichen Aminogruppen durch Kationisierung erhöht hat. Im Fall von Ovalbumin ist eine quantitative Derivatisierung aller zugänglichen Carboxylgruppen möglich.

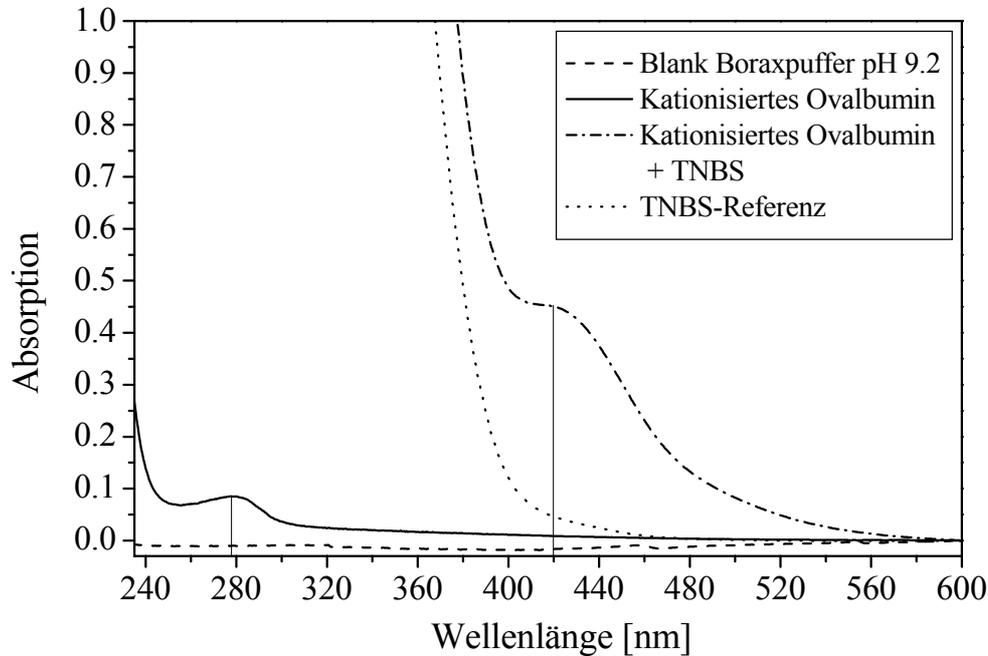


Abb. 47: Überprüfung der Kationisierung von Proteinen durch TNBS-Modifizierung.

Bedingungen: je 5 μL der Fraktionen der gelchromatographischen Trennung, die cOVA enthalten, werden vereinigt, mit 600 μL Boraxpuffer (pH 9,2, 0,1 M) versetzt und das Absorptionsspektrum wird gemessen (Spur des kationisierten Ovalbumins). 70 μL TNBS-Lösung (17 g/L in Boraxpuffer) werden zugegeben und nach 10 Minuten das Absorptionsspektrum gemessen (Spur des kationisierten Ovalbumins + TNBS). Zusätzlich wird die TNBS-Referenz gemessen.

Ebenso wie die Überprüfung der Kationisierung eines Proteins kann die Überprüfung der gelchromatographischen Reinigung und des Thiolierungsgrades eines SH-modifizierten Proteins mit einem Reagenz erfolgen, dessen Reaktion mit Thiolen zu einem farbigen Thiolat führt (s. Abb. 48).

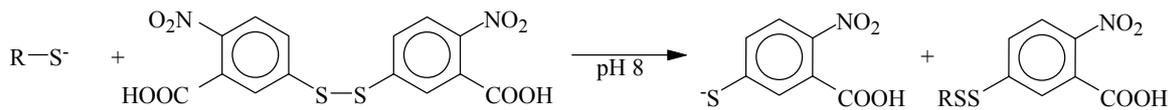


Abb. 48: Test mit ELLMAN's Reagenz (5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)) auf Thiole [238, S. 88-90]. Das Thiolat der 5-Thio-2-nitrobenzoesäure besitzt ein Absorptionmaximum bei 412 nm ($\epsilon = 13\,600\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Das Monitoring der gelchromatographischen Trennung eines Reaktionsansatzes zur SH-Modifizierung von KLH mit SATP ist in Abb. 49 dargestellt.

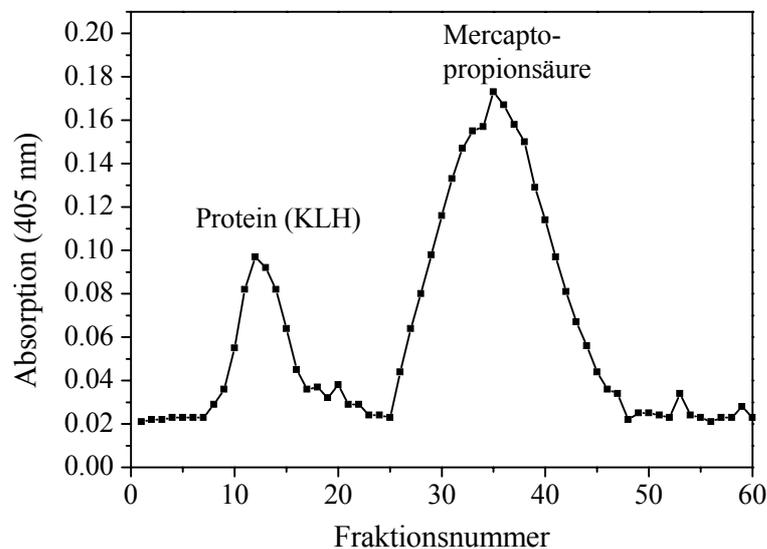


Abb. 49: Monitoring der gelchromatographischen Reinigung von SH-modifizierten KLH an Sephadex-PD-10 mittels ELLMAN's Reagenz (2. Schritt, Abb. 44).

Bedingungen für Gelchromatographie von KLH: Aufgabevolumen 0,75 mL (Elutionspuffer 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,7 + 1 mM EDTA), Fraktionsgröße 4 Tropfen/Napf (ca. 220 μ L), Fraktionen werden in Kavitäten einer Mikrotiterplatte aufgefangen. Bedingungen für Monitoring mit ELLMAN's Reagenz: 100 μ L/Napf ELLMAN's-Lösung (5 mM in Elutionspuffer), 5 μ L/Napf der gelchromatographischen Fraktionen zugeben, 2 Minuten schütteln, bei 405 nm messen.

Die Quantifizierung der SH-Gruppen kann durch Vergleich der Absorption des ELLMAN's Testes des Proteins mit einer Standardverbindung (z. B. Cystein) erfolgen. Der auf diese Weise bestimmte Modifizierungsgrad von cOVA betrug 23,5 Mol SH-Gruppen pro Mol Protein. Da durch die SH-Modifizierung geladene, hydrophile Gruppen in hydrophobe Thiolgruppen überführt werden, sinkt die Löslichkeit des Proteins. Das Microcystin-LR-cOVA-Konjugat war aus diesem Grund unlöslich. Für die Synthese des löslichen Microcystin-LR-cOVA-Konjugats wurde das SH-modifizierende Reagenz im Unterschuß zu den koppelbaren Aminogruppen zugegeben. Nach der gelchromatographischen Reinigung des SH-modifizierten Proteins in einem neutralen Puffer werden die Proteinfraktionen vereinigt und mit einer konzentrierten Microcystin-LR-Lösung versetzt. Die Reaktion wird durch Einstellen des pH-Wertes auf 12 gestartet. Nach Beendigung der Reaktion wird Iodacetat zugegeben, um die verbliebenen freien SH-Gruppen zu blockieren und eine Quervernetzung der Proteine durch Bildung von S-S-Brücken zu verhindern. Die Reinigung des löslichen Konjugates erfolgte wie beim Enzymtracer mit einer Sephadex-G-25F-Säule von 22 cm Höhe und 1 cm Durchmesser. Das unlösliche Konjugat wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBS-Puffer gereinigt. Für die Überprüfung des Kopplungserfolges können mehrere Methoden dienen. Eine sehr empfindliche Methode besteht darin, einen indirekten nichtkompetitiven ELISA durchzuführen. Bei diesem Assay, der nur möglich ist, wenn bereits ein Antikörper gegen das

Hapten existiert, werden lediglich die an das Trägerprotein KLH kovalent gekoppelten Microcystinmoleküle nachgewiesen, da alle anderen im darauffolgenden Waschschritt entfernt werden. Die Proteinfraktionen lassen sich im Falle von KLH einfach durch Messung der Absorption bei 405 nm nachweisen. Wie in Abb. 50 zu erkennen, liegt der Proteinpeak und der Peak des gekoppelten Microcystins genau übereinander.

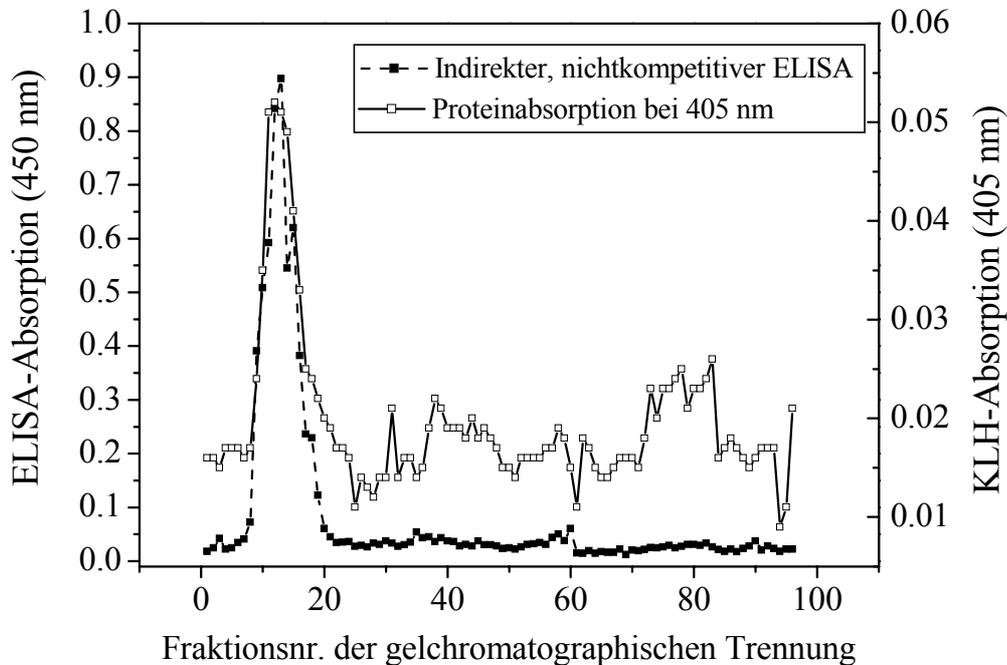


Abb. 50: Überprüfen der Kopplung des Microcystin-LR an das Trägerprotein KLH.

ELISA-Bedingungen: 1. Konjugatinkubation: Fraktionen 1:8 000 verdünnt; 200 μ L in Coatingpuffer, 16 h; 2. Waschen; 3. Blocken: 1%ige BSA in PBS, 250 μ L, 3 h. 4. Waschen; 5. M8H5-Antikörper: 1:25 000 Zellüberstand in PBS; 200 μ L, 2 h; 6. Waschen; 7. Antikörper anti-Maus-POD: 1:25 000 in PBS, 200 μ L, 30 Minuten; 8. Waschen; 9. Entwickeln.

Eine weitere Möglichkeit, den Kopplungserfolg zu überprüfen, besteht darin das Konjugat zu hydrolysieren und den Peak der microcystinspezifischen Aminosäure *D-erythro*- β -Methylaspartat nach Derivatisierung und HPLC mit Fluoreszenzdetektion im Hydrolysat nachzuweisen. Zur quantitativen Bestimmung der Kopplungsdichte wird die Peakfläche der microcystinspezifischen Aminosäure mit der Peakfläche einer Referenzaminosäure des Trägerproteins verglichen. Letztere sollte nicht in Microcystin enthalten sein.

Experimentell wurde zunächst untersucht, wie sich diese seltene Aminosäure *D-erythro*- β -Methylaspartat bei der Hydrolyse verhält und ob ihre Retentionszeit mit der einer anderen, proteinogenen Aminosäure zusammenfällt. Das Ergebnis ist in Abb. 51 und Abb. 52 zu sehen. *D,L-erythro*- β -Methylaspartat hat, wie in Abb. 51 zu sehen, dieselbe Retentionszeit wie Aspartat, liefert jedoch nach der Hydrolyse einen weiteren Peak, der gut reproduzierbar ist, so daß eine Quantifizierung erfolgen kann. Bei diesem zusätzlichen Peak kann es sich um ein Racemisierungsprodukt handeln.

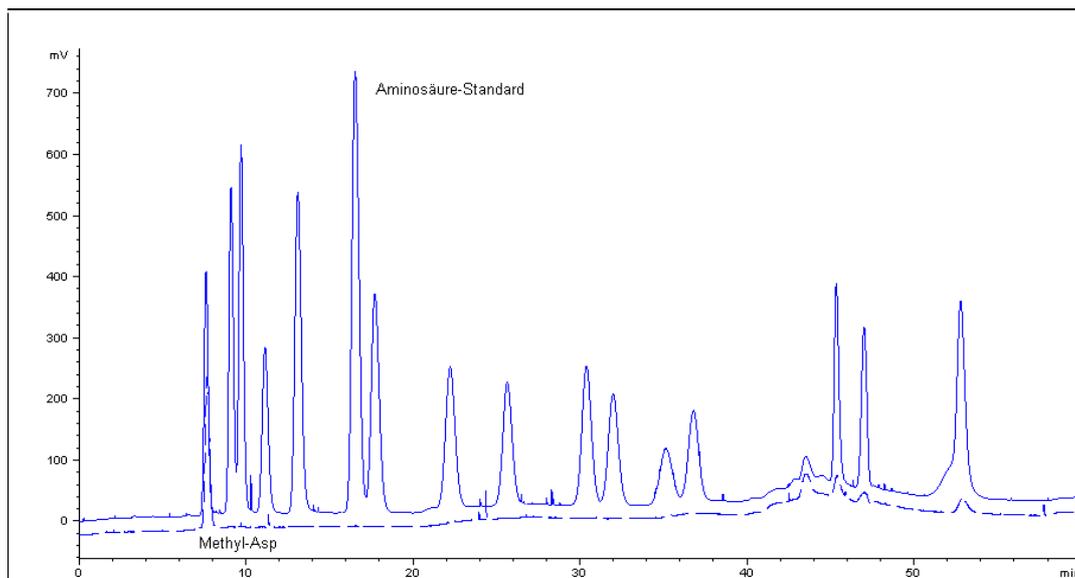


Abb. 51: Vergleich der Retentionszeiten eines Aminosäure-Standardgemisches und *D,L*- β -Methylaspartat gemessen mittels Fluoreszenz-HPLC. *D,L*- β -Methylaspartat eluiert gleichzeitig mit *Aspartat*. Diese Arbeiten wurden an der Fachhochschule Bingen im Laboratorium von Prof. Dr. E. Reh durchgeführt.

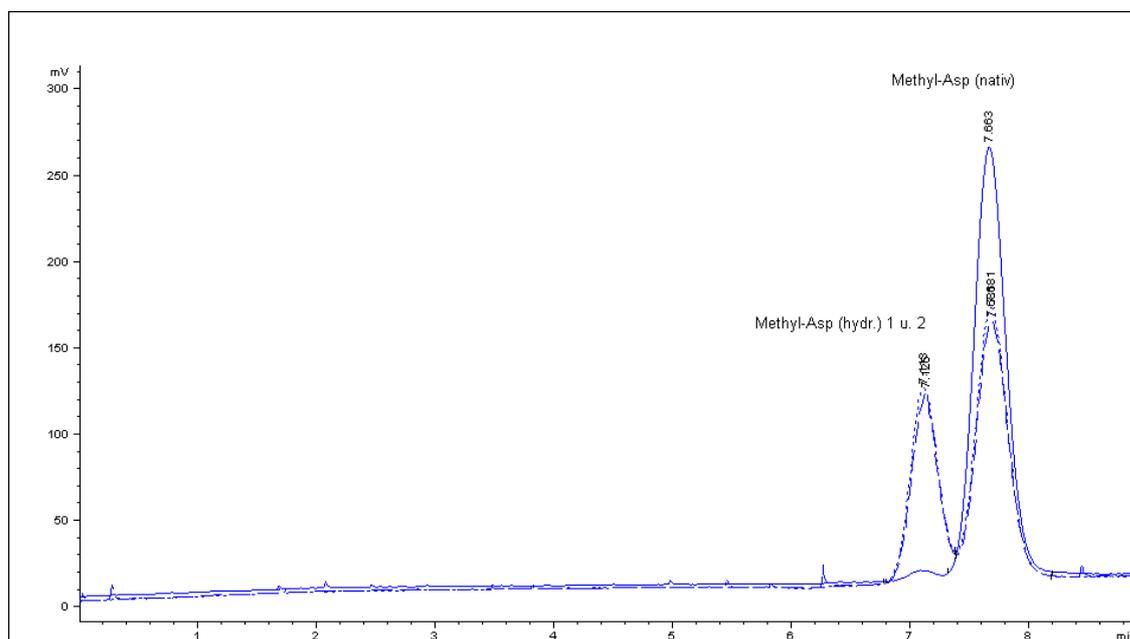


Abb. 52: Fluoreszenz-HPLC-Chromatogramm des *D,L*- β -Methylaspartats vor und nach der *Hydrolyse*. Diese Arbeiten wurden an der Fachhochschule Bingen im Laboratorium von Prof. Dr. E. Reh durchgeführt.

Nach der Bestimmung der Hydrolysekinetiken von Microcystin-LR, des Trägerproteins KLH und des synthetisierten Konjugates, wurde die Peakfläche des Hydrolysats von *erythro*- β -Methylaspartat mit der Peakfläche einer trägerproteinspezifischen Aminosäure verglichen (Abb. 53) und eine ungefähre Kopplungsdichte von 5-10 % der kopplungsfähigen Amino- gruppen errechnet. Diese Kopplungsdichte kann nur ein Schätzwert sein, da die genaue Mol- masse der KLH-Untereinheiten nicht bekannt ist.

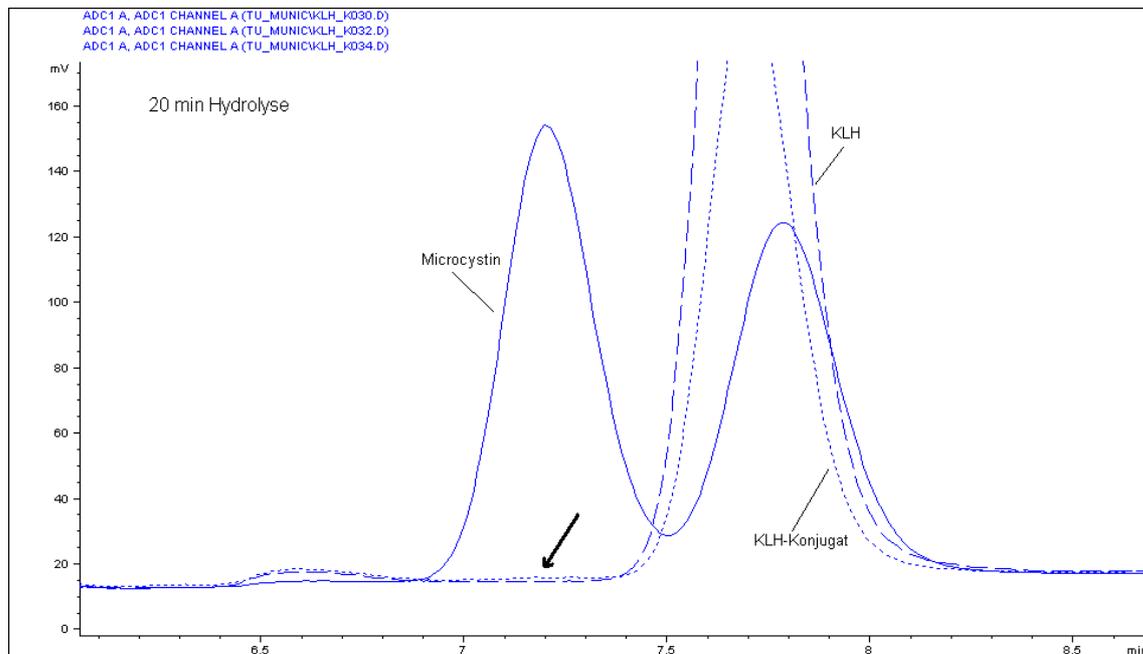


Abb. 53: Vergleich der Fluoreszenz-HPLC-Chromatogramme von hydrolysiertem Microcystin-LR, KLH und Microcystin-LR-KLH-Konjugat. Diese Arbeiten wurden an der Fachhochschule Bingen im Laboratorium von Prof. Dr. E. Reh durchgeführt.

Im Fall der Immunkonjugate, bei denen cOVA als Trägerprotein verwendet wurde, wurde die Kopplungsdichte durch Bestimmung der abreagierten Menge Microcystin-LR ermittelt. Diese Methode ist verglichen mit den anderen Methoden recht einfach und zuverlässig. Sie kann allgemein für die Bestimmung von Kopplungsdichten verwendet werden, wenn ein chromatographisches Verfahren zur Quantifizierung des freien Analyten existiert. Zusätzlich kann sie zur Kontrolle des Umsatzes während der Reaktion dienen. Zur Bestimmung des nicht abreagierten Haptens wird ein Aliquot der Reaktionslösung entnommen, das Protein wird durch Zugabe von organischem Lösungsmittel denaturiert und abgetrennt. Das freie Hapten wird nach entsprechender Verdünnung in der HPLC quantifiziert. Auf diese Weise wurde bestimmt, daß das lösliche Microcystin-LR-cOVA-Konjugat 13 Microcystine pro Proteinmolekül besaß.

3.3 Verlauf der Immunisierungen

3.3.1 Immunisierung mit Microcystin-LR-KLH-Konjugat

Die erste Immunisierung wurde mit löslichem Microcystin-LR-KLH-Konjugat an vier Mäusen der Rasse BalbC durchgeführt. Es wurde viermal im Abstand drei bzw. zwei Monaten immunisiert. Nach der ersten Immunisierung waren die Mäuse negativ, nach der zweiten zeigten drei der vier Mäuse eine positive Reaktion, allerdings einen niedrigen Antikörpertiter. Im Verlaufe der Immunisierungen konnte weder eine Erhöhung des Antikörpertiters noch der Affinität des Serums festgestellt werden. Abb. 54 zeigt beispielhaft die Kalibrierkurven der Seren der Mäuse 1 und 3 nach der dritten Immunisierung.

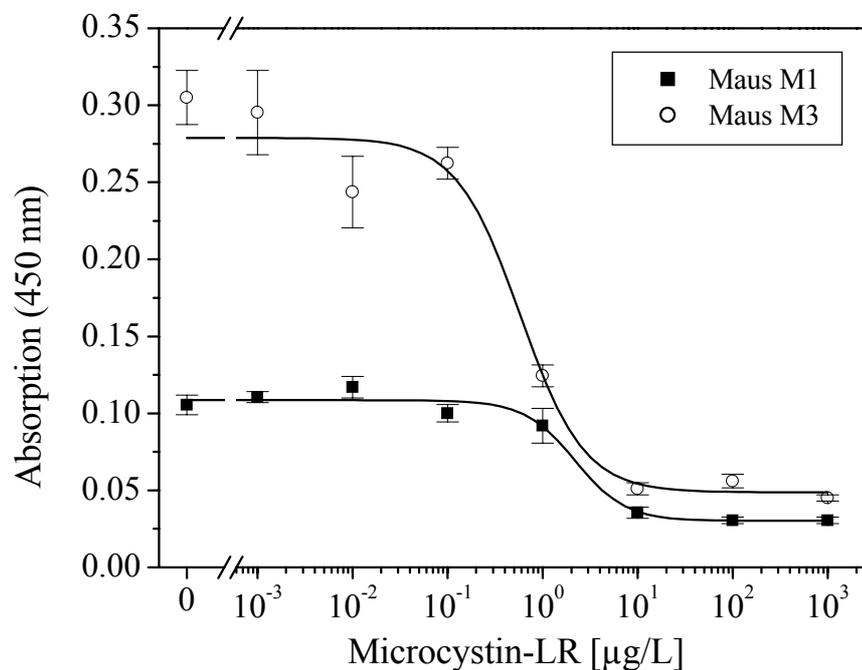


Abb. 54: Kalibrierkurven für Microcystin-LR mit den Seren der Mäuse M1 und M3 nach der dritten Immunisierung.

Bedingungen: Anti-Maus-IgG, 1:3 000, 200 µL, 30 h; Mausseren, 1:5 000, 200 µL, 1 h; Microcystin-LR-Standard, 200 µL, 30 min; MCLR-SH-POD, 1:500, 50 µL, 15 min; Substrat TMB/H₂O₂, 200 µL, 24 min; Abstoppen 100 µL. Testparameter Maus M1: maximale Absorption = 0,11, minimale Absorption = 0,03, Testmittelpunkt = 2,19 µg/L, Steigung = 1,63. Testparameter Maus M3: maximale Absorption = 0,28, minimale Absorption = 0,05, Testmittelpunkt = 0,58 µg/L, Steigung = 1,29; Fehler: Spannweite.

Da keine Änderung der Immunantwort bezüglich der Erkennung von Microcystin-LR beobachtet wurde, kann vermutet werden, daß sich das Immunsystem der Tiere auf ein anderes Epitop des Immunogens konzentrierte. Der Versuch, Microcystin-LR-produzierende Zellen durch Fusion der Maus M3 nach der vierten Immunisierung zu erzeugen, war erfolglos.

3.3.2 Immunisierung mit Microcystin-LR-cOVA-Konjugat

Zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern wurden drei weibliche NMRI- und vier weibliche BNR-Mäuse intraperitoneal mit 5 µg Microcystin-LR-cOVA immunisiert. Die Primärimmunisierung wurde mit vollständigem FREUNDSchen Adjuvans durchgeführt und bei den Nachimmunisierungen wurde unvollständiges FREUNDSches Adjuvans verwendet. Für die ersten beiden Immunisierungen wurde unlösliches Immunogen eingesetzt und ab der dritten Immunisierung wurde lösliches Immunogen verwendet. Die Immunisierungen wurden im Abstand von fünf Wochen durchgeführt. Blut zur Kontrolle der Immunantwort wurde jeweils vier Wochen nach den ersten beiden Immunisierungen und eine Woche nach der dritten Immunisierung entnommen.

Die gewählte Dosis von 5 µg Immunogen pro Immunisierung ist verglichen mit Immunisierungsprotokollen aus der Literatur relativ niedrig und sollte die Produktion hochaffiner Antikörper fördern. Auch tragen unlösliche Konjugate zu der geringeren Verfügbarkeit des Haptens bei. Diese Konjugate sind andererseits relativ stabil gegenüber enzymatischem Abbau und haben daher eine Langzeitwirkung (Depot-Effekt). Um hohe Antikörpertiter zu erhalten, die für eine Fusion nötig sind, sind jedoch lösliche Konjugate mit hohen Kopplungsdichten des Haptens besser geeignet. Die Auswirkungen der Immunisierung von zunächst unlöslichem und dann löslichem Immunogen sind in Abb. 55 zu sehen.

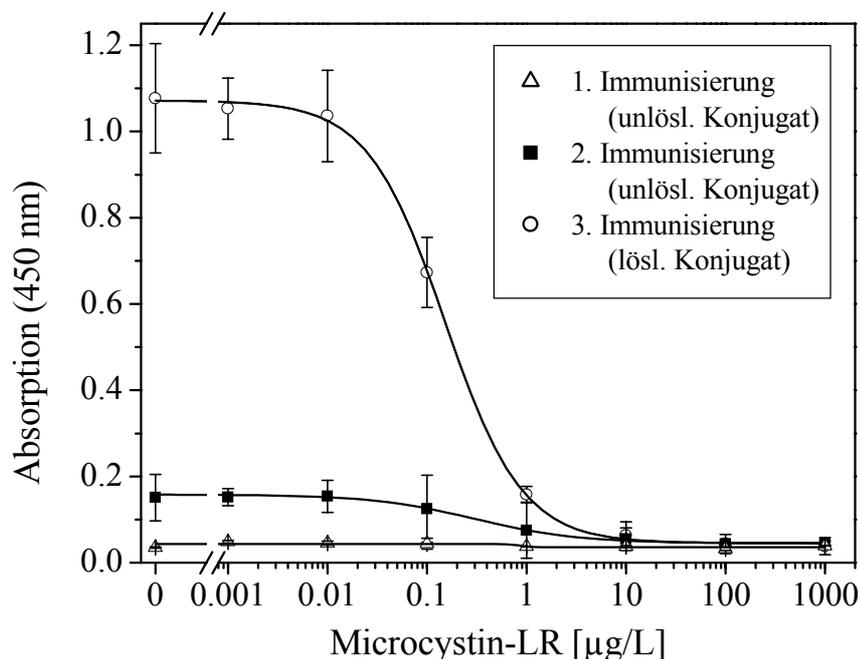


Abb. 55: Kalibrierkurven für Microcystin-LR mit den Seren der Maus NMRI 1 im Verlauf der Immunisierung.

Bedingungen: Anti-Maus-IgG, 1:3 000, 200 µL, 16 h; Serum NMRI 1, 1:4 333, 200 µL, 1 h; Microcystin-LR-Standard, 200 µL, 30 min; MCLR-SH-POD, 1:600, 50 µL, 15 min; Substrat TMB/H₂O₂, 200 µL, 16 min; Abstoppen 100 µL. Testmittelpunkte ([µg/L]): 1. Immunisierung: -; 2. Immunisierung: 0.31; 3. Immunisierung: 0.15. Maximale Absorption: 1. Immunisierung: 0.04; 2. Immunisierung: 0.12; 3. Immunisierung: 1.07. Fehler: Spannweite, n = 3.

Anhand der maximalen Absorption ist zu erkennen, daß der Antikörpertiter um Faktor 6.8 ansteigt, während sich die Affinität des Serums mindestens verdoppelt. Bei dieser Immunisierung scheint eine Fokussierung des Immunsystems auf das Hapten stattgefunden zu haben. Eine mögliche Erklärung hierzu wäre die SH-Modifizierung des Trägerproteins. Durch diese Modifizierung sind nur noch wenige geladene und damit besonders immunogene Gruppen auf der Oberfläche des Proteins vorhanden und das Hapten bietet sich als Angriffsfläche für die Moleküle des Immunsystems an.

Einen ähnlichen Verlauf der Immunantwort zeigte eine weitere NMRI-Maus und zwei der BNR-Mäuse. Der Tittersprung erfolgte bei diesen Mäusen allerdings erst nach der vierten Immunisierung. Die Testmittelpunkte sind stellvertretend für die Affinität, die maximalen Absorptionen stellvertretend für den Antikörpertiter in Tabelle 11 zusammengefaßt.

Tabelle 11: Parameter der fünften Immunisierung von 6 Mäusen der Rassen NMRI und BNR. Maus NMRI 1 war zu diesem Zeitpunkt schon fusioniert.

Die Daten wurden mit Hilfe des Microcystin-LR-ELISA (s. Abb. 55) erhalten bei einer Serumverdünnung von 1:4 000.

Maus	Testmittelpunkt [$\mu\text{g/L}$] Microcystin-LR	Maximale Absorption
NMRI 2	0.3	0.47
NMRI 3	0.1	0.03
BNR 1	1	0.1
BNR 2	0.4	0.08
BNR 3	0.3	0.49
BNR 4	0.4	0.21

Die Mehrzahl der Seren zeigten Testmittelpunkte von 0.3 bis 0.4 $\mu\text{g/L}$, welche etwas höher sind als derjenige von Maus NMRI 1 von 0.15 $\mu\text{g/L}$ nach der vierten Immunisierung. Die Seren der Mäuse mit positiver Immunantwort (NMRI 2, BNR 3 und BNR 4) wurden auf ihre Kreuzreaktion gegenüber Microcystin-LA getestet. Diese Kreuzreaktion wurde als Indiz dafür gewertet, ob sich die Erkennungsmuster der in den Seren enthaltenen Antikörper wesentlich voneinander unterscheiden. Die Seren aller Mäuse zeigten gegenüber Microcystin-LA eine wesentlich geringere Affinität als gegenüber Microcystin-LR. Daher wurde ein ähnliches Kreuzreaktionsmuster angenommen. Da Maus NMRI 1 den höchsten Antikörpertiter und die höchste Affinität zeigte, wurde diese Maus zur Produktion von Hybridomzellen ausgewählt.

3.4 Fusion und Screening zur Gewinnung eines monoklonalen Antikörpers

Zur Vorbereitung der Fusion wurde Maus NMRI 1 mit 50 µg des löslichen Microcystin-LR-cOVA-Konjugats ohne Zusatz von Adjuvans i. p. immunisiert. Nach vier Tagen wurde die Fusion durchgeführt und nach weiteren zehn Tagen konnten die ersten Zellüberstände getestet werden. Von 1536 mit Zellmedium befüllten Kavitäten wurden in 326 Kavitäten wachsende Zellen beobachtet, deren Zellkulturüberstand mit einem direkten nicht-kompetitiven ELISA auf vorhandene Microcystin-Antikörper getestet wurde. Als Grenzwert für positive Zellkulturüberstände wurde der gemittelte Nullwert zuzüglich sechs Standardabweichungen festgelegt. Nur ein einziger Zellkulturüberstand wurde mit dieser Screeningmethode positiv getestet. Dieser zeigte jedoch ein sehr deutliches Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 90.

In dieser Arbeit wurde mit dem Einsatz des direkten nicht-kompetitiven ELISA eine neue Methode des Screenings von Kulturüberstände verwendet. Die übliche Methode [184] besteht darin, Mikrotiterplatten mit Antigen zu beschichten und die Zellkulturüberstände in den Kavitäten zu inkubieren. Nach einem Waschschrift werden gebundene (Maus)-Antikörper mit dem kommerziell erhältlichen anti-(Maus-IgG)-Peroxidase-Konjugat markiert und nach einem weiteren Waschschrift enzymatisch nachgewiesen. Der Nachteil dieses Verfahren, des indirekten nicht-kompetitiven ELISA, besteht darin, daß aufgrund der Multivalenz des Antigens und des Antikörpers auch niedrigaffine Antikörper detektiert werden. Da die Affinität während des Screenings nicht bestimmt werden kann, stellt sich oft erst nach Reklonierung mehrerer positiver Hybridomzellen heraus, daß die produzierten Antikörper analytisch nicht interessant sind. Aufgrund der Monovalenz des Enzymtracers werden hingegen mit dem direkten nichtkompetitiven Format nur hochaffine Antikörper detektiert. Hier erfolgt zunächst die Immobilisierung der Antikörper. Positive Klone werden anschließend durch Bindung des Enzymtracers detektiert. Ein Vergleich der beiden Screeningmethoden ist bei WELLER [194, S. 209-211] zu finden. Er erhielt mit der indirekten Screening-Methode 10mal mehr positive Klone als mit der direkten. Während bei der indirekten Methode eine breite Signalverteilung der mutmaßlich positiven Klonen zu beobachten war, konnte beim direkten Screening deutliche Unterschiede zwischen positiven und negativen Klone festgestellt werden.

Der positiv getestete Klon (MC10E7) wurde zweimal rekloniert, um die Vereinzelung und Stabilität der Zell-Linie zu erreichen. Von 30 getesteten Zellüberstände der ersten Reklonierung waren 4 positiv (13 %) und von 102 getesteten Zellüberständen der zweiten Reklonierung waren 68 (67 %) positiv. Eine dieser Tochterzell-Linien wurde kultiviert, um große Mengen des Antikörpers MC10E7 (IgG_{1κ}) herzustellen.

3.5 Optimierter direkter kompetitiver ELISA für Microcystin-LR

Ebenso wie für die Optimierung des direkten kompetitiven ELISA für Microcystin-LR mit dem Antikörper M8H5 wurden auch für den neuen Antikörper MC10E7 die ELISA-Parameter (Konzentration und Inkubationszeit des Antikörpers und des Tracers) optimiert, um eine hohe Empfindlichkeit des Assays bei relativ hohen Signalintensitäten zu erreichen. Da es sich bei dem neuen Antikörper um einen extrem affinen Antikörper handelt, macht sich die langsame Einstellung des Gleichgewichts durch eine Erniedrigung des Testmittelpunktes mit zunehmender Vorinkubationszeit des Analyten bemerkbar, wie in Abb. 56 dargestellt.

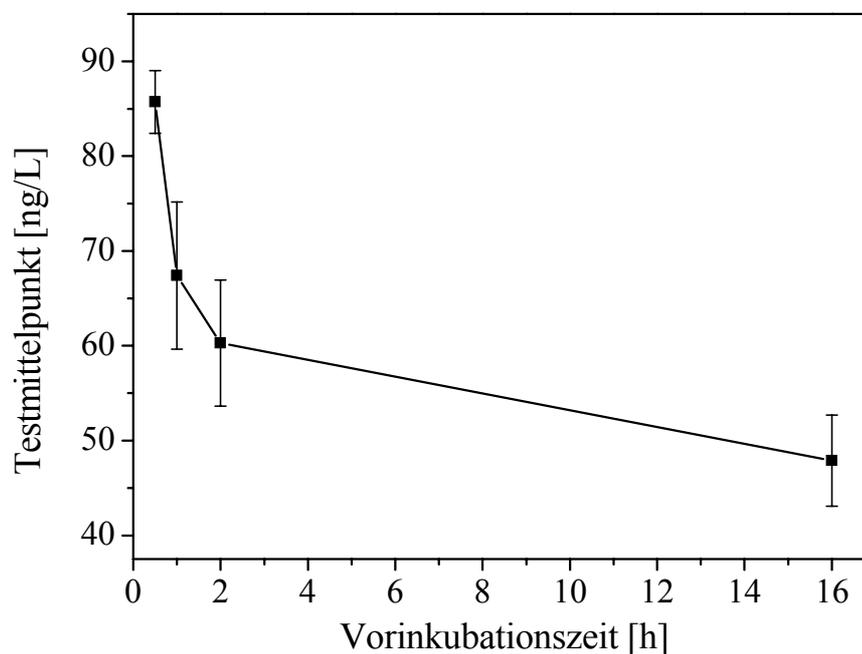


Abb. 56: Einfluß der Vorinkubationszeit des Analyten (Microcystin-LR) auf den Testmittelpunkt des direkten kompetitiven ELISA.

Bedingungen: Anti-Maus-IgG, 1:3 000, 200 μ L, 30 h; MC10E7-Ak (Zellüberstand), 1:10 000, 200 μ L, 8 h; Microcystin-LR-Standard, 200 μ L; MCLR-SH-POD, 1:2 000, 50 μ L, 15 min; Substrat TMB/H₂O₂, 200 μ L, 12 min; Abstoppen 100 μ L. Fehler 3s.

Der optimierte direkte kompetitive ELISA für Microcystin-LR ist in Abb. 57 dargestellt. Die Nachweisgrenze liegt bei 6 ng/L Microcystin-LR und der Testmittelpunkt bei 60 ng/L. Der entwickelte Assay gehört somit zu den empfindlichsten Immunoassays zur Messung von Microcystin-LR.

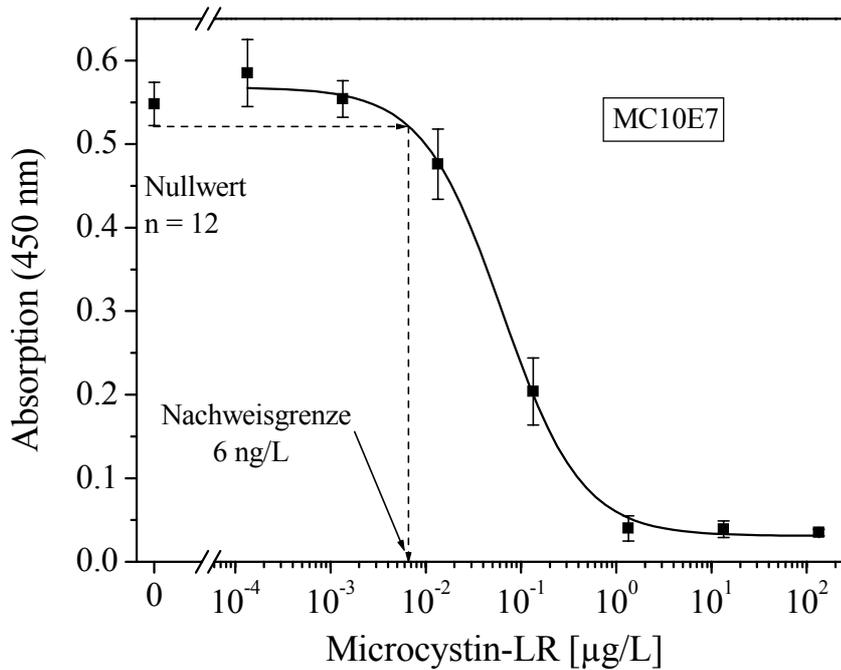


Abb. 57: Kalibrierkurve des direkten kompetitiven Microcystin-LR-ELISA mit monoklonalen Antikörpern MC10E7.

Bedingungen: Anti-Maus-IgG, 1:3 000, 200 µL, 3,4 h; MC10E7-Ak (Zellüberstand), 1:10 000, 200 µL, 6,5 h; Microcystin-LR-Standard, 200 µL, 2 h; MCLR-SH-POD, 1:2 000, 50 µL, 17 min; Substrat TMB/H₂O₂, 200 µL, 16 min; Abstoppen 100 µL. Testparameter: maximale Absorption = 0,57, minimale Absorption = 0,03, Testmittelpunkt = 0,06 µg/L, Steigung = 1,04; Fehler: Spannweite außer Nullwert (n = 3). Hier Fehler 3s, n = 12. Nachweisgrenze (Nullwert - 3s): 6 ng/L.

Die Dauer des Assays beträgt drei Stunden, wenn die Antikörper bereits immobilisiert wurden. Durch Verkürzung der Vorinkubationszeit wird die Empfindlichkeit vermindert, doch der ELISA läßt sich schneller durchführen. Dieser Assay ist somit nicht nur einer der empfindlichsten, sondern ist auch einer schnellsten Assays für Microcystin-LR.

3.6 Bestimmung der Affinitätskonstante

Die Affinitätskonstante wurde von EIKENBERG [92] nach einer Methode, die von WELLER [194] eingeführt wurde und in [255] beschrieben ist, abgeschätzt. Bei dieser Methode wird das Minimum des Testmittelpunktes durch sequentielle Verdünnung des Antikörpers und des Enzymtracers bestimmt. Für den Antikörper MC10E7 und Microcystin-LR konnte mit dieser Methode das Minimum des Testmittelpunktes nicht erreicht werden, da die dazu notwendigen Konzentrationen eine zu geringe Signalentwicklung zur Folge hatten. Es konnte jedoch eine minimale Affinitätskonstante von $(7 \pm 2) \cdot 10^{10}$ L/mol errechnet werden.

3.7 Kreuzreaktionen

Ein weiteres Merkmal eines Antikörpers ist sein Kreuzreaktionsmuster. Dieses wurde teilweise von EIKENBERG [92] bestimmt und wird hier in aktualisierter Form wiedergegeben.

Tabelle 12: Kreuzreaktionen und Affinitätskonstanten K des monoklonalen Antikörpers MC10E7.

Abkürzungen und Definitionen sind in Tabelle 7 beschrieben.

Kreuzreaktant (M _r)	Kreuzreaktion [%]	Kreuzreaktion molar [%]	$K \pm s$ [L/mol]
MC-LR (995)	100	100	$(7 \pm 2) \times 10^{10}$
[D-Asp ³]MC-RR (1024)	134 ± 32	138 ± 33	$(10 \pm 2) \times 10^{10}$
MC-RR (1038)	96 ± 22	101 ± 23	$(7 \pm 2) \times 10^{10}$
MC-WR (1068)	88 ± 25	95 ± 27	$(7 \pm 2) \times 10^{10}$
[D-Asp ³ ,Dhb ⁷]MC-RR (1024)	68 ± 17	70 ± 18	$(5 \pm 1) \times 10^{10}$
MC-YR (1045)	68 ± 7	71 ± 7	$(5 \pm 1) \times 10^{10}$
[D-Asp ³]MC-LR (982)	56 ± 18	55 ± 18	$(4 \pm 1) \times 10^{10}$
[D-Asp ³]MC-HtyR (1045)	40 ± 10	42 ± 10	$(3 \pm 1) \times 10^{10}$
Nodularin-R (825)	7 ± 1	6 ± 1	$(4 \pm 1) \times 10^9$
MC-LY (1002)	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	$(5 \pm 1) \times 10^7$
MC-LW (1024)	< 10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴	< 7 × 10 ⁵
MC-LF (986)	< 10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴	< 7 × 10 ⁵
MC-LA (910)	< 10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴	< 7 × 10 ⁵
<i>N</i> -Acetyl-Adda (371)	< 10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴	< 7 × 10 ⁵
Adda (331)	< 10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴	< 7 × 10 ⁵

Das Kreuzreaktionsmuster zeigt, daß der Antikörper MC10E7 argininhaltige Microcystine sehr gut erkennt. Diese zeigen Kreuzreaktionen zwischen 134 und 40 %. Nodularin liegt mit 7 Prozent Kreuzreaktion zwischen diesen Microcystinen und denjenigen, die kein Arginin enthalten und vollständig diskriminiert werden. Der Antikörper ist folglich selektiv für eine wichtige Gruppe der Microcystine. Die positive Ladung der Argininseitenkette scheint drastische Auswirkungen auf die Affinität des Antikörpers zu den Microcystinen zu haben. Dies ist erklärlich, wenn die Struktur des Immunogens berücksichtigt wird, in welcher das Arginin der Kopplungsstelle an das Trägerprotein gegenüber liegt. Dadurch ist es der Erkennung durch den Antikörper besonders gut zugänglich. Die Testmittelpunkte und Nachweisgrenzen der untersuchten Toxine sind in Tabelle 13 wiedergegeben.

Tabelle 13: Testmittelpunkte und Nachweisgrenzen der Bestimmung von Toxinen mit dem Antikörper MC10E7 (direkter kompetitiver ELISA).

Analyt	Testmittelpunkt $\pm s$ [$\mu\text{g/L}$]	Nachweisgrenze [$\mu\text{g/L}$]
MC-LR	0.063 ± 0.010	0.006
[D-Asp ³]MC-RR	0.047 ± 0.002	0.006
MC-RR	0.066 ± 0.010	0.011
MC-WR	0.069 ± 0.011	0.008
MC-YR	0.050 ± 0.010	0.011
[D-Asp ³ ,Dhb ⁷]MC-RR	0.094 ± 0.009	0.015
[D-Asp ³]MC-LR	0.11 ± 0.02	0.019
[D-Asp ³]MC-HtyR	0.15 ± 0.02	0.028
Nodularin-R	0.62 ± 0.06	0.095
MC-LY	104 \pm 8	29
MC-LW	> 1000	> 1000
MC-LF	> 1000	> 1000
MC-LA	> 1000	> 1000
N-Acetyl-Adda	> 1000	> 1000
Adda	> 1000	> 1000

Die Testmittelpunkte der argininhaltigen Microcystine liegen zwischen 0.05 und 0.15 $\mu\text{g/L}$ und damit deutlich unterhalb der Nachweisgrenze von 1 $\mu\text{g/L}$, dem Grenzwert, der von der Weltgesundheitsorganisation für Microcystin-LR vorgeschlagen wurde. Nicht argininhaltige Microcystine und Adda werden von diesem Test nicht erfaßt. Bemerkenswert ist die hohe Selektivität zwischen argininhaltigen Microcystinen (z. B. Microcystin-LR) und nichtargininhaltigen Microcystinen (z. B. Microcystin-LA), die besser als 1:100 000 ist.

3.8 Einfluß von Störungen (Salzgehalt, Tenside, Huminstoffe, pH-Wert)

Ebenso wie für den direkten kompetitiven ELISA mit dem M8H5-Antikörper wurde auch für den ELISA mit dem neuen MC10E7-Antikörper der Einfluß von Matrixkomponenten von EIKENBERG [92] getestet und in [318] publiziert. Tabelle 14 zeigt, daß der Antikörper eine gute Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln, Huminsäure, Oxidationsmitteln, sauren und basischen pH-Werten und Tensiden besitzt. Diese Stabilitäten gelten ebenso wie die Stabilitäten des M8H5-Antikörpers nur für das direkte ELISA-Format, in welchem der immobilisierte Antikörper mit der Probe an einer Phasengrenzfläche in Kontakt kommt. Zum Testen der Stabilitäten wurde der direkte ELISA benutzt, wobei die Störkomponenten als Analyten betrachtet wurden, jedoch ein Zwischenwaschschritt vor der Enzymtracer-Zugabe erfolgte.

Tabelle 14: Stabilität des Antikörpers MC10E7 nach EIKENBERG [92].

Stabilität ^a gegenüber	Antikörper stabil bis
Methanol	30 % (v/v)
Acetonitril	20 % (v/v)
Huminsäure	1 g/L
Wasserstoffperoxid	1 % (v/v)
Natriumchlorid	gesättigte Lösung
pH	2-9.2
Tween 20 [®]	15 % (v/v)
Triton N 101 [®]	20 % (v/v)
Brij 78 [®]	20 % (v/v)

^a Inhibition < 10 % während 30 Minuten Inkubation bei RT

Um zu testen, ob die Analyt-Antikörper-Bindung durch Zusatz von organischen Lösungsmitteln geschwächt wird, wurden wie im Fall des Antikörpers M8H5 Kalibrierkurven von Microcystin-LR mit verschiedenen Zusätzen von Methanol gemessen. Anders als im Falle des M8H5-Antikörpers ist der Einfluß von Methanol auf die Affinität der Bindung hier gering (s. Abb. 58). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, daß ionische Wechselwirkungen wesentlich an der Bindungsbildung beteiligt sind.

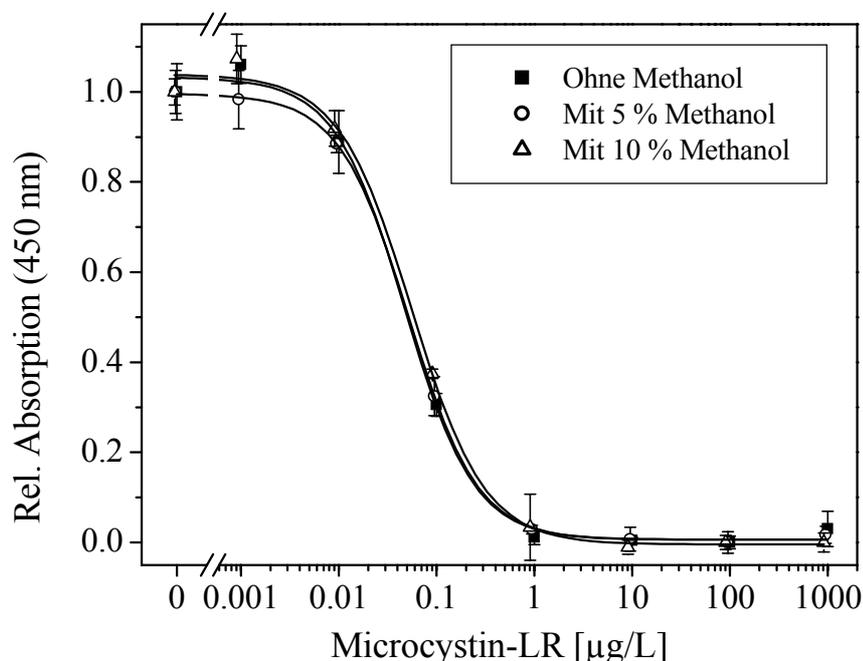


Abb. 58: Einfluß von Methanol auf die Affinität von Antikörper MC10E7 zu Microcystin-LR im direkten ELISA.

Bedingungen: s. Abb. 57; Testmittelpunkt: ohne Methanol: 0.047 ± 0.006 µg/L; mit 5 % Methanol: 0.052 ± 0.002 µg/L; mit 10 % Methanol: 0.056 ± 0.007 µg/L.

3.9 Messungen von Wasserproben

Die Tauglichkeit des ELISAs zur Messung von Oberflächengewässern wurde durch Aufstocken mehrerer Proben bekannten Ursprungs mit Microcystin-LR getestet. Dabei wurden die gleichen Puffer und Blockinglösungen verwendet, die in Abschnitt 2.6 beschrieben sind. Als Wasserproben wurde Münchner Trinkwasser, Wasser bayerischer Seen und das Wasser eines Trinkwasserspeichers untersucht. Die Proben wurden im Vorfeld vermessen, um sicherzustellen, daß sie nicht belastet sind. Microcystin-LR wurde anschließend in vier verschiedenen Konzentrationen, die im Meßbereich der Kalibrierkurve liegen, aufgestockt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Analyse von aufgestockten Wasserproben mittels ELISA mit MC10E7.

Nr.	Herkunft	MC-LR [$\mu\text{g/L}$]	MC-LR [$\mu\text{g/L}$]	Wiederfindung
		aufgestockt	ELISA (Fehlerbereich)*	MC-LR [%]
1	Trinkwasser München/Deutschland	0.01	0.015 (0.008-0.023)	150
		0.02	0.024 (0.019-0.028)	120
		0.05	0.055 (0.046-0.067)	110
		0.1	0.11 (0.091-0.136)	110
2	Wahnbachtalsperre bei Bonn (Trinkwasserspeicher)	0.01	0.011 (0.008-0.014)	110
		0.02	0.022 (0.019-0.025)	110
		0.05	0.049 (0.043-0.055)	98
		0.1	0.092 (0.082-0.11)	92
3	Pucher See bei München	0.01	0.010 (0.009-0.011)	100
		0.02	0.019 (0.016-0.023)	95
		0.05	0.052 (0.046-0.059)	104
		0.1	0.11 (0.090-0.14)	110
4	Starnberger See bei München	0.01	0.009 (0.050-0.015)	90
		0.02	0.018 (0.009-0.029)	90
		0.05	0.053 (0.047-0.06)	106
		0.1	0.085 (0.065-0.11)	85
5	Heimstettner See bei München	0.01	0.008 (0.003-0.012)	80
		0.02	0.017 (0.009-0.025)	85
		0.05	0.048 (0.042-0.054)	96
		0.1	0.100 (0.088-0.116)	100
6	Amper, Bayern (Fluß)	0.01	0.011 (0.043-0.017)	110
		0.02	0.020 (0.011-0.028)	100
		0.05	0.039 (0.019-0.074)	78
		0.1	0.069 (0.058-0.362)	69

* berechnet aus den Standardabweichungen (3s) des 20%-gestutzten Mittelwerts (vgl. Abschnitt II.3.2.3).

Da die Kalibrierkurve eine sigmoidale Form hat, sind die Fehler des ermittelten Konzentrationswertes nicht symmetrisch in Bezug auf diesen. Die hier verwendeten Microcystin-LR-Konzentrationen sind ein bis zwei Größenordnungen kleiner als der von der WHO vorgeschlagene Grenzwert von 1 µg/L. Dies hat den Vorteil, daß Proben mindestens um den Faktor 10 verdünnt werden können, um Matrixeffekte zu minimieren. Die mittlere Wiederfindung der 24 gemessenen Proben beträgt 99.9 (± 16.4) %. Diese Ergebnisse zeigen, daß der ELISA sehr gut zur Messung von Microcystinen in Realproben geeignet ist.

3.10 Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

Die in diesem Kapitel beschriebene Entwicklung eines ELISAs zur Erkennung von Microcystinen, die Arginin in Position 4 des Rings enthalten, zeigt, wie stark der Erfolg der Herstellung von hochaffinen monoklonalen Antikörpern von jedem einzelnen Optimierungsschritt abhängt. Die Affinität der Antikörper wird primär durch die Struktur des immunisierten Haptens bestimmt. Das relativ große Hapten Microcystin-LR mit seiner räumlich starren Struktur und seinen polaren Seitenketten scheint gut geeignet für die Generierung hochaffiner Antikörper. Trotzdem spielt die Struktur des Haptens (Kopplungsstelle an das Trägerprotein), die Kopplungsdichten des Konjugats, die verabreichte Immunogenmenge und die Löslichkeit des Immunogens eine wichtige Rolle für die erzielte Antikörperaffinität. Diese Annahme wird durch die Tatsache gestützt, daß die Mehrzahl der immunisierten Mäuse eine ähnliche Immunantwort bezüglich Affinität und Selektivität des Serums zeigten. Für die Herstellung monoklonaler Antikörper scheint der Einsatz eines löslichen Immunogens in der letzten Phase der Immunisierung wichtig zu sein, da nur auf diese Weise viele B-Lymphozyten zur Teilung angeregt werden und als Lymphoblasten zur Fusion zur Verfügung stehen.

Die hier verwendete Screeningmethode der Zellüberstände ist sehr effektiv und kann, da sie nur hochaffine Antikörper detektiert, viel Arbeit ersparen.

Der generierte Antikörper MC10E7 (IgG_{1κ}) zeigt mit einer Mindestaffinität von $(7 \pm 2) \cdot 10^{10}$ L/mol die höchste bisher veröffentlichte Affinität eines Antikörpers zu Microcystin-LR. Bemerkenswert ist ebenso das Kreuzreaktionsmuster des Antikörpers. Nichtargininhaltige Microcystine werden derartig diskriminiert, daß ihre Kreuzreaktion mindestens 10^5 mal geringer ist als diejenige argininhaltiger Microcystine. Antikörper, die zwischen Untergruppen von Substanzklassen so gut unterscheiden können, werden in der Umweltanalytik oft gefordert, sind jedoch in der Praxis nur sehr selten zu finden. In diesem Fall läßt sich die Selektivität des Antikörpers zur hochsensitiven, partiellen Strukturaufklärung von Microcystinen ausnutzen, beispielsweise bei Verwendung dieses Antikörpers in Kombination mit einem Breitbandantikörper.

Die Stabilität des Antikörpers gegenüber Störungen wie Oxidationsmitteln, Huminsäuren oder pH-Werten ist im verwendeten ELISA-Format sehr gut. Die Messung von aufgestockten Oberflächengewässern zeigte, daß der entwickelte ELISA sich zur Messung von Microcystin-LR gemäß den Anforderungen der Weltgesundheitsorganisation eignet.

4 Herstellung eines monoklonalen Adda-Antikörpers

In diesem Kapitel wird die Generierung eines Breitbandantikörpers, die Synthese des Enzymtracers und die Etablierung eines ELISA zur Messung von Microcystinen beschrieben. Im Gegensatz zum Breitbandantikörper M8H5, dessen Selektivität eher ein Zufallsprodukt ist, sollte in diesem Fall die breite Erkennung der Microcystine durch gezieltes, rationales Design der Haptenstruktur erreicht werden. Die Strategie bestand darin, eine allen Microcystinen gemeinsame Teilstruktur zu immunisieren. Diese Struktur sollte jedoch groß genug sein, um die Generierung hochaffiner Antikörper zu gewährleisten. Als gemeinsame Teilstruktur der Microcystine und Nodularine wurde die β -Aminosäure Adda gewählt. Adda besitzt im Gegensatz zu den proteinogenen Aminosäuren eine sehr lange, hydrophobe Seitenkette mit insgesamt vier Stereozentren. Die Größe und Form dieser Aminosäure sollte für die Generierung von Antikörpern ausreichen, die genügend hohe Affinität zu Microcystinen besitzen.

Eine ähnliche Immunisierungsstrategie wurde von BAIER et al. [157] durchgeführt. Diese Gruppe immunisierte ein Adda-Vorläufermolekül ((6S,7S,2E,4E)-7,N-Dimethoxy-4,6,N-trimethyl-8-phenylocta-2,4-diensäureamid), ohne es an ein Trägerprotein zu koppeln. Das erhaltene Antiserum erkannte zwar das Vorläufermolekül gut, jedoch nicht Microcystine.

Auch für andere Stoffklassen, wie z. B. Sulfonamide [323] und Sulfonylharnstoffherbizide [324] wurde die Strategie der Immunisierung gemeinsamer Teilstrukturen zur Generierung von Breitbandantikörpern getestet. Der erhoffte Erfolg blieb in diesen Fällen jedoch aus, einige Vertreter der jeweiligen Stoffklassen wurden diskriminiert. Dies könnte einerseits an der geringen Molekülgröße der verwendeten Haptene liegen und andererseits an dem Spacer (Abstandshalter), der zwischen Hapten und Trägerprotein eingeführt wurde.

4.1 Auswahl des Haptens und der Kopplungsstelle

Die hier verwendete Aminosäure Adda wurde von CUNDY et al. [54, 55] synthetisiert. Adda besitzt eine freie Aminogruppe, die positiv, und eine freie Carboxylgruppe, die negativ geladen sein kann. Beide funktionellen Gruppen sind innerhalb der Microcystine an Amidbindungen beteiligt und können dort keine Ladung tragen. Um eine Erkennung der positiv geladenen Aminogruppe des Adda durch den Antikörper zu verhindern, wurde diese *N*-acetyliert. Die negativ geladene Carboxylgruppe wurde durch Kopplung an das Trägerprotein in ein Amid konvertiert. Dadurch wurde erreicht, daß die Struktur und der Ladungszustand des Haptens der Aminosäure Adda als Teil des Microcystins sehr ähnlich ist (vgl. Abb. 59).

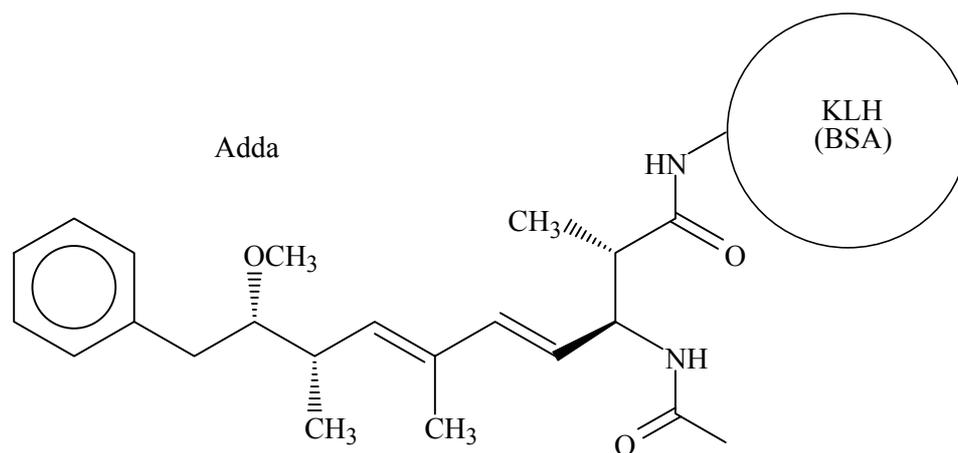


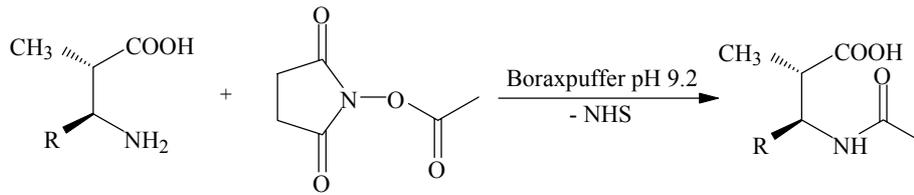
Abb. 59: Struktur des Immunogens zur Generierung von Breitbandantikörpern gegen Microcystine durch Immunisierung einer gemeinsamen Teilstruktur.

Zwischen Hapten und Trägerprotein wurde kein Spacer eingeführt, um die sterische Zugänglichkeit des Adda zu limitieren und zu verhindern, daß Adda von einer tiefen Bindungstasche des Antikörpers gebunden wird. Die Bindung von Adda in einem tiefen Spalt könnte zur Folge haben, daß der sterisch anspruchsvolle Microcystinring nicht in den Spalt paßt und Microcystine somit nicht gebunden werden.

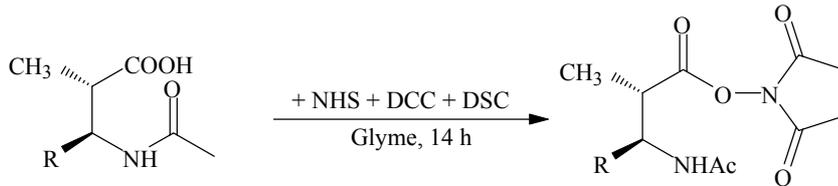
4.2 Synthese des Immunogens und des Enzymtracers

Die Synthesen der drei für die Immunisierung und Durchführung eines indirekten bzw. direkten ELISA benötigten Konjugate wurden nach dem gleichen Reaktionsschema durchgeführt. Der hergestellte aktivierte Ester von *N*-Acetyl-Adda wurde aliquotiert und an die Proteine KLH, BSA und Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Das Reaktionsschema zur Synthese des Adda-Immunogens, des Adda-Coatingantigens und des Adda-Enzymtracers ist in Abb. 60 dargestellt.

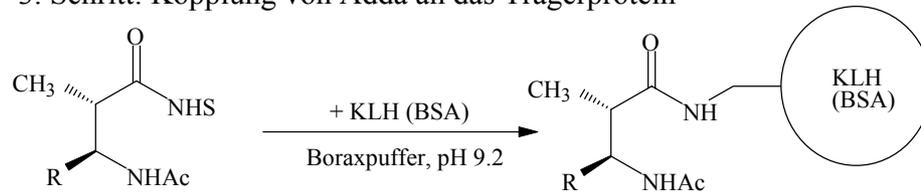
1. Schritt: N-Acetylierung der Aminogruppe von Adda



2. Schritt: Aktivierung der Carbonsäure von N-Ac-Adda



3. Schritt: Kopplung von Adda an das Trägerprotein

**Abb. 60: Reaktionsschema der Synthese von Adda-Proteinkonjugaten.**

R = Hydrophobe Seitenkette von Adda (vgl. Abb. 59); Abkürzungen: Ac Acetyl; DCC *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid; DSC Di-(*N*-succinimidyl)-carbonat; Glyme 1,2-Dimethoxyethan; NHS *N*-Hydroxysuccinimid.

Der erste Schritt der Synthese verläuft quantitativ, wie die HPLC-Chromatogramme (Abb. 61) des Edukts (Adda) und des Produkts (*N*-Acetyl-Adda) zeigen. Das Reaktionsprodukt eluiert wesentlich später als das Edukt. Da die Reaktion quantitativ verläuft, kann auf eine Aufreinigung des Produkts für die folgenden Syntheseschritte verzichtet werden. Die Identität des Produktes konnte mittels Elektrospray-Massenspektrometrie im negativen Ionenmodus bestätigt werden. Das Spektrum zeigt den Molekülpeak und ein Fragment, das durch Abspaltung von CO₂ entsteht.

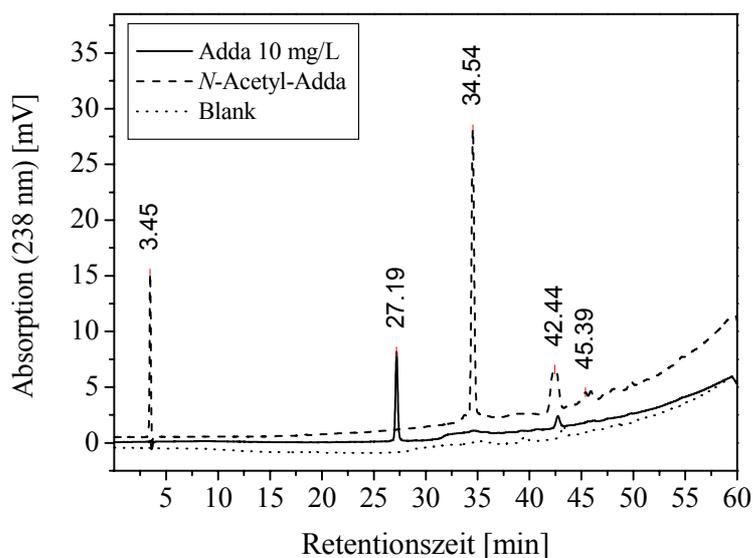


Abb. 61: HPLC-Chromatogramme von Adda und N-Acetyl-Adda zur Überprüfung der Umsetzung von Adda mit N-Acetylsuccinimid. Säule: Amid-C₁₆; Bedingungen: s. Abb. 26.

Das Produkt des zweiten Reaktionsschrittes, der NHS-Ester von N-Acetyl-Adda, wurde chromatographisch gereinigt, wobei davon ausgegangen wurde, daß das Carbodiimid und N-Hydroxysuccinimid andere Retentionszeiten haben als der Aktivester. Diese Aufreinigung war nötig, um zu verhindern, daß Aktivierungsreagenzien in der folgenden Synthesestufe mit den Proteinen reagieren. Beispielsweise kann überschüssiges Carbodiimid mit funktionellen Gruppen des Trägerproteins zu stark immunogenen, stabilen N-Acylharnstoff- und Guanidiniumstrukturen abreagieren [325]. Antiseren, die durch Immunisierung solcher Konjugate entstehen, erkennen diese Strukturen und führen sowohl bei dem direkten als auch dem indirekten ELISA zu unspezifischer Signalentwicklung. Dies gilt insbesondere, wenn das Coatingantigen und der Enzymtracer nach der gleichen Methode hergestellt wurden.

Bei der semipräparativen chromatographischen Reinigung wird in Kauf genommen, daß ein Teil des Aktivesters auf der Säule hydrolysiert, wie in Abb. 62 zu erkennen ist. Die Ausbeute an Aktivester nach der Reinigung betrug ca. 30 %. Bei diesem Schritt muß darauf geachtet werden, das Produkt sofort nach der Fraktionierung zu kühlen, um eine weitere Hydrolyse zu verhindern. Wasser kann bei -23 °C ausgefroren werden. So trennt sich die organische von der wäßrigen Phase und der NHS-Ester kann aus der organischen Phase (Acetonitril) isoliert werden.

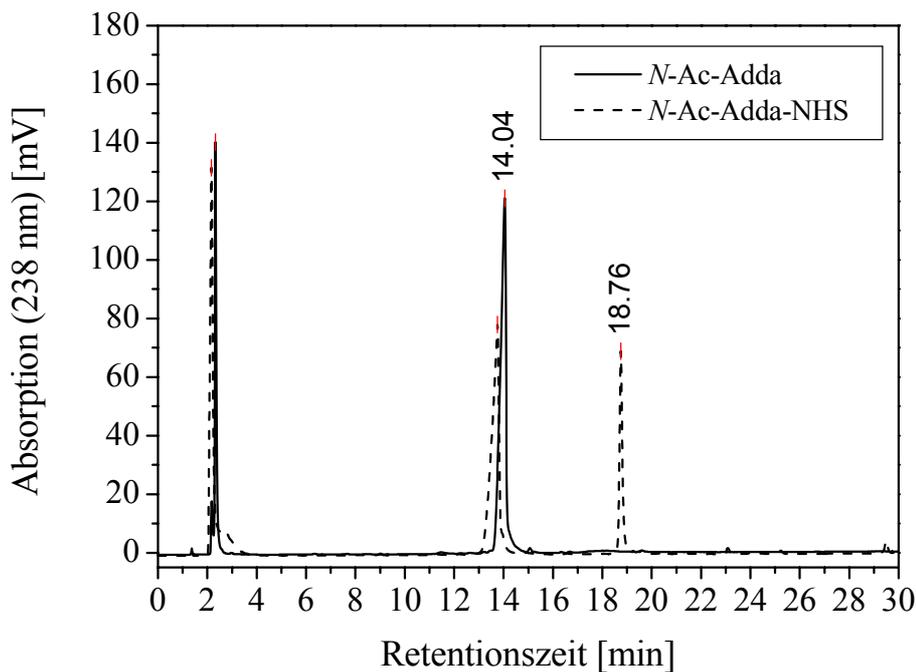


Abb. 62: Semipräparative Trennung und Aufreinigung des *N*-Acetyl-Adda-NHS-Esters.

Bedingungen: Säule: Supelcosil-18 (C₁₈-Phase), 25 cm x 10 mm, 5 µm Partikeldurchmesser; Gradient: Wasser (A)/Acetonitril (B), 0-1 Minuten: 70 % A, 30 % B, 30 Minuten: 20 % A, 80 % B; 35 Minuten: 10 % A, 90 % B; Fluß: 6 mL/min; Injektionsvolumen: 400 µL (Reaktionsansatz).

In der dritten Stufe erfolgte die Kopplung des Aktivesters an die Proteine KLH, BSA, und POD bei basischem pH-Wert. Das KLH-Konjugat denaturierte eine Stunde nach beendeter Zugabe des Aktivesters und wurde weitgehend unlöslich. Dies kann dadurch erklärt werden, daß die hydrophilen Aminogruppen des Trägerproteins durch Kopplung mit dem hydrophoben Hapten nicht mehr zur Löslichkeit beitragen. Die Reinigung des KLH-Konjugats erfolgte durch mehrmaliges Waschen mit Methanol, anfangs unter Zusatz von 0.1%iger Essigsäure und anschließend ohne Essigsäure. Der Erfolg der Kopplung wurde mittels ELISA nachgewiesen. Hierbei wird die Bindung des Antikörpers M8H5 an immobilisiertes Adda-KLH-Konjugat überprüft. Für den ELISA war die geringe Löslichkeit des Konjugates ebenso wie die sehr geringe Kreuzreaktion des M8H5-Antikörpers zu Adda ausreichend, um ein positives Signal zu erzeugen.

Die beiden Konjugate *N*-Acetyl-Adda-BSA und *N*-Acetyl-Adda-POD blieben löslich und wurden mittels Gelchromatographie an Sephadex PD-10 gereinigt. Im Falle des BSA-Konjugates wurde die Kopplungsdichte mittels Elektrospray-Massenspektrometrie bestimmt (s. Abschnitt III.8.8) und betrug 11 *N*-Acetyl-Adda-Moleküle pro BSA-Molekül. Dies bedeutet, daß 28 % der 36 zugänglichen primären Aminogruppen [238, S. 419-455] des BSA derivatisiert wurden.

4.3 Verlauf der Immunisierungen

Ähnlich wie bei der Immunisierung von Microcystin-LR wurde auch in diesem Fall eine niedrige Dosis von 7.5 µg *N*-Acetyl-Adda-KLH bzw. -BSA pro Immunisierung gewählt, um die Generierung hochaffiner Antikörper zu fördern. Weiterhin wurde auch in diesem Fall zu Beginn das unlösliche *N*-Acetyl-Adda-KLH als Immunogen verwendet, welches vermutlich zu einer geringeren Verfügbarkeit des Haptens führt, jedoch aufgrund seiner besseren Stabilität über lange Zeiträume wirksam ist. Die Seren der Blutungen wurden mit einem indirekten ELISA auf Antikörper, die das Coatingkonjugat *N*-Acetyl-Adda-BSA erkennen, getestet. Zusätzlich wurde überprüft, ob *N*-Acetyl-Adda, Adda, Microcystin-LR und -LA diese Bindung inhibieren. Microcystin-LR wurde als Vertreter der argininhaltigen Microcystine gewählt, Microcystin-LA als Vertreter der nichtargininhaltigen Microcystine. Da Arginin in Position 4 der Microcystine sich in direkter Nachbarschaft zu der immunisierten Aminosäure Adda befindet, besteht die Möglichkeit, daß die Nähe der positiven Ladung zu einer Diskriminierung der argininhaltigen Microcystinen führt. Dies sollte durch Vergleich der Testmittelpunkte von Microcystin-LR und -LA überprüft werden.

Die Seren aller Mäuse, die nach der ersten Nachimmunisierung (Boost) gewonnen wurden, zeigten eine positive Immunantwort im indirekten, jedoch nicht im direkten ELISA. Bei letzterem wurde die Bindung möglicher Antikörper an den monovalenten *N*-Acetyl-Adda-POD Enzymtracer getestet. Die positive Reaktion der Seren im indirekten Format beruhte folglich auf einer bivalenten Bindung der Antikörper an die Haptene des Coatingantigens. Für eine monovalente Bindung reichte die Affinität der Seren nicht aus. Nach der zweiten Immunisierung konnte eine Affinitätsreifung beobachtet werden. Der Testmittelpunkt nahm z. B. von 40 of 11 µg/L Microcystin-LR bei Maus 217 ab. Diese Affinität reichte aus, um einen direkten ELISA durchzuführen. In diesem Format zeigte dasselbe Serum einen Testmittelpunkt von 1.6 µg/L. Die dritte Immunisierung zeigte keine meßbaren Auswirkungen, weder auf die Affinitätsreifung noch auf den Anstieg des Antikörpertiters. Aus diesem Grund wurde die vierte Immunisierung mit dem löslichen Immunkonjugat (*N*-Acetyl-Adda-BSA) durchgeführt, was gleichzeitig eine Umstellung auf ein anderes Trägerprotein (BSA) bedeutete. Diese Umstellung sollte einerseits zu einer Konzentration des Immunsystems auf das Hapten beitragen und andererseits zu einer Erhöhung des Antikörpertiters führen. Der Verlauf des Antikörpertiters vor und nach der Immunisierung mit löslichem Immunkonjugat ist in Abb. 63 dargestellt.

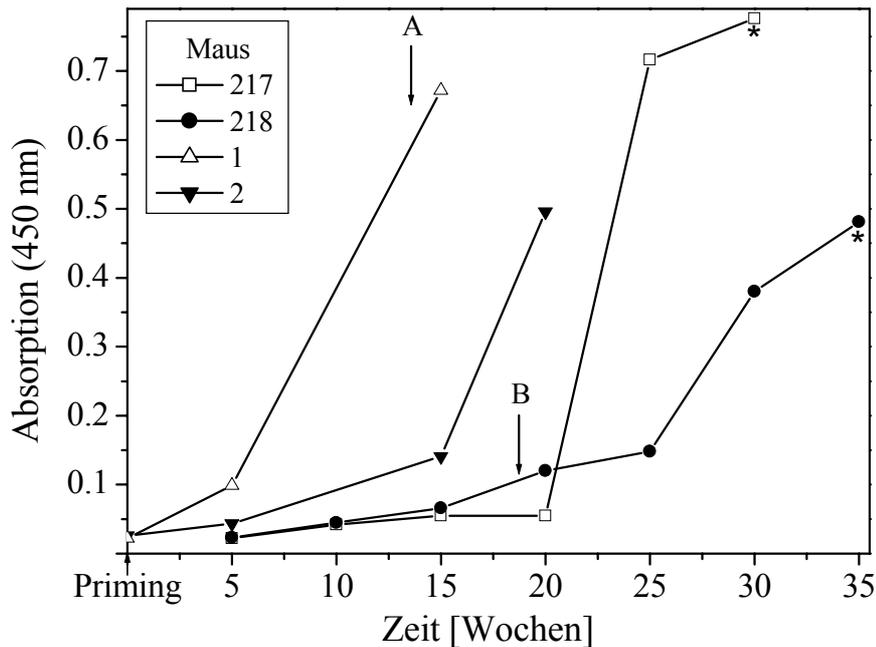


Abb. 63: Verlauf des spezifischen Antikörpertiters der Mäuse 217, 218, 1 und 2.

Die Mäuse 1 und 2 sind mit einem Microcystin-LR-Konjugat immunisiert worden (s. Abschnitt III.3.3.2). Bei dieser Immunisierung erfolgte der Wechsel von unlöslichen zu löslichem Konjugat zum Zeitpunkt **A**. Die Mäuse 217 und 218 wurden zuerst mit unlöslichem *N*-Acetyl-Adda-KLH und nach **B** mit löslichem *N*-Acetyl-Adda-BSA immunisiert. (*: Antikörpertiter der Herzpunktion, die zwei Tage nach der letzten Immunisierung durchgeführt wurde).

Die erste Immunisierung mit löslichem *N*-Acetyl-Adda-BSA zeigte keine Wirkung auf die Immunantwort. Die Konzentration der Antikörper, die den Enzymtracer erkannten, blieb weiterhin sehr niedrig. Hingegen zeigte nach der zweiten Immunisierung mit löslichem Immunogen Maus 217 einen starken Anstieg der Konzentration Adda-selektiver Antikörper. Maus 218 folgte diesem Verlauf um eine Immunisierung versetzt. Ein Grund für die verspätete Immunreaktion auf das neue Immunkonjugat könnte die Stimulierung unterschiedlicher Helfer-T-Zellen sein. Diese Zellen fördern die Proliferation der B-Zellen durch Bindung an einen Oberflächenkomplex, der prozessierte Teile des Immunogens präsentiert. Durch den Wechsel des Trägerproteins entstehen andere Produkte der Prozessierung, die von den ursprünglichen Helfer-T-Zellen nicht erkannt werden. Dadurch werden die B-Zellen zunächst nicht zur Teilung angeregt und der Antikörpertiter bleibt niedrig. Abb. 63 zeigt jedoch, daß ein Wechsel des Trägerproteins zwar eine Verzögerung der Immunantwort zur Folge haben kann, diese jedoch nicht völlig unterbrochen wird. Erfolgt ein Wechsel von unlöslichem zu löslichem Immunogen unter Verwendung desselben Trägerproteins, wie im Fall der Microcystin-LR-cOVA-Immunisierung geschehen, so kann das Immunsystem bereits direkt nach dem Wechsel darauf reagieren. Dies zeigt der Verlauf des Antikörpertiters der Mäuse 1 und 2 in Abb. 63.

Neben dem Verlauf des Antikörpertiters war auch die Selektivität der in unterschiedlichen Mäusen generierten Antikörper von Interesse. Wie oben beschrieben, wurden zwei Microcystine und *N*-Acetyl-Adda stellvertretend für alle Microcystine ausgewählt und die Test-

mittelpunkte in einem direkten kompetitiven ELISA bestimmt. Tabelle 16 zeigt eine Zusammenstellung der Testmittelpunkte.

Tabelle 16: Testmittelpunkte von *N*-Acetyl-Adda und zwei Microcystinen, die mit den Seren der Mäuse 217 und 218 im direkten kompetitiven ELISA (Serumverdünnung 1:500) erhalten wurden.

Analyt	Testmittelpunkt [$\mu\text{g/L}$] Maus 217	Testmittelpunkt [$\mu\text{g/L}$] Maus 218
<i>N</i> -Acetyl-Adda	6.7 ± 0.4	1.4 ± 0.1
Microcystin-LR	4.1 ± 0.2	0.9 ± 0.1
Microcystin-LA	7.2 ± 1.8	1.1 ± 0.4

Die Testmittelpunkte des Serums der Maus 218 deuten bereits auf eine breite Erkennung der Microcystine hin. Maus 217 zeigt ein ähnliches Erkennungsmuster, während Maus 219 keine deutliche Immunantwort zeigte und deshalb in Tabelle 16 nicht aufgeführt ist. Die hier erhaltenen Ergebnisse unterstützen ebenso wie diejenigen der Microcystin-LR-Immunsierung die Annahme, daß eine definierte Haptenstruktur Antikörper ähnlicher Selektivität und Affinität in unterschiedlichen Individuen hervorruft, sofern überhaupt eine Immunantwort gegen das Targetmolekül erzielt wird.

4.4 Fusion und Screening zur Gewinnung eines monoklonalen Adda-Antikörpers

Um Hybridomzellen herzustellen, wurde Maus 217 nach der zweiten Immunsierung mit löslichem Immunogen durch weitere Boosterinjektionen auf die Fusion vorbereitet. Dazu wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen je $10 \mu\text{g}$ des Immunogens ohne Adjuvans i. p. verabreicht. Die Maus wurde am 5. Tag getötet und die Milz entnommen. Es stellte sich heraus, daß die Milz sehr klein und vermutlich nicht geschwollen war. Dies deutete darauf hin, daß keine oder nur eine sehr geringe Anregung der B-Zellen zur Teilung stattgefunden hatte. Als Folge davon wurden lediglich 87 wachsende Hybridomzellen erhalten und keine davon produzierte Antikörper, die den *N*-Acetyl-Adda-Enzymtracer erkannten.

Maus 218 wurde nach der dritten Immunsierung mit löslichem Immunogen durch intraperitoneale Injektion von je $15 \mu\text{g}$ Immunogen an drei aufeinanderfolgenden Tagen auf die Fusion vorbereitet. Die Milz wurde am 5. Tag entnommen und die Milzzellen nach Vereinzelung mit Myelomzellen fusioniert. Diese Fusion lieferte nahezu 800 wachsende Hybridomzellen, die in HAT-Medium selektioniert wurden. Lediglich eine Zellkolonie produzierte Antikörper, die den *N*-Acetyl-Adda-Enzymtracer erkannten (s. Tabelle 17). Der Zellüberstand dieser Kolonie zeigte jedoch mit einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 800 ein sehr deutliches Signal.

Tabelle 17: Übersicht über die Ausbeuten an wachsenden und an positiven Zellen bei dem Screening und der Reklonierung von Hybridomzellen zur Herstellung eines Zellklons, der Antikörper gegen *N*-Acetyl-Adda produziert.

	Mittlere Anzahl ausgesäter Zellen pro Napf	Gesamtzahl befüllter Näpfe (Näpfe mit wachsenden Zellen ^a)	Anzahl positiver Näpfe ^b (Tag nach dem Aussäen)
Screening	0.5-5 ^c	1152 (792)	1 (14)
1. Reklonierung	1	384	0 (7)
(AD4G2)	10	384	1 (7)
2. Reklonierung	1	960	3 (8); 6 (11)
(AD4G2-6C12)			
3. Reklonierung	1	480 (33)	32 (13)
(AD4G2-6C12-8F8)			

^a Anzahl von Näpfen mit wachsenden Zellen am Tag nach dem Aussäen, der in Klammern in der nächsten Spalte angegeben ist.

^b Für die Detektion positiver Zellkulturüberstände wurde als Grenzwert der mittlere Nullwert + 3s festgesetzt.

^c 50 000 Zellen/Napf wurden ausgesät; es wurde eine Fusionsausbeute von 10^{-4} - 10^{-5} [184, S. 193-195] angenommen.

Die Zellkolonie wurde 3mal rekloniert, wobei bei der zweiten und dritten Reklonierung die Zellen soweit verdünnt wurden, daß statistisch nur eine Zelle pro Napf ausgesät wurde. Die Parameter und Ergebnisse der Reklonierungen sind in Tabelle 17 zusammengefaßt. Die Ergebnisse von MCCULLOUGH [203], die in Abschnitt I.3.1.7 beschrieben wurden, bestätigten sich hierbei. Durch Einzelzellaussaat lassen sich im Vergleich zu der Aussaat von 10 Zellen pro Napf positive Zellklone erst spät (nach ca. 10 Tagen) detektieren und liefern ein schwächeres Signal. Positive Befunde müssen durch Mehrfachmessungen abgesichert werden. Im Gegenzug wird jedoch mit dieser Methode die Monoklonalität der Zellen schneller und sicherer erreicht. Nach der dritten Reklonierung wurde einer der Subklone (AD4G2-6C12-8F8) als stabil betrachtet, da 97 % der Tochter-Zellkolonien Antikörper gegen *N*-Acetyl-Adda produzierten. Dieser Zellklon wurde kultiviert, um große Mengen des neuen monoklonalen Antikörpers AD4G2 (IgG1 κ) herzustellen.

4.5 Optimierter direkter kompetitiver ELISA

Der neue monoklonale Antikörper AD4G2 wurde durch Immunisierung des Haptens Adda hergestellt, mit dem Ziel als Breitbandantikörper für Microcystine zu dienen. Aus diesem Grund wurde als Referenzanalyt Microcystin-LR und nicht Adda verwendet. Microcystin-LR ist im Gegensatz zu Adda kommerziell erhältlich. Zudem kann der Antikörper mit Microcystin-LR als Analyt besser mit anderen Microcystin-Antikörpern verglichen werden. Auch bezieht sich der vorläufige Grenzwert der Weltgesundheitsorganisation zur Messung von Microcystinen auf Microcystin-LR.

Die Optimierung des direkten kompetitiven ELISA für Microcystine mit dem Antikörper AD4G2 erfolgte nach Kriterien, die bereits für die Entwicklungen der Immunoassays mit den Antikörpern M8H5 und MC10E7 beschrieben wurden. Zusätzlich wurde getestet, ob der ELISA sowohl mit dem *N*-Acetyl-Adda-, als auch mit dem Microcystin-LR-Enzymtracer durchführbar ist. Dies ist von Interesse, da Microcystin-LR besser verfügbar ist als Adda und daher die Anwendung des Immunoassays nicht durch den Adda-Enzymtracer limitiert wird. Es konnte gezeigt werden, daß beide Enzymtracer verwendet werden können und die erhaltenen Kalibrierkurven identisch sind. Die Kalibrierkurve für Microcystin-LR ist in Abb. 64 dargestellt.

Dieser Assay ist etwas unempfindlicher als die direkten ELISAs mit den Antikörpern M8H5 und MC10E7. Vergleicht man jedoch den Testmittelpunkt mit den Testmittelpunkten der bisher veröffentlichten Immunoassays für Microcystin (Tabelle 5), so zeigt sich, daß dieser Antikörper trotzdem zu den sensitivsten gehört. Mit einem Testmittelpunkt von 0.32 µg/L und einer Nachweisgrenze von 0.07 µg/L läßt sich die Messung von Microcystin-LR gemäß den Anforderungen der Weltgesundheitsorganisation mühelos erfüllen.

Die geringere Affinität gegenüber Microcystin-LR ist erklärlich, wenn berücksichtigt wird, daß das Hapten (Adda) viel kleiner ist, als die für die anderen Microcystin-Antikörper verwendeten Haptene. Das Fehlen von geladenen oder polarisierbaren Gruppen bei Adda wirkt sich zusätzlich vermindern auf die Affinität des Antikörpers aus. Wie bereits besprochen wurde, können ionische oder Dipol-Dipol-Wechselwirkungen einen großen Bindungsbeitrag liefern. Werden diese Faktoren berücksichtigt, so ist die Affinität des Antikörpers erstaunlich hoch. Die Affinitätskonstante dieses Antikörpers zu Microcystin-LR konnte aus Zeitgründen nicht mehr bestimmt werden.

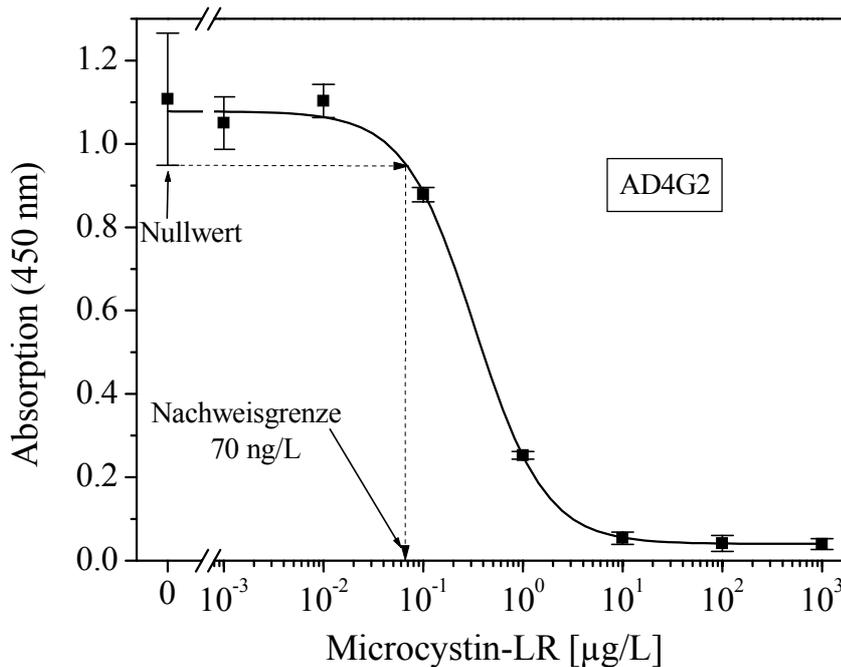


Abb. 64: Kalibrierkurve des direkten kompetitiven Microcystin-LR-ELISA mit monoklonalen Antikörpern AD4G2.

Bedingungen: Anti-Maus-IgG, 1:3 000, 200 µL, 16 h; AD4G2-Ak (Zellüberstand), 1:400, 200 µL, 16 h; PBS-Puffer, 20 µL vorgelegt; Microcystin-LR-Standard, 200 µL, 30 min; MCLR-POD, 1:10 000, 50 µL, 15 min; Substrat TMB/H₂O₂, 200 µL, 22 min; Abstoppen 100 µL. Testparameter: maximale Absorption = 1,08, minimale Absorption = 0,04, Testmittelpunkt = 0,32 µg/L, Steigung = 1,21; Fehler: Spannweite (n = 3) außer Nullwert. Hier Fehler 3s der 17%-gestutzten Werte (n = 12). Nachweisgrenze (Nullwert - 3s): 70 ng/L.

4.6 Kreuzreaktionen

Da dieser Antikörper mit dem Ziel hergestellt worden war, alle Microcystine ohne Diskriminierung zu erkennen und mit genügend hoher Affinität zu binden, war besonders das Studium der Kreuzreaktionen interessant. Dazu wurden alle kommerziell verfügbaren Microcystine, Nodularin sowie Adda und zwei Adda-Derivate getestet. Testmittelpunkte, Nachweisgrenzen und molare Kreuzreaktionen sind in Tabelle 18 zusammengefasst. Die molaren Kreuzreaktionen der Microcystine zeigen Werte zwischen 120 und 50 %, wobei keine Diskriminierung bestimmter Strukturen zu beobachten ist. Die Kalibrierkurven aller Microcystine haben Testmittelpunkte unterhalb 1 µg/L und können somit sensitiv nachgewiesen werden.

Zur Bestimmung der Kreuzreaktion wurde die Kalibrierkurve für Microcystin-LR parallel zu den Kalibrierkurven der Kreuzreaktanden gemessen. Daher können die Kreuzreaktionen aus Tabelle 18 nicht aus den Testmittelpunkten der Kreuzreaktanden und dem hier angegebenen Testmittelpunkt für Microcystin-LR errechnet werden. Der gemittelte Testmittelpunkt aller Kalibrierkurven (Interassay-Testmittelpunkt) beträgt $0,39 \pm 0,07$ µg/L (n = 8; 1s).

Tabelle 18: Testmittelpunkte, Nachweisgrenzen und molare Kreuzreaktionen von Toxinen und Adda-Varianten, bestimmt mit dem direkten kompetitiven ELISA mit Antikörper AD4G2.

Kreuzreaktand	Testmittelpunkt [µg/L]	Nachweisgrenze [µg/L]	Molare Kreuz- reaktion [%]
Nodularin-R	0.16 ± 0.03	0.025	163 ± 41
Microcystin-YR	0.33 ± 0.02	0.043	120 ± 19
[D-Asp ³]Microcystin-RR	0.23 ± 0.05	0.031	109 ± 31
Microcystin-LY	0.43 ± 0.05	0.057	103 ± 15
Microcystin-LR	0.33 ± 0.03	0.068	100
<i>N</i> -Acetyl-Adda-Methylamid	0.14 ± 0.05	0.018	99 ± 54
[D-Asp ³]Microcystin-LR	0.45 ± 0.03	0.095	97 ± 10
Microcystin-LW	0.43 ± 0.08	0.085	84 ± 32
Microcystin-WR	0.35 ± 0.07	0.043	76 ± 10
Microcystin-RR	0.46 ± 0.06	0.071	70 ± 16
Microcystin-LF	0.70 ± 0.08	0.135	69 ± 19
Microcystin-LA	0.42 ± 0.03	0.056	66 ± 24
[D-Asp ³]Microcystin-HtyR	0.39 ± 0.02	0.056	62 ± 8
[D-Asp ³ ,Dhb ⁷]Microcystin-RR	0.90 ± 0.07	0.212	51 ± 5
Adda	0.43 ± 0.10	0.093	27 ± 12
<i>N</i> -Acetyl-Adda	0.77 ± 0.03	0.143	25 ± 4

Bemerkenswert erscheint die relativ niedrige Kreuzreaktion von Adda und *N*-Acetyl-Adda, da letzteres als Hapten für die Immunisierung verwendet wurde. Der einzige Unterschied zwischen diesem Analyten und dem Hapten besteht in dem Vorhandensein der negativ geladenen Carboxylgruppe im *N*-Acetyl-Adda. Tatsächlich zeigt die Kreuzreaktion von *N*-Acetyl-Adda-Methylamid, dessen Carboxylgruppe in ein Methylamid umgewandelt wurde, 99 % Kreuzreaktion. Dies Ergebnis unterstreicht einmal mehr den starken Effekt, den das Vorhandensein von Ladungen auf die Analyt-Antikörper-Bindung ausübt.

Trotz der niedrigeren Kreuzreaktionen von Adda und *N*-Acetyl-Adda liegen die Testmittelpunkte beider Analyten unter 1 µg/L. Die niedrigen Testmittelpunkte (relativ hohe Kreuzreaktionen) dieser Microcystinfragmente stellen den wesentlichen Unterschied zwischen diesem Antikörper und dem Breitbandantikörper M8H5 dar. Sie deuten darauf hin, daß mit AD4G2 bei der Messung von Realproben nicht nur intakte Microcystine erfaßt werden, sondern auch Adda-haltige Microcystinfragmente. Ein ELISA mit dem Antikörper AD4G2 könnte zum empfindlichen Nachweis von Biosyntheseprodukten und Produkten des biologischen Abbaus von Microcystinen dienen.

4.7 Messungen von Wasserproben

Die Stabilität des Antikörpers AD4G2 gegenüber Störkomponenten konnte aus Zeitgründen nicht getestet werden. Es kann jedoch vermutet werden, daß der Antikörper sich im direkten Testformat sehr ähnlich gegenüber Störungen verhält, wie die beiden bereits beschriebenen Antikörper. Einige mögliche Matrixeinflüsse, wie z. B. extreme pH-Werte der Proben, können sehr effektiv durch Zugabe des Blockingpuffers, der in Abschnitt 2.6 beschrieben wurde, neutralisiert werden.

Um die Tauglichkeit des entwickelten Immunoassays für Trink- und Oberflächenwasser zu testen, wurden drei Wasserproben mit unterschiedlichen Konzentrationen Microcystin-LR (MC-LR) aufgestockt und im ELISA gemessen (s. Tabelle 19).

Tabelle 19: Analyse von aufgestockten Wasserproben mittels ELISA mit AD4G2.

Nr.	Herkunft	MC-LR [$\mu\text{g/L}$] aufgestockt	MC-LR [$\mu\text{g/L}$] ELISA (Fehlerbereich)*	Wiederfindung MC-LR [%]
1	Trinkwasser München	0.1	0.155 (0.126-0.185)	155
		0.5	0.527 (0.463-0.604)	105
		1	0.973 (0.859-1.123)	97
2	Wahnbachtalsperre bei Bonn (Trinkwasserspeicher)	0.1	0.141 (0.069-0.212)	141
		0.5	0.524 (0.510-0.538)	104
		1	0.901 (0.829-0.985)	90
3	Pucher See bei München	0.1	0.129 (0.083-0.174)	129
		0.5	0.504 (0.483-0.526)	101
		1	0.945 (0.861-1.047)	95

*: berechnet aus der Standardabweichung (3s) der 20%-gestutzten Werte (n = 5). Mittlere Wiederfindung: (113 \pm 23) %

Bedingungen für ELISA s. Abb. 64. Statt PBS-Puffer wurde der in Abb. 42 beschriebene TRIS-Puffer vor der Probenzugabe vorgelegt und ein entsprechend verdünnter TRIS-Puffer zur Verdünnung des Enzymtracers benutzt.

Aufgrund der sigmoidalen Kurvenform sind die Fehler nicht symmetrisch um den Mittelwert verteilt. In Tabelle 19 scheint eine systematische Überbestimmung der niedrigen Microcystin-LR-Konzentration aufzutreten. Dies kann z. B. an Verdünnungsfehlern oder Matrixeffekten liegen. Trotzdem zeigen die Ergebnisse, daß sich dieser ELISA sehr gut für die Messung von Wasserproben mit Microcystin-Konzentrationen zwischen 0.1 und 1 $\mu\text{g/L}$ eignet.

4.8 Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

Dieses Kapitel beschreibt die Herstellung eines monoklonalen Breitbandantikörpers gegen Microcystine. Der Antikörper wurde durch Immunisierung einer gemeinsamen Teilstruktur der Microcystine generiert. Da ähnliche Versuche für andere Stoffklassen [323, 324] nur beschränkt Erfolg zeigten, scheinen zusätzliche Bedingungen wichtig zu sein. Ein Parameter könnte der Verzicht auf einen Abstandshalter (Spacer) zwischen der immunisierten Teilstruktur und dem Trägerprotein im Immunogen sein. Spacer verbessern zwar die Zugänglichkeit des Haptens für Antikörper, können jedoch dazu führen, daß die Haptene in tiefen Bindungstaschen gebunden werden, die keinen Raum für größere Moleküle mit der Hapten-Teilstruktur lassen.

Wie im Falle des Screenings von Zellkulturüberständen für die Herstellung von monoklonalen Microcystin-Antikörpern wurde auch in diesem Fall der direkte ELISA zum Screening verwendet. Da bisher kein Antikörper existierte, der den *N*-Acetyl-Adda-Enzymtracer binden konnte, wurde für das Screening als Positivreferenz das Serum der letzten Blutung der immunisierten Maus 217 verwendet. Diese interne Referenz, bei welcher derselbe Enzymtracer für Referenz und Proben eingesetzt wird, ist einer externen Referenz, bei der andere Antikörper und Enzymtracer verwendet werden, vorzuziehen. Die Verdünnung des Enzymtracers und die Substrat-Entwicklungszeiten lassen sich mit Hilfe der internen Referenz besser optimieren.

Die Kalibrierkurve des direkten kompetitiven ELISAs mit Antikörper AD4G2 zeigt, daß dieser Immunoassay sich für die Bestimmung von Microcystin gemäß den Anforderungen der Weltgesundheitsorganisation eignet. Die Kreuzreaktionen des Antikörpers zeigen Werte zwischen 120 und 50 % für Microcystine, so daß alle getesteten Vertreter der Stoffklasse sehr empfindlich nachgewiesen werden können.

Der größte Unterschied zwischen diesem Antikörper und den beiden vorher beschriebenen besteht in der Erkennung von Adda und Adda-Derivaten. Mit dem neuen Antikörper ist es möglich, auch Microcystinfragmente, die Adda enthalten, nachzuweisen. Damit könnte z. B. ein Beitrag zur Aufklärung der Biosynthese und des biologischen Abbaus von Microcystinen geleistet werden. Werden die drei Antikörper M8H5, MC10E7, AD4G2 in einem Immunosensorarray oder als HPLC-Detektoren eingesetzt, so läßt sich anhand der Signaldifferenzen der Anteil an argininhaltigen Microcystinen und der Anteil an Adda-haltigen Microcystinfragmenten an der Gesamtmenge abschätzen.

5 Proteinphosphatase-Inhibitionsassay

Der homogene Proteinphosphatase-Inhibitionsassay wurde hier vornehmlich zur Detektion der HPLC-Trennung von Microcystinen eingesetzt. Zur Optimierung dieses Testverfahrens sei auf die Literatur hingewiesen [31, 125, 127, 128], wo viele Prozeduren im Detail beschrieben und diskutiert werden. Der Test kann sowohl mit dem Enzym Proteinphosphatase 1 (PP1) als auch mit dem Enzym PP2A ohne Änderungen durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde die katalytische Untereinheit von PP1 verwendet, da sie als rekombinantes Proteins kommerziell erhältlich ist und der Test dadurch besser reproduzierbar ist. Die Bindung zwischen dem Enzym und den Microcystinen wurde durch Inhibition der Umsetzung des Substrates *p*-Nitrophenylphosphat (*p*NPP) zu dem gelben *p*-Nitrophenolat nachgewiesen. Die Testdurchführung erfolgte in Anlehnung an eine von WIRSING et al. [31] beschriebene Prozedur.

Trotz der relativ umfangreichen Literatur zur Anwendung des Enzym-Inhibitionsassays als Meßmethode für Microcystine, scheinen einige Parameter der Testdurchführung bisher ungenügend untersucht worden zu sein. Dies gilt insbesondere im Hinblick auf die Kinetik der Microcystin-Enzymbindung, die in Abschnitt II.2.3.2 beschrieben wurde. Es handelt es sich hierbei um einen zweistufigen Prozeß, bei dem zunächst eine schnelle, reversible Bindung des Microcystins erfolgt und anschließend eine langsame irreversible, kovalente Bindung. In den bisher beschriebenen Verfahren zur Optimierung des Tests wurde jedoch der Einfluß der Vorinkubationszeit der Microcystin-Enzym-Lösung auf den Testmittelpunkt und die Kreuzreaktionen kaum untersucht. Die in der Literatur beschriebenen Verfahren verwenden Vorinkubationszeiten zwischen 0, 5 und 8 Minuten. Abb. 65 zeigt zwei Kalibrierkurven für Microcystin-LR ohne und mit 20 Minuten Inkubationszeit vor der Substratzugabe. Der Testmittelpunkt fällt dabei um den Faktor 3. Dieses Experiment zeigt, daß die Vorinkubation von Microcystin und Enzym durchaus einen Beitrag zu der Empfindlichkeit des Assays leistet. Untersuchungen der Auswirkung von sehr langen Vorinkubationszeiten auf Testmittelpunkte und Kreuzreaktionen wurden hier jedoch nicht durchgeführt.

Im Unterschied zu den heterogenen Immunoassays, wo meist das gleiche Füllvolumen der Kavitäten verwendet wird, um die auf der Oberfläche immobilisierten Moleküle gleichmäßig zu benetzen, kann beim homogenen Enzym-Inhibitionsassay das Probenvolumen über einen großen Bereich variiert werden. Da auch das Volumen der Enzym- und Substratlösung frei gewählt werden kann, kommt es zu einer variabel einstellbaren Verdünnung der Probe. Diese Verdünnung muß berücksichtigt werden, wenn der Immunoassay und der Enzym-Inhibitionsassays miteinander verglichen werden sollen. In Abb. 65 ist deshalb ein Korrekturfaktor der Microcystin-LR-Standards von 4 eingerechnet, um eine Vergleichbarkeit zu den bisher beschriebenen Immunoassays zu ermöglichen.

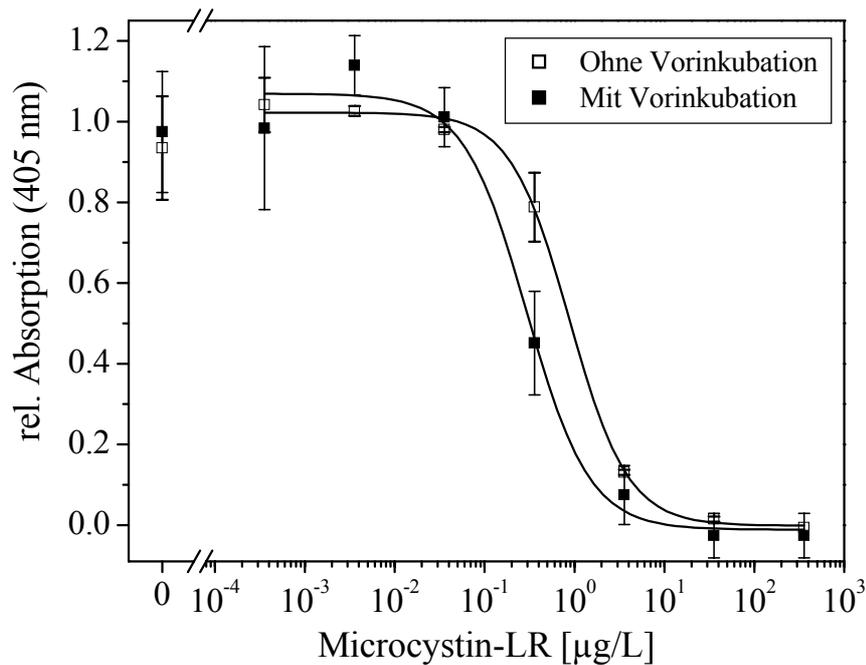


Abb. 65: Homogener Enzym-Inhibitionsassay zur Messung von Microcystin-LR.

Bedingungen (ohne Vorinkubation): 144 µL Substratlösung (33 mM pNPP in TRIS-Puffer I 50 mM, pH 8.1; 14 mM MgCl₂; 0.5 mM D,L-Dithiothreitol, 0.2 mM MnCl₂, 0.5 g/L BSA) und 50 µL Microcystin-LR Standard werden 12 Minuten bei 30 °C inkubiert, 20 µL Enzymlösung (0.25 mg/L Enzym in TRIS-Puffer II, 50 mM pH 7.1; 1 mM D,L-Dithiothreitol, 1 mM MnCl₂, 1 g/L BSA) zugegeben und 135 Minuten inkubiert. Bedingungen (mit Vorinkubation): 50 µL Microcystin-LR-Standard und 10 µL Enzymlösung (0.25 mg/L Enzym in TRIS-Puffer II) zugegeben und 20 Minuten vorinkubiert; dann 144 µL Substratlösung (33 mM pNPP in TRIS-Puffer II) zugegeben und 1 Stunden entwickeln. Testmittelpunkt: ohne Vorinkubation 0.29 µg/L; mit Vorinkubation 0.87 µg/L Microcystin-LR.

Ein weiterer kritischer Punkt der Testdurchführung ist die Zugabe von Dithiothreitol (DTT) zu den verwendeten Puffern. Dieses Reagenz besitzt zwei Thiolgruppen, die reduzierend wirken und Disulfidbindungen in Proteinen spalten können. DTT ist laut Angaben der Enzymlieferanten für die Aktivität der Proteinphosphatasen wichtig. Auf den Microcystin-Assay kann es jedoch mehrere Auswirkungen haben. Zum einen reagieren Thiole mit der α,β -ungesättigten Carbonylgruppe der Microcystine und die Reaktionsprodukte können dann möglicherweise andere Kreuzreaktionen besitzen. Zum anderen wird durch die Zugabe von DTT die SH-Gruppe in der Bindungstasche der Enzyme aktiviert und eine irreversible Bindung der Microcystine, nicht jedoch der Nodularine, ermöglicht. Ein weiterer Nebeneffekt von DTT ist die Denaturierung von BSA, welches zur Stabilisierung des Enzyms den Puffern zugegeben wird. Die in der Bildunterschrift von Abb. 65 beschriebenen Puffer müssen immer frisch angesetzt werden, da BSA in Anwesenheit von DTT ausfällt. Trotz der kritischen Anmerkungen und offenen Fragen zu der Durchführung des Enzym-Inhibitionsassays ist dieses Verfahren zur Bestimmung von Microcystinen schnell, empfindlich und einfach durchzuführen. Die benötigte Laborausstattung ist weniger aufwendig als beim ELISA. Limitierend ist bisher die geringe Nachweisempfindlichkeit des verwendeten Substrats und die Verfügbarkeit des Enzyms.

6 Mehrdimensionale ELISA-Detektion in der HPLC

In diesem Kapitel wird die parallele Detektion der chromatographischen Trennung einer Microcystin-Mischung mit drei Antikörpern und dem Enzym PP1 beschrieben. Die Detektion findet off-line statt und verbindet die bisher beschriebenen Verfahren der HPLC-Trennung, des direkten, kompetitiven ELISA und des Enzym-Inhibitionsassays. Durch die Kopplung der Verfahren kann die Nachweisempfindlichkeit der HPLC-Trennung verbessert werden und Einzelkomponentenanalytik mit Immunoassays wird möglich. Die Quantifizierung der immunologischen Detektion der HPLC-Trennung wird am Beispiel von Microcystin-LR und von zwei Kreuzreaktanden demonstriert. Umgekehrt kann diese Methode zur Bestimmung von Kreuzreaktionen angewendet werden. Anhand einer Realprobe wird die HPLC-ELISA-Methode mit der massenspektrometrischen Analyse verglichen.

6.1 Motivation

Als Anlaß für die Einführung der HPLC-ELISA-Kopplung können die oft mehrstufigen und ineffizienten Probenvorbereitungsverfahren betrachtet werden, die für die Messung von Realproben mittels HPLC nötig sind und in Abschnitt II.2.1 beschrieben sind. Diese Verfahren diskriminieren häufig hydrophobe Microcystine und sind nur für wenige validiert. Wird die HPLC-ELISA-Kopplung verwendet, so ist bei Proben niedriger Microcystin-Konzentration (z. B. Trink- oder Oberflächenwasser) keine Anreicherung notwendig, während Proben hoher Microcystin-Konzentration (z. B. Algenextrakte) soweit verdünnt werden können, daß sich der Einfluß der Matrix minimiert. Dadurch kann auf Probenvorbereitung, die zeit- und optimierungsaufwendig ist, verzichtet werden.

6.2 Experimentelle Durchführung

Der experimentelle Aufbau der off-line-HPLC-ELISA-Kopplung besteht aus einer HPLC-Anlage mit UV-Detektor und einem Fraktionensammler, der das Eluat in die Kavitäten von Mikrotiterplatten verteilen kann. In diese Kavitäten wird ein neutraler Puffer vorgelegt, der das TFA-saure Eluat neutralisiert und den Lösungsmittelanteil reduziert. Bei der Messung von Realproben kann hierfür der gleiche Puffer verwendet werden, der für die Realprobenmessung mit Immunoassays beschrieben wurde. Die verdünnten und neutralisierten Fraktionen können verschlossen und bei kühler Lagerung über längere Zeit aufbewahrt werden. Die Fraktionierung in Kavitäten von Mikrotiterplatten erleichtert die Durchführung der Kopplung wesentlich, da es möglich ist, sehr kleine Fraktionsgrößen (20-100 μ L) zu wählen

und dadurch eine relativ gute Auflösung der Peaks mit dem Mikrotiterplatten-Lesegerät zu erhalten. Außerdem wird der Umgang mit den Fraktionen erleichtert, da sie mit Hilfe von Multikanalpipetten einfach in andere Mikrotiterplatten übertragen werden können. Ist eine sehr rasche Durchführung der HPLC-ELISA-Kopplung notwendig, so kann das Eluat der chromatographischen Trennung direkt in Antikörper-vorbeschichtete Mikrotiterplatten fraktioniert werden.

6.3 Optimierung der mehrdimensionalen HPLC-ELISA-Kopplung

Einige kritische Faktoren sind bei der Nachsäulenkopplung von immunologischen oder Enzym-Inhibitionsassays an die HPLC zu berücksichtigen. Beispielsweise umfaßt der Meßbereich des ELISAs lediglich zwei Größenordnungen und ist demnach wesentlich schmaler als der lineare Bereich der UV-Absorption. Zudem ist der Meßbereich sowohl von der Kreuzreaktion des Analyten als auch vom verwendeten Antikörper oder Enzym abhängig. Die Kalibrierfunktion ist im Gegensatz zu der UV-Absorption in den Grenzen des LAMBERT-BEERSchen Gesetzes nicht linear, sondern sigmoidal. Gegebenenfalls müssen HPLC-Frak-tionen mehrmals verdünnt und gemessen werden, um in den linearen Bereich der ELISA-Kalibrierfunktion zu gelangen. Kann die Konzentration mittels UV-Detektion bestimmt werden, so kann die für den ELISA nötige Verdünnung jedoch berechnet werden.

Ein weiterer kritischer Faktor ist der saure pH-Wert der Fraktionen und der Anteil an organischem Lösungsmittel, da beide die Stabilität und Affinität von Antikörper und Enzymtracer verändern. Dieses Problem wird durch die Verdünnung der Fraktionen mit einem neutralen Puffer gelöst.

Der dritte kritische Faktor ist die Fraktionsgröße. Hier muß ein Kompromiß zwischen hoher Auflösung und Anzahl der zu messenden Fraktionen gefunden werden. Die maximale Fraktionsgröße ist durch dasjenige Peakpaar limitiert, dessen Retentionszeiten in der Chromatographie am engsten beieinander liegt.

Die bei immunologischer Detektion erhaltene Spur zeigt die Microcystinpeaks als Inhibition des Nullwertsignals des direkten kompetitiven ELISA, wie in Abb. 66 dargestellt.

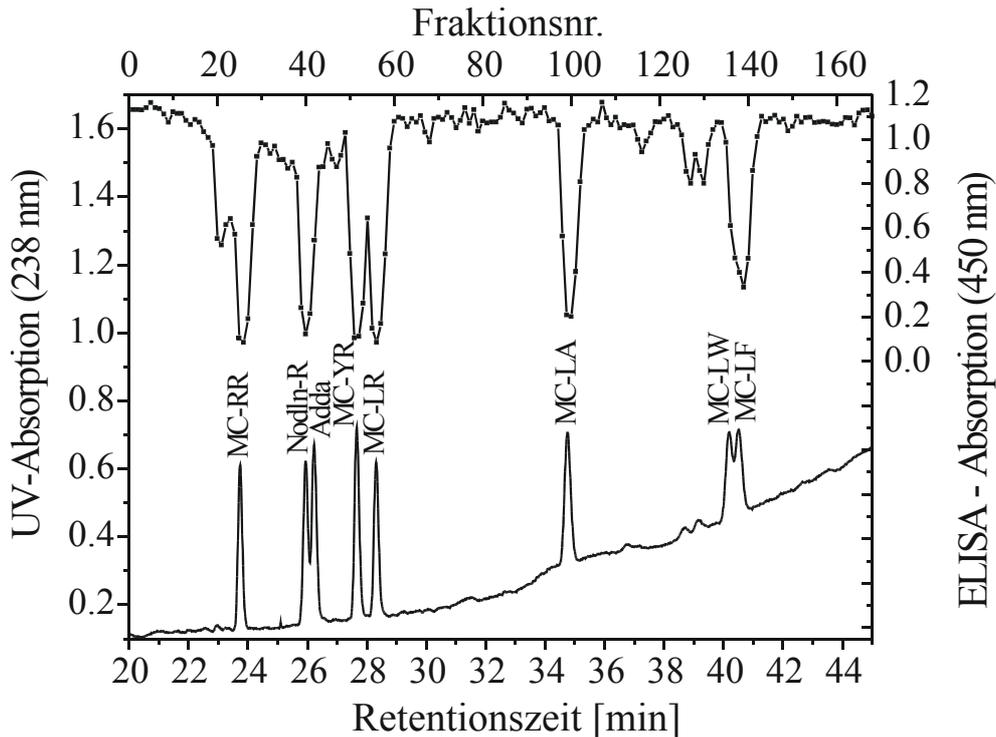


Abb. 66: Kopplung der UV-HPLC von Microcystinen mit der ELISA-Detektion. Das UV-Chromatogramm ist unten dargestellt, das ELISA-Chromatogramm oben.

Das von der Amid- C_{16} -Säule kommende Eluat wurde in Fraktionen von 6 Tropfen/Kavität in eine Mikrotiterplatte fraktioniert, wobei in die Kavitäten je 120 μ L Phosphat-Kochsalzpuffer pH 7.8 vorgelegt wurden. Die Konzentrationen der Toxinstandards betragen je 1 mg/L. Es wurde ein in Abb. 39 beschriebener ELISA mit Antikörper M8H5 durchgeführt, wobei die Fraktionen für den ELISA 1:20 verdünnt wurden, was einer Verdünnung von insgesamt 1:40 entspricht.

Der Breitbandantikörper M8H5, der in diesem Fall für die immunologische Detektion eingesetzt wurde, bindet alle Microcystine, nicht jedoch die Aminosäure Adda. Das Peakpaar der hydrophoben Microcystine-LW und -LF, wird im "Immunogramm" nicht aufgelöst, da die chromatographische Trennung zu gering ist und hinter dem UV-Detektor eine Peakverbreiterung auftritt.

Um zu zeigen, daß die parallele Kopplung von HPLC und ELISA mit mehreren Antikörpern unterschiedlicher Selektivität möglich ist, wurden die HPLC-Fraktionen einer chromatographischen Trennung verdünnt und mit allen zur Verfügung stehenden Antikörpern sowie dem Enzym PP1 gemessen. Eine Mischung bestehend aus Nodularin und den Microcystinen -RR, -YR, -LR, -LA, -LW und -LF in der Konzentration von je 1 mg/L wurde injiziert (20 μ L), getrennt und mit den verschiedenen Detektoren nachgewiesen. Das Ergebnis zeigt Abb. 67.

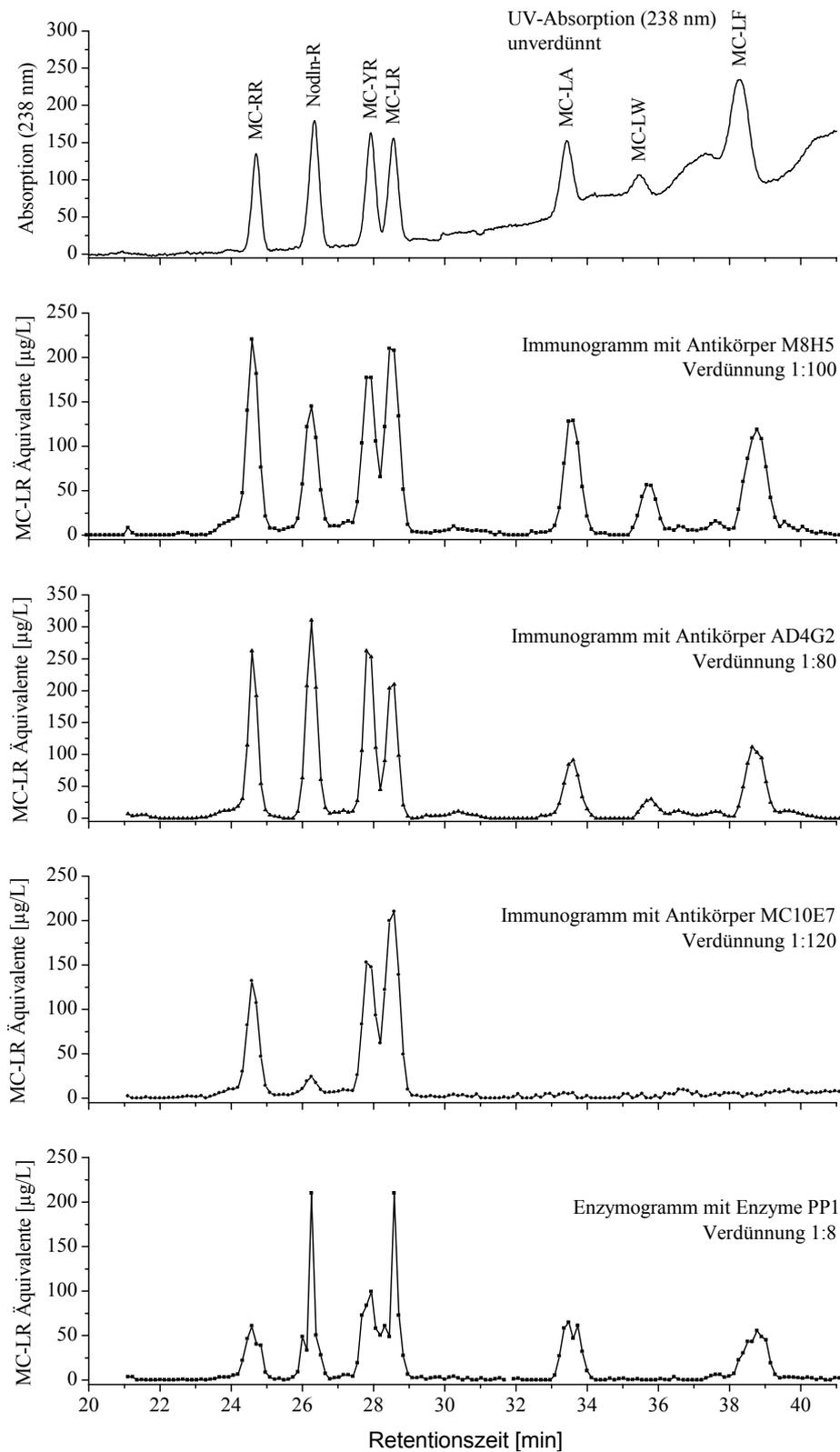


Abb. 67: Chromatographische Trennung einer Toxin-Standardmischung (1 mg/L, 20 µL Injektionsvolumen) auf RP-Amid-C₁₆ und paralleler UV-Detektion (238 nm), Detektion mit drei monoklonalen Antikörpern (M8H5, MC10E7 und AD4G2) und dem Enzym PPI.

Um die Signale der biochemischen Detektion konzentrationsabhängig als positive Peaks darzustellen, wie in Abb. 67 gezeigt, wird eine Kalibrierkurve parallel zu den HPLC-Fractionen vermessen. Die Absorptionen des ELISA oder des Enzym-Inhibitionstests werden mit Hilfe der vierparametrischen Fitfunktion und der Parameter der Kalibrierkurven in Äquivalentkonzentrationen des Standardanalyten (Microcystin-LR) umgerechnet. Die auf diese Weise erhaltenen Signale der Toxine beinhalten deren Kreuzreaktionen. Für die in Abb. 67 dargestellte Messung wurden die Microcystine und Nodularin-R (Nodln-R) in gleicher Konzentration eingesetzt. In diesem Fall ist die Peakhöhe direkt mit der Kreuzreaktion korreliert. Während die Antikörper M8H5 und AD4G2 alle Kreuzreaktanden erkennen und binden, zeigt das Immunogramm des Antikörpers MC10E7 lediglich die Peaks der hydrophilen Microcystine -RR, -YR und -LR sowie mit einer geringen Kreuzreaktion den Peak von Nodularin. Dieses Ergebnis veranschaulicht das Potential der mehrdimensionalen biochemischen Detektion chromatographischer Trennungen. Durch Verwendung von Antikörpern unterschiedlicher Selektivität kann eine schnelle und empfindliche partielle Strukturaufklärung unbekannter Microcystine erfolgen.

6.4 Quantifizierung von Microcystinen

Zunächst wurde der Einfluß der Kreuzreaktionen auf die Quantifizierung untersucht. Hierfür wurde der Antikörper MC10E7 und die Kreuzreaktanden Nodularin-R und Microcystin-YR und -RR ausgewählt. Während die beiden Microcystine eine hohe Kreuzreaktion besitzen, zeigt Nodularin nur 7 % Kreuzreaktion. Die Ergebnisse der HPLC-ELISA-Quantifizierung wurden mit den Werten der UV-Absorption verglichen und sind in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: Vergleich von Analytmengen, die mittels HPLC-UV und mittels HPLC-ELISA für Analyten unterschiedlicher Kreuzreaktion bestimmt wurden (Antikörper M8H5).

Alle Werte wurden mindestens dreifach bestimmt.

Analyt (massenbezogene Kreuzreaktion [%])	m [ng] UV	m [ng] ELISA
Microcystin-LR (100)	23.8 ± 0.9	26.3 ± 1.2
Microcystin-YR (68 ± 7)	21.5 ± 0.7	23.1 ± 1.0
Microcystin-RR (96 ± 22)	13.0 ± 0.5	11.6 ± 1.6
Nodularin (7.3 ± 1.3)	30.5 ± 1.2	27.5 ± 1.4

Wie aus Tabelle 20 zu erkennen ist, gibt es über einen weiten Kreuzreaktionsbereich eine gute Übereinstimmung zwischen der Quantifizierung mittels HPLC-UV und HPLC-ELISA. Zur Berechnung der Absolutmengen von Microcystinen in dem Immunogramm wurde Gleichung 9 verwendet.

$$m[\text{ng}] = \frac{V[\mu\text{L}] \cdot d \cdot \sum_1^n c \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \right]}{10 \cdot \text{CR}[\%]} \quad \text{Gleichung 9}$$

- m: Absolutmenge von Microcystin in der Probe
 V: Volumen einer HPLC-Fraktion
 d: Verdünnungsfaktor der HPLC-Fraktionen für die Durchführung des ELISA
 n: Zahl der positiven Fraktionen
 c: Konzentration der Einzelfraktionen, berechnet aus der logistischen Fitfunktion (Gleichung 3)
 CR: Massenbezogene Kreuzreaktion

Weiterhin wurde der Einfluß der Fraktionsgröße auf die Quantifizierung untersucht. Auch diese Untersuchungen wurden mit Antikörper MC10E7 und Microcystin-LR durchgeführt. Da die in einem Peak vorhandene Microcystinmenge komplett in einer oder mehreren Kavitäten aufgefangen wird, sollte die Quantifizierung unabhängig von der Fraktionsgröße sein. Dies zeigen die in Tabelle 21 dargestellten Ergebnisse.

Tabelle 21: Vergleich der Absolutmengen Microcystin-LR, die bei der Auswertung der HPLC-ELISA-Kopplung für unterschiedliche Fraktionsgrößen erhalten wurden. (Antikörper MC10E7).

Quantifizierung von Microcystin-LR	m [ng] (n = 6)
15 Fraktionen pro Peak	22.4 ± 2.4
6 Fraktionen pro Peak	21.1 ± 1.2
1 Fraktion pro Peak (vereinigt)	22.9 ± 2.7

6.5 Bestimmung der Nachweisgrenze mit Antikörper MC10E7

Ein Vergleich der Nachweisstärke von UV- und ELISA-Detektion ist in Abb. 68 dargestellt. 20 μL einer Microcystin-LR-Lösung von 10 $\mu\text{g/L}$ wurden injiziert und mittels UV- und ELISA-Detektion untersucht. Bei der UV-Detektion ist lediglich die Grundlinie zu erkennen, während das Immunogramm einen Peak deutlich über dem Rauschen zeigt. Als Nachweisgrenze wurde eine Microcystin-LR-Konzentration von 2 $\mu\text{g/L}$ (0.04 ng absolut) errechnet, die ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 3 liefern würde. In die Berechnung der Nachweisgrenze für die ELISA-Detektion wurde eine 1:10-Verdünnung des HPLC-Eluats mit Puffer einbezogen. Diese Nachweisgrenze liegt demnach um mindestens Faktor 15 niedriger als diejenige der UV-Detektion (0.6 ng Microcystin-LR, vgl. Abschnitt 1.4). Der vorläufig von der Weltgesundheitsorganisation vorgeschlagene Grenzwert von 1 $\mu\text{g/L}$ Microcystin-LR könnte mit dieser Methode ohne Voranreicherung der Probe erreicht werden, wenn z. B. ein Injektionsvolumen von 200 μL verwendet wird und die HPLC-Fractionen anschließend 1:10 mit Puffer verdünnt werden.

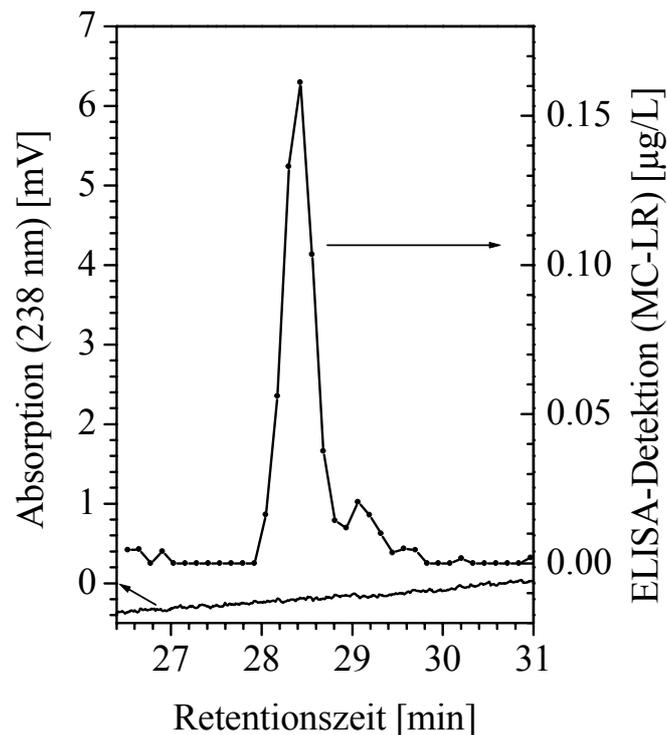


Abb. 68: Vergleich der Nachweisempfindlichkeit von UV-Detektion (untere Linie) und ELISA-Detektion (obere Linie) für Microcystin-LR.

20 μL einer Microcystin-LR-Lösung (10 $\mu\text{g/L}$) wurden injiziert (Säule RP-Amid- C_{16}), die UV-Absorption bei 238 nm verfolgt, das Eluat fraktioniert, 1:10 mit PBS verdünnt und mittels ELISA mit dem Antikörper MC10E7 detektiert.

6.6 Bestimmung von Kreuzreaktionen

Die HPLC-ELISA-Kopplung kann nicht nur zur Quantifizierung von Microcystinen in einem niedrigen Konzentrationsbereich dienen, sondern auch für die schnelle Bestimmung von Kreuzreaktionen unbekannter Toxine oder neuer Antikörper bzw. Liganden. Hierzu können sehr kleine Mengen des Kreuzreaktanden ausreichen. Voraussetzung ist jedoch, daß diese Mengen durch ihre UV-Absorption detektiert werden können, daß der Extinktionskoeffizient bekannt ist und der Referenzanalyt (Microcystin-LR) parallel vermessen wird. Im Falle der Microcystine kann davon ausgegangen werden, daß ihre Absorption bei 238 nm weitgehend identisch ist (vgl. Abschnitt III.1.1). Einige Kreuzreaktionen des Antikörpers MC10E7 wurden beispielhaft mittels HPLC-ELISA und Gleichung 10 bestimmt.

$$CR[\%] = \frac{\sum_1^n c_{MC-XY}}{\sum_1^m c_{MC-LR}} \cdot \frac{A_{MC-LR}}{A_{MC-XY}} \quad \text{Gleichung 10}$$

- $\sum_1^n c_{MC-XY}$: Konzentration des Kreuzreaktanden, als Summe der Microcystin-LR-Äquivalentkonzentrationen aller Fraktionen, die zu dem Peak von Microcystin-XY (MC-XY) gehören.
- $\sum_1^m c_{MC-LR}$: Microcystin-LR-Konzentration, als Summe der Konzentrationen aller Fraktionen, die zu dem Microcystin-LR-Peak gehören.
- A: Peakfläche, bestimmt über UV-Absorption bei 238 nm.

Ein Vergleich der Kreuzreaktionen (CR), die aus den Testmittelpunkten der Kalibrierkurven nach der Methode von ABRAHAM [254] bestimmt wurden und den mittels HPLC-ELISA-Kopplung bestimmten Werten, ist in Tabelle 22 dargestellt. Wie in Tabelle 22 zu erkennen ist, eignet sich die neue Methode über einen weiten Kreuzreaktionsbereich sehr gut zur schnellen, empfindlichen und parallelen Bestimmung der Kreuzreaktionen eines Antikörpers.

Tabelle 22: Vergleich der massenbezogenen Kreuzreaktionen, die mit der herkömmlichen Methode über die Testmittelpunkte von Kalibrierkurven bestimmt wurden und denjenigen, die mittels Auswertung der HPLC-ELISA-Kopplung erhalten wurden.

Analyt	CR [%] bestimmt über Testmittelpunkte	CR [%] bestimmt über HPLC-ELISA
Microcystin-LR	100	100
Microcystin-YR	68 ± 7	66 ± 6
Microcystin-RR	96 ± 22	76 ± 14
Nodularin-R	7.3 ± 1.3	5.5 ± 0.5

6.7 Messung von Realproben

Die HPLC-ELISA-Analyse eines Extrakts gefriergetrockneter Algen (*Microcystis sp.*, Blüte 1993, Australien) ist in Abb. 69 dargestellt. Die Überlegenheit der ELISA-Detektion gegenüber der UV-Detektion ist hier gut zu erkennen. Während der UV-Detektor kein Signal bei der Retentionszeit 25.6 Minuten aufgezeichnet, wird dieser Peak sowohl mit dem M8H5-, als auch mit dem MC10E7-Antikörper detektiert. Das von dem empfindlicheren Antikörper MC10E7 erzeugte Signal ist höher als bei Antikörper M8H5. Andere UV-Peaks hingegen, wie z. B. bei der Retentionszeit 27.8 Minuten, werden von keinem der beiden Antikörper erkannt. Es kann folglich ausgeschlossen werden, daß es sich hierbei um ein intaktes Microcystin handelt. Der Peak bei der Retentionszeit von 29 Minuten ist auf allen Detektorspuren zu erkennen. Es handelt sich um Microcystin-LR. Die Peaks mit längeren Retentionszeiten, welche hydrophoben, nichtargininhaltigen Microcystinen zugerechnet werden, werden vom Antikörper MC10E7 nicht erkannt. Antikörper M8H5 detektiert in diesem Bereich zwei Peaks bei 33.8 und 34.9 Minuten, nicht jedoch den Peak bei 38 Minuten.

Die Gegenüberstellung der UV-Detektion und der selektiven immunologischen Detektion zeigt, daß die Quantifizierung der UV-Absorption sowohl zu einer Unterbestimmung als auch zu einer Überbestimmung der Microcystine in einer Probe führen kann.

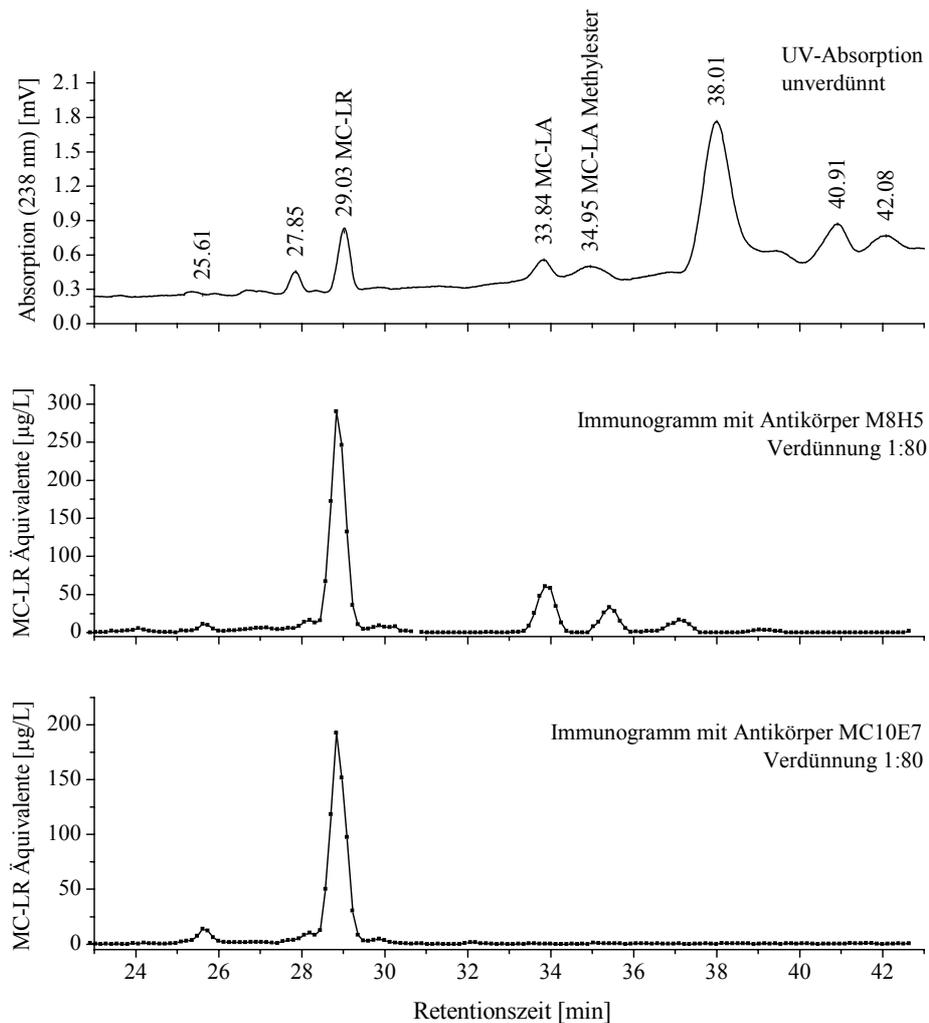


Abb. 69: Chromatographische Trennung eines Extrakts gefriergetrockneter Algen an RP-Amid- C_{16} und Detektion der UV-Absorption (238 nm), und der Bindung an die monoklonalen Antikörper M8H5 und MC10E7.

Die massenspektrometrische Analyse dieser Realprobe ist in Abschnitt 8.5 beschrieben. Massenspektrometrisch werden mehr potentielle Microcystine in der Probe detektiert als mit der HPLC-ELISA-Methode. Die HPLC-ELISA-Kopplung kann folglich auch bei der Untersuchung einer Probe mit Massenspektrometrie hilfreich sein, da sie Aufschluß darüber gibt, welches die Maximalzahl der enthaltenen Microcystine ist. Wird der MS-Detektor parallel zu der immunologischen Detektion einer chromatographischen Trennung eingesetzt, so müssen nur diejenigen Peaks untersucht werden, die im ELISA positiv sind.

6.8 Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

In diesem Kapitel wurde gezeigt, daß die Nachsäulenkopplung biochemischer Assays an die Chromatographie eine sehr empfindliche und hochselektive Analyse von Verbindungsklassen, wie z. B. den Microcystinen, erlaubt. Die Kopplung ist insbesondere für die Untersuchung solcher Substanzklassen vorteilhaft, bei denen die Zahl der verfügbaren Standards im Vergleich zu der maximalen Anzahl potentieller Analyten in der Probe gering ist oder die Proben stark matrixbelastet sind. Sie eignet sich außerdem für die Suche nach neuen, biologisch aktiven Substanzen, wie z. B. beim Wirkstoffscreening in der pharmazeutischen Forschung.

Die off-line-Kopplung ist sehr einfach durchzuführen und erlaubt die parallele Detektion mit verschiedenen Rezeptoren, da die Fraktionen aliquotiert werden können. Auch ist eine spätere Analyse der Fraktionen möglich. Die Kalibrierung ist ebenfalls einfach durchzuführen, da die Messung der Analytstandards in die Messung der Fraktionen einbezogen werden kann.

Die Auswertung der Daten ist relativ kompliziert, da die Kalibrierkurve des Immunoassays sigmoidal ist und die Peaks zunächst negativ erscheinen, als Folge des Inhibitionsmechanismus des Immunoassays. Zusätzlich müssen die Kreuzreaktionen bei der Auswertung berücksichtigt werden, wenn die ELISA-Signale in Konzentrationswerte umgerechnet werden sollen. Daß die Quantifizierung trotzdem möglich ist, wurde an Microcystin-LR und zwei Kreuzreaktanden mit hoher und niedriger Kreuzreaktion demonstriert. Weiterhin wurde gezeigt, daß die Quantifizierung nicht von der Fraktionsgröße abhängig ist, solange die Peaks gut voneinander getrennt sind.

Der Nachweis des von der WHO vorgeschlagenen Grenzwertes von 1 µg/L Microcystin-LR kann mittels HPLC-ELISA-Kopplung ohne vorherige Probenanreicherung erreicht werden. Ein UV-Detektor kann diese Nachweisgrenze nicht erreichen, während der ELISA als alleinige Methode lediglich Microcystin-LR-Äquivalente liefert.

7 Übertragung des Microcystin-Immunoassays in ein sensortaugliches Format

In dieser Arbeit wurden Vorversuche zur Messung von Microcystinen mit einem Immunsensor durchgeführt. Der von SCHÜTZ und WINKLMAIR aufgebaute Sensor [232, 326] ermöglicht die parallele Bestimmung von Umweltschadstoffen in Wasser. Der Aufbau des Sensors ist so konzipiert, daß die Microcystin-Analyse entweder zusätzlich zu der Analyse anderer Umweltschadstoffe erfolgen kann oder daß er sich speziell für die Microcystin-Analytik optimieren läßt. Stehen verschiedene Microcystin-bindende Biomoleküle (Antikörper oder Enzyme) zur Verfügung, so läßt sich eine Probe mit geringem Aufwand gleichzeitig mit all diesen Biomolekülen untersuchen und dadurch besser charakterisieren. Dies ist besonders für die Analytik von Microcystinen interessant, da sie in großer Vielfalt auftreten und nur wenige als Standards verfügbar sind. Würde die Microcystin-haltige Probe gleichzeitig mit einem Breitbandantikörper (z. B. Adda-Antikörper), einem oder mehreren spezifischen Antikörpern (z. B. Microcystin-LR-Antikörper) und den beiden Microcystin-bindenden Enzymen (Proteinphosphatase 1 und 2A) untersucht, so ließe sich mit einer Messung der Gesamtgehalt an Microcystinen, die "Toxizität" und die Zusammensetzung der Probe bestimmen.

Das Prinzip des Sensors beruht darauf, daß eine Komponente des Antigen-Antikörper-Paares auf der Oberfläche eines Glasträgers immobilisiert wird, der Glasträger anschließend in eine Durchflußkammer integriert wird und die weiteren Komponenten des ELISA nacheinander durch die Kammer geleitet werden. Die Detektion der Antigen-Antikörper-Bindung erfolgt durch Messung von Chemilumineszenz-Licht, das durch den Glasträger hindurch von einer CCD-Kamera aufgenommen wird. Abb. 70 zeigt ein ELISA-Prinzip, das für die Messung von Microcystinen mit dem Immunsensor geeignet ist.

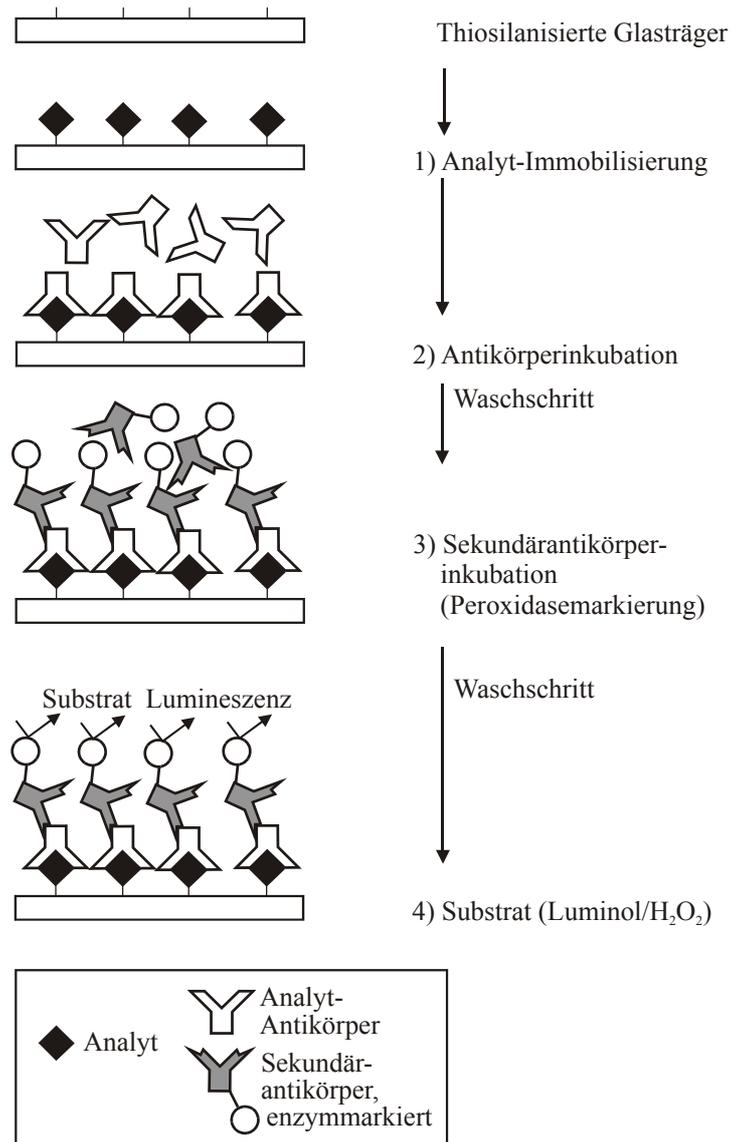


Abb. 70: Indirekter nichtkompetitiver ELISA zur Messung von Microcystinen im Immunosensor.

Im ersten Schritt werden Microcystine kovalent an eine thiosilanisierte Glasoberfläche gebunden. Nach einem Waschschrift folgt die Antikörper-Inkubation und nach weiteren Waschschriften die Inkubation des Enzymmarkierten Sekundärantikörpers und die Zugabe des Enzymsubstrats.

Da sich Microcystine ohne weitere Aktivierung kovalent an thiosilanisierte Glasoberflächen binden lassen, kann ein nichtkompetitiver Assay durchgeführt werden. Dieser erreicht theoretisch eine höhere Empfindlichkeit als kompetitive Assays. Die Immobilisierung von Microcystinen auf Glasträgern ist in Abb. 71 dargestellt.

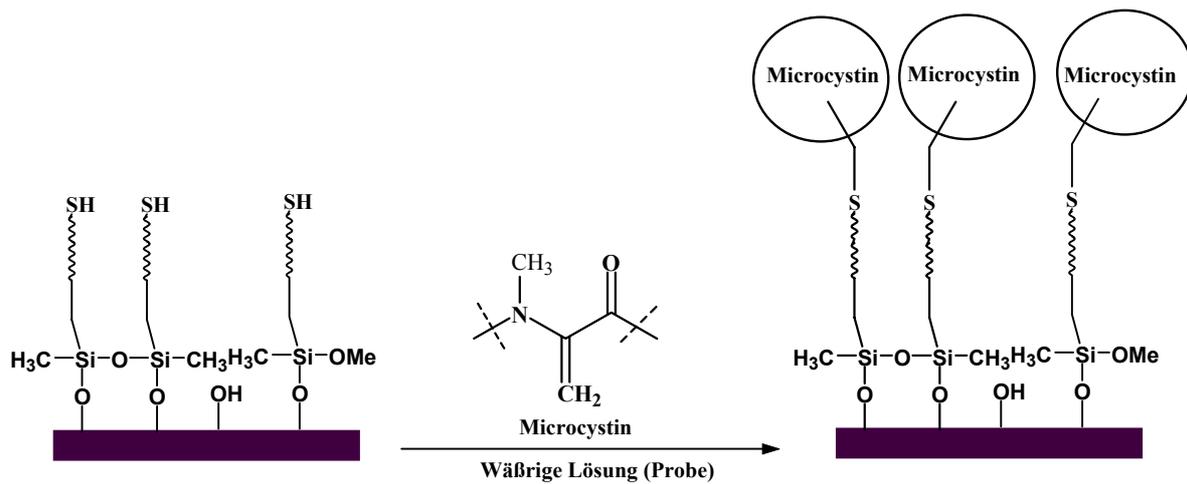


Abb. 71: Kovalente Immobilisierung von Microcystin-LR auf einem thiosilanisierten Glasträger.

Die Thiosilanisierung wurde in zwei Stufen erreicht: Im ersten Schritt wurde der Glasträger mit 2-Aminoethyl-3-aminopropyl-methyldimethoxysilan aminosilanisiert und im zweiten Schritt durch Reaktion mit TRAUT's Reagenz (2-Iminothiolan) thioliert. Danach wurde eine Microcystinlösung (9 mg/L in Wasser + 10 % Glycerin) auf den Glasträger gespottet, 2,5 h reagieren gelassen und anschließend abgewaschen. Nicht abreagierte Amino-
gruppen wurden anschließend mit Bernsteinsäureanhydrid geblockt.

Die Glasträger wurden zuerst aminosilanisiert und in einem zweiten Schritt thioliert. Eine direkte Thiosilanisierung mit 3-Mercaptopropyltrimethoxysilan (MTPMS) war nicht erfolgreich. Das Ergebnis des ELISA im Immunosensorformat ist in Abb. 72 zu sehen.

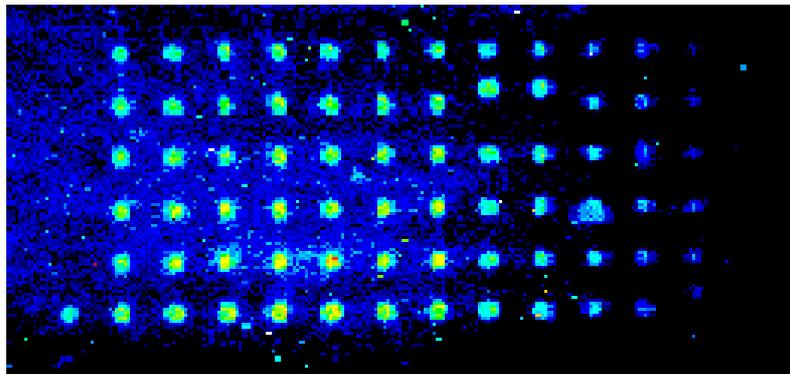


Abb. 72: Messung von Microcystin-LR im Immunosensor.

Der monoklonale anti-Microcystin-LR-Antikörper (M8H5, Zellüberstand) wurde 1:8 000 verdünnt und der anti-Maus-Peroxidasemarkierte Antikörper (aus Pferd, Firma VECTOR) wurde ebenfalls 1:8 000 verdünnt. Die Antikörper wurden in PBS-Puffer gelöst, der mit Zusätzen wie Polyacrylsäure versehen war, um unspezifische Bindung an die Oberfläche zu verhindern. Die Durchführung erfolgte analog zu der von SCHÜTZ beschriebenen Methode [327].

Die hell leuchtenden Spots zeigen eine erfolgreiche Antikörper-Antigen-Bindung an. Durch diese Ergebnisse konnte gezeigt werden, daß die kovalente Immobilisierung von Microcystin-LR auf Glasoberflächen möglich ist und damit eine weitere, völlig neue Methode zur Messung von Microcystinen zur Verfügung steht. Zukünftige Arbeiten in diesem Bereich müßten sich darauf konzentrieren, die Oberflächenchemie zu optimieren, verschiedene Microcystine zu testen, Kalibrierkurven zu erstellen, Nachweisgrenzen zu bestimmen und die Detektion mit anderen Antikörpern und Enzymen durchzuführen. Eine weitere Anwendung wäre der Einsatz des Immunosensors als on-line-Detektor für die in Kapitel 6 beschriebene HPLC-ELISA-Kopplung. Das HPLC-Eluat müßte in diesem Fall nicht fraktioniert werden, sondern als dünne Flüssigkeitsspur auf die thiosilanisierten Objektträger aufgetragen werden.

8 Massenspektrometrische Detektion der Microcystine

In diesem Kapitel wird die Entwicklung einer massenspektrometrischen Methode zur Analyse von Microcystinen beschrieben. Diese Methode und die HPLC-MS-Kopplung können als Referenzmethoden der immunologischen Bestimmung der Microcystine dienen. Zusätzlich können sie zu der Identifizierung von Microcystinen beitragen, die zwar strukturell aufgeklärt wurden, jedoch nicht als Standards verfügbar sind.

8.1 Auswahl eines geeigneten Massenspektrometers

Kriterien für die Auswahl eines für die Microcystin-Analytik geeigneten Massenspektrometers, waren eine niedrige Nachweisgrenze, die Möglichkeit zur Quantifizierung, das Messen in schwierigen Matrices sowie die Möglichkeit, Moleküle zu fragmentieren. Getestet wurden ESI-TOF-Geräte, die als eigenständige Geräte oder als Detektoren der HPLC-Trennung eingesetzt werden können, ein LC-MSD (Quadrupol-Massenanalysator) und ein MALDI-Gerät. Eines der ESI-TOF-Geräte erwies sich am vorteilhaftesten für die Microcystin-Analytik. Gegenüber den Quadrupol-Massenanalysatoren haben diese Geräte den Vorteil, daß ein großer Massenbereich mit einer hohen Empfindlichkeit gemessen werden kann. Dies ist im Falle microcystinbelasteter Proben besonders wichtig, da eine Vielzahl von Microcystinen unterschiedlicher Massen in der Probe auftreten können. Da die Microcystinmassen zunächst nicht bekannt sind, müßte bei Quadrupol-Analysatoren im Scanmodus gearbeitet werden, der je nach gewähltem Massenbereich wesentlich unempfindlicher ist als der Einzelionenmodus (SIM). Einzelne Microcystine könnten dadurch unerkant bleiben. Gegenüber den MALDI-TOF-Geräten haben die ESI-TOF-Geräte den Vorteil der besseren Quantifizierbarkeit der Analyten und der Möglichkeit zur Kopplung an die Chromatographie. MALDI-TOF hätte hingegen die Vorteile der Schnelligkeit der Analyse vieler Proben und daß auch in hochkomplexen Matrices gemessen werden kann, die eine Trennsäule überfordern würden. Die mit dem MALDI-TOF erhaltenen Massenspektren der Microcystine stellen jedoch häufig Natriumaddukte dar, die eine Identifizierung zusätzlich erschweren würden.

8.2 Aufbau und Funktionsweise des Massenspektrometers

Das Prinzip der Elektrospray-Ionisation und des Flugzeit-Massenanalysators wurde bereits in den Abschnitten II.4.2 und II.4.3 beschrieben. An dieser Stelle erfolgt deshalb nur eine kurze Beschreibung der Apparatur. Mit der Elektrospray-Ionenquelle können nur solche Moleküle durch Ladungsseparation in Ionen überführt werden, die schon in Lösung geladen vorliegen, beispielsweise Carbonsäuren oder Amine. Da alle Microcystine Aminosäuren mit geladenen Seitenketten enthalten, eignet sich diese Ionisierungstechnik am besten für diese Stoffklasse. Die Ionenquelle dient hauptsächlich dazu, das Lösungsmittel zu entfernen und die Ionen unter schonenden Bedingungen in die Gasphase zu überführen. Dies wird mit Hilfe von erhöhten Temperaturen, einer am Ende der Einlaßkapillare angelegten Hochspannung und eines Stickstoff-Desolvatisierungsstromes erreicht. Die Elektrospray-Ionenquelle ist in Abb. 73 schematisch dargestellt, während der Massenanalysator bereits in Abb. 16 beschrieben wurde.

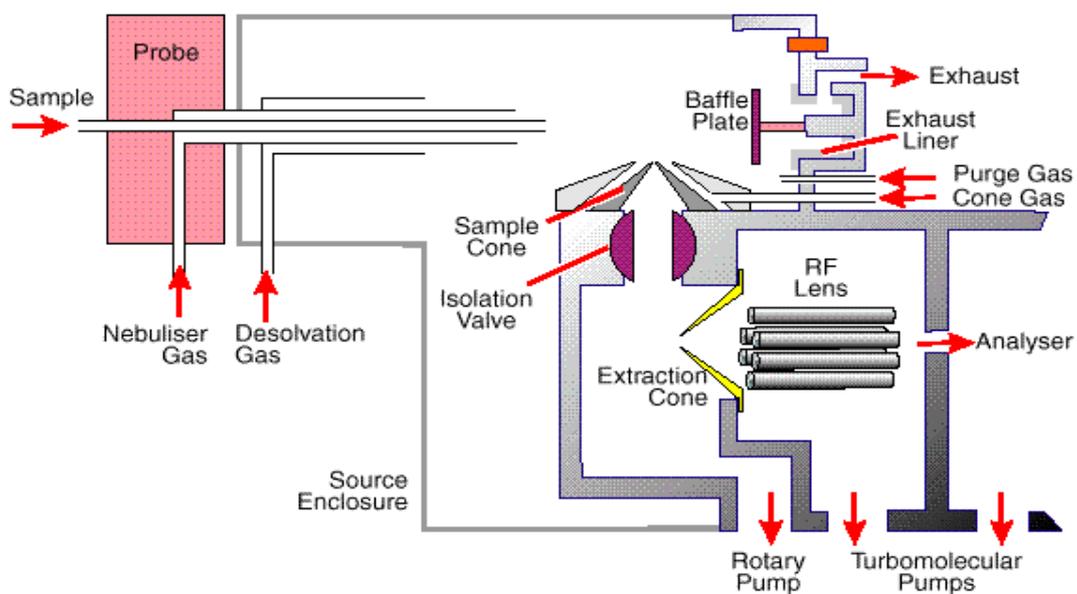


Abb. 73: Schematische Darstellung der Elektrospray-Ionenquelle.

Die Probe gelangt in flüssiger Form durch eine Kapillare in die Ionenquelle. Um den Massenanalysator möglichst wenig mit Verunreinigungen zu belasten, ist die geometrische Anordnung der Quelle Z-förmig und nicht koaxial. Nichtflüchtige Verunreinigungen, wie z. B. Puffersalze werden auf der Prallplatte (Baffle Plate) abgeschieden, flüchtige Substanzen werden abgepumpt. Wird die Quelle gereinigt, so kann die Einlaßöffnung zum Massenanalysator (Isolation Valve) verschlossen werden. (Quelle: Micromass Limited, Manchester, UK).

Der Probeneinlaß kann wahlweise an ein HPLC-Gerät oder an die Kapillare einer Spritzenpumpe angeschlossen werden. Die Spritzenpumpe kann geringe Flußraten von 5-100 $\mu\text{L}/\text{min}$ sehr konstant fördern. Sie dient zum Fördern von Kalibrierlösungen, von Proben, die ohne HPLC-Trennung vermessen werden können, oder zum Fördern interner Standards, die dem Eluat der HPLC kontinuierlich zugemischt werden.

Die verwendete HPLC-Anlage der Firma Waters dient zur Auftrennung und Aufreinigung der Proben. Sie ist mit einem Autosampler, einem Säulenofen und einem Photodiodenarray-Detektor ausgestattet und kann mit derselben Software gesteuert werden wie das Massenspektrometer. Abb. 74 zeigt ein Foto der Elektrospray-Ionenquelle, auf dem die Einlaßkapillare und der konische Einlaß in den Massenanalysator zu sehen ist.

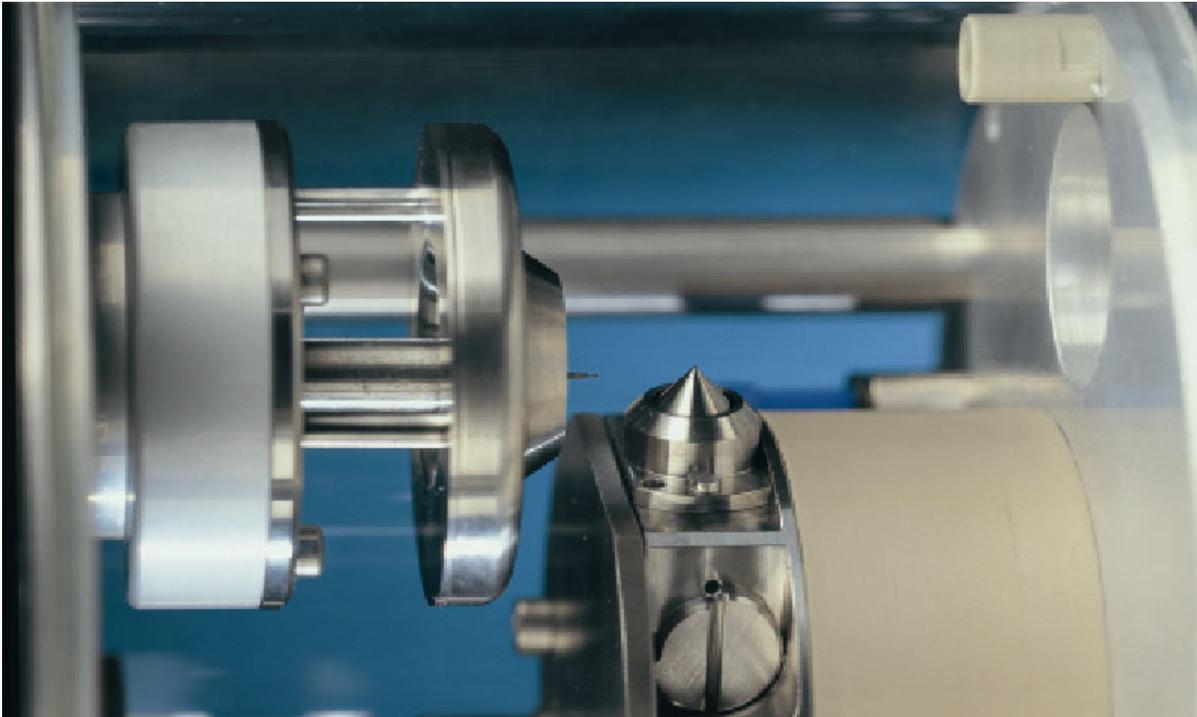


Abb. 74: Foto der Elektrospray-Ionenquelle.

Links befindet sich die Einlaßkapillare, in der Mitte der konische Einlaß in den Massenanalysator. (Quelle: Micromass Limited, Manchester, UK).

8.3 Optimierung der Bedingungen

Die Optimierung der Meßbedingungen hatte zum Ziel, möglichst hohe Empfindlichkeiten zu erreichen, möglichst einheitliche Ionenspezies aller Microcystine zu erhalten, einen internen Standard zu etablieren und geeignete Additive zur Messung im positiven bzw. im negativen Ionenmodus zu finden. Weiterhin sollte die Quantifizierbarkeit überprüft und geeignete Kalibrieremischungen gefunden werden. Die Bedingungen sollten so gewählt werden, daß sie mit den HPLC-Bedingungen kompatibel sind.

Für die Optimierung der Bedingungen eignet sich die kontinuierliche Injektion der Probe mittels Spritzenpumpe am besten. In diese Pumpe kann eine Hamilton-Spritze eingespannt werden und über eine Silica-Kapillare (75 µm I. D. × 375 µm O. D.) können sodann sehr kleine Flüsse kontinuierlich in das Massenspektrometer injiziert werden. Während der Injektion einer Standardlösung definierter Konzentration können die Parameter variiert werden und die Änderungen der Signalintensitäten am Bildschirm verfolgt werden. Beispielhaft ist in Abb. 75 die Optimierung der Hochfrequenzamplitude der Ionentransferoptik dargestellt. Das untere Diagramm zeigt die manuell eingestellten Werte dieses Parameters, während das obere die entsprechenden Änderungen der Signalintensität des Totalionenstroms (TIC) darstellt. Das Optimum des in diesem Beispiel variierten Parameters ist von der Molekularmasse abhängig. Ist die Masse des zu messenden Moleküls relativ klein (bis zu 1000 Da), so sollte auch der "RF"-Wert relativ klein gewählt werden (ca. 200 bis 400 V). Die Optimierung der MS-Parameter erfolgte aufgrund der besseren Verfügbarkeit und geringeren Toxizität mit einem Standardpeptid (H-Pro-Thr-Glu-Phe-Phe(NO₂)-Arg-Leu-OH; M_r = 954.469), welches ähnliche Ladungsverhältnisse und eine ähnliche Molmasse wie die Microcystine aufweist.

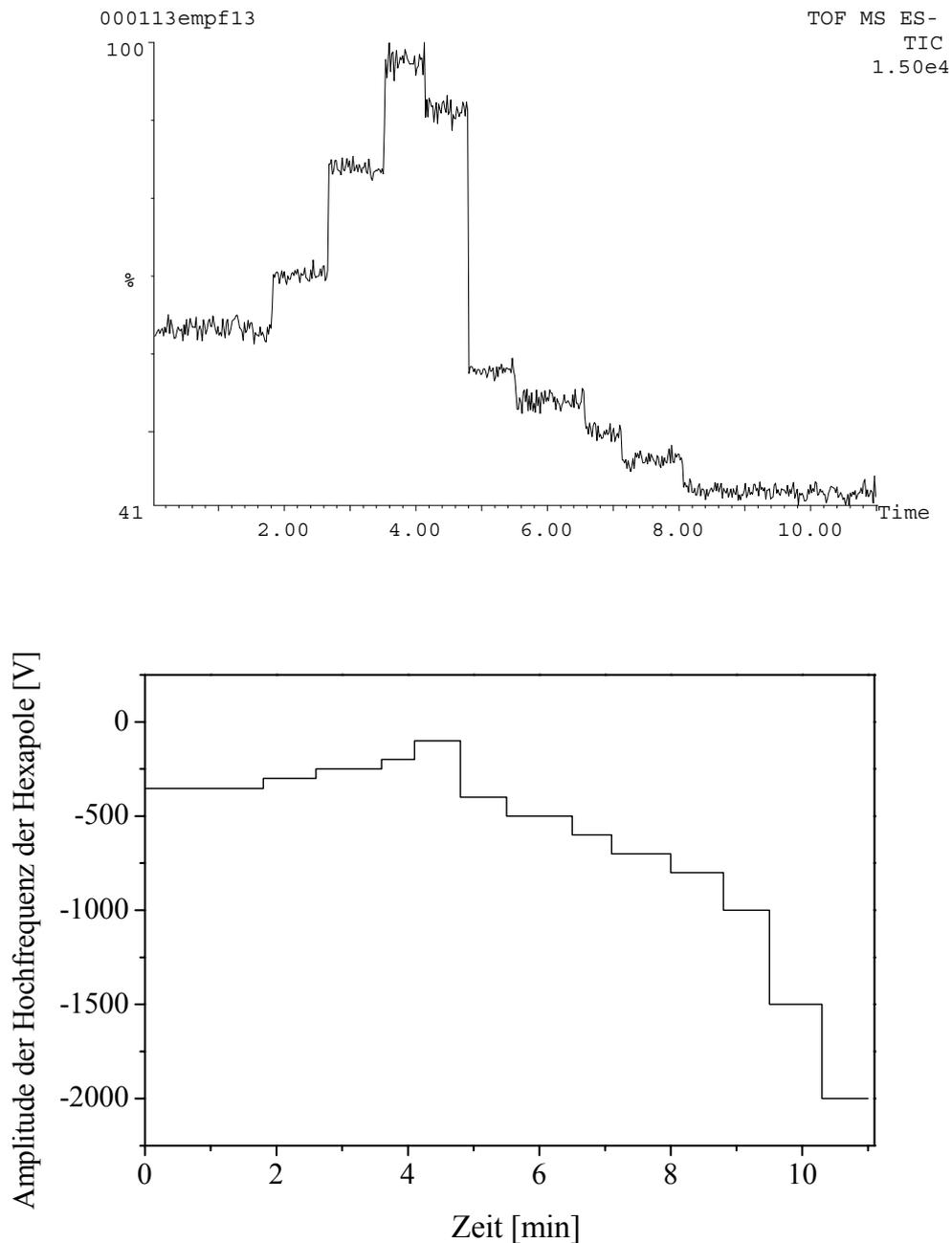


Abb. 75: Optimierung der MS-Parameter.

Mit Hilfe einer Spritzenpumpe wird ein Standard (H-Pro-Thr-Glu-Phe-Phe(NO₂)-Arg-Leu-OH, 1mg/L in Wasser/Acetonitril 1:1 + 0.2 % Ameisensäure, Fluß 18 µL/min) kontinuierlich dem Massenspektrometer zugeführt. Während ein Parameter manuell in kurzen Zeitintervallen variiert wird (unteres Diagramm), läßt sich die Änderung der Signalintensität am Bildschirm (oberes Diagramm) verfolgen.

Eine Variation der Flußrate zeigte, daß ab einem Fluß von ca. 20 µL/min eine Sättigung der Signalintensität erreicht wird (s. Abb. 76). Höhere Flüsse haben den Nachteil, daß der Desolvatisierungsgasstrom drastisch erhöht werden muß, um zu verhindern, daß sich nicht verdampfte Flüssigkeit in der Quelle ansammelt.

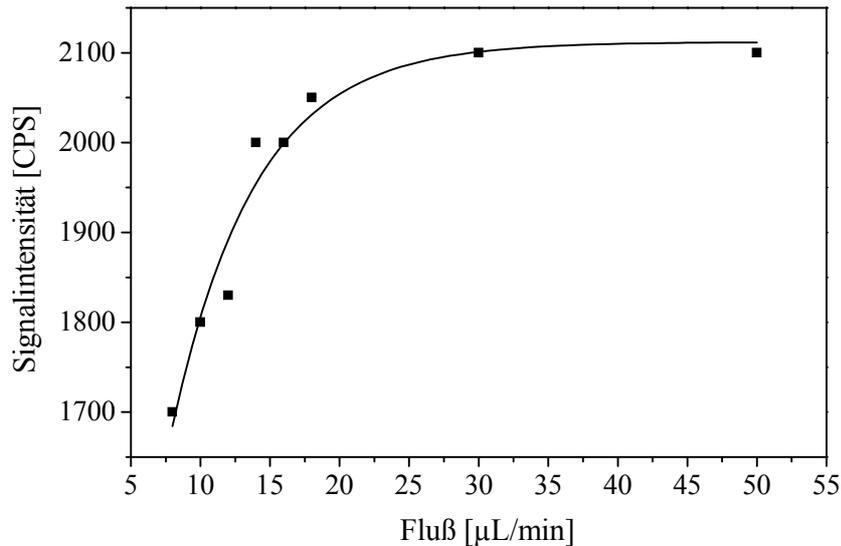


Abb. 76: Änderung der Signalintensität mit dem Fluß in der Elektrospray-Massenspektrometrie.

Eingespritzt wurde das Standardpeptid (H-Pro-Thr-Glu-Phe-Phe(NO₂)-Arg-Leu-OH, 1 mg/L) in Wasser/Acetonitril 1:1 + 0.2 % Ameisensäure. Desolvatisierungsgasstrom: 300 L/h N₂; Desolvatisierungstemperatur: 250 °C.

Die Einstellung des optimalen Flusses ist wichtig, wenn das Probenvolumen limitiert ist oder wenn die Probe über HPLC zugeführt wird. Zudem hängt der Konzentrationsbereich, innerhalb dessen quantifiziert werden kann, von dem verwendeten Fluß ab, wie in Abschnitt II.4.4.2 erklärt wurde. Da bei der analytischen HPLC normalerweise höhere Flüsse (0.3-1 mL/min) verwendet werden, ist es sinnvoll, einen Flußteiler zwischen den Säulenausgang und das Massenspektrometer einzubauen. Ebenfalls wichtig für eine spätere Kopplung an die HPLC ist die Wahl der richtigen Additive. Der Zusatz einer Säure bewirkt je nach pK_s und Analyt eine Erhöhung der Signalintensität im positiven Ionenmodus bzw. eine Erniedrigung im negativen Ionenmodus. Umgekehrte Verhältnisse liegen bei Zusatz von Basen vor. Da in der Chromatographie aufgrund der Stabilität der stationären Silicaphasen im Basischen nicht gearbeitet werden kann, ist für die HPLC-MS-Kopplung vor allem der Einsatz von Säuren interessant. Leider zeigen jedoch manche der bei der HPLC bevorzugt eingesetzten Säuren eine starke Ionensuppression. Beispielsweise bewirkt der Einsatz von 0.01%iger Trifluoressigsäure (TFA) eine fast vollständige Unterdrückung der Signale einer Microcystin-Standardmischung von 1 mg/L pro Microcystin, wie noch gezeigt wird. Aus diesem Grund wurde statt TFA mit Ameisensäure gearbeitet. Wird die Chromatographie mit Ameisensäure durchgeführt, so wird jedoch eine Peakverbreiterung festgestellt. Der Einfluß von Ameisensäure auf die Signalintensität im positiven wie im negativen Ionenmodus ist in Abb. 77 dargestellt.

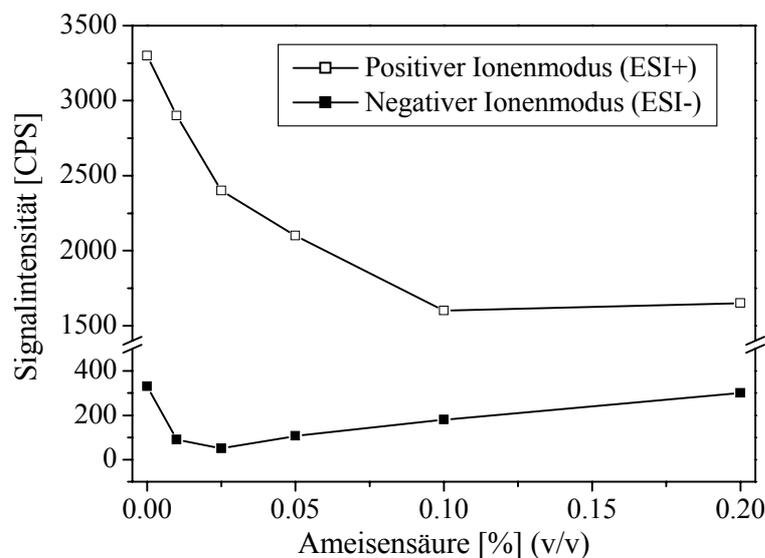


Abb. 77: Einfluß des Ameisensäuregehalts im Laufmittel auf das Signal des Standardpeptids (*H-Pro-Thr-Glu-Phe-Phe(NO₂)-Arg-Leu-OH*) im positiven und negativen Ionenmodus.

Fluß 18 $\mu\text{L}/\text{min}$, sonstige Bedingungen s. **Abb. 76**.

In beiden Detektionsmodi ist das Signal ohne Säurezusatz am höchsten. Im positiven Ionenmodus fällt es wider Erwarten bei Konzentrationen über 0.1 % über die Hälfte ab. Im negativen Ionenmodus ist das Signal insgesamt um einen Faktor 10 geringer. Allerdings werden in diesem Modus aufgrund eines besseren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses niedrigere Nachweisgrenzen erreicht, wie später gezeigt wird.

Weiterhin wurde untersucht, ob das Signal vom Anteil an organischem Lösungsmittel abhängt. Dies ist besonders dann wichtig, wenn die chromatographische Trennung mit einem Lösungsmittelgradienten durchgeführt wird. Die Signalintensität war bei organischen Anteilen (Acetonitril) zwischen 40 und 70 % am höchsten und in diesem Bereich sowohl im positiven als auch im negativen Ionenmodus stabil. Bei hohen Acetonitrilkonzentrationen (80-100 %) wurde das Signal instabil und brach im negativen Ionenmodus sogar ein. Geringe Acetonitrilkonzentrationen lieferten in beiden Ionenmodi jedoch geringe Signale. Dies mag daran liegen, daß die Flüssigkeitströpfchen langsamer verdunsten und damit weniger Ionen in die Gasphase freigesetzt werden.

8.4 Detektion von Microcystinen mittels ESI-TOF

Mit den optimierten Bedingungen wurde eine Microcystin-Standardmischung, bestehend aus Microcystin -YR, -RR, -LR, -LA, -LF, -LW und Nodularin, über die Spritzenpumpe mit einem Fluß von 18 $\mu\text{L}/\text{min}$ und einer Konzentration von 0.5 mg/L je Standard eingespritzt. **Abb. 78** zeigt das Massenspektrum der Standardmischung im positiven Ionenmodus, wenn die Signale über eine halbe Minute aufaddiert werden.

MicrocystinMix 0.5 mg/L in H₂O:ACN 1:1 + 0.2% Ameisensäure. TDC Start 800 mV
000217microcystinmix7 32 (0.588) Cm (5:34)

TOF MS ES+
5.50e3

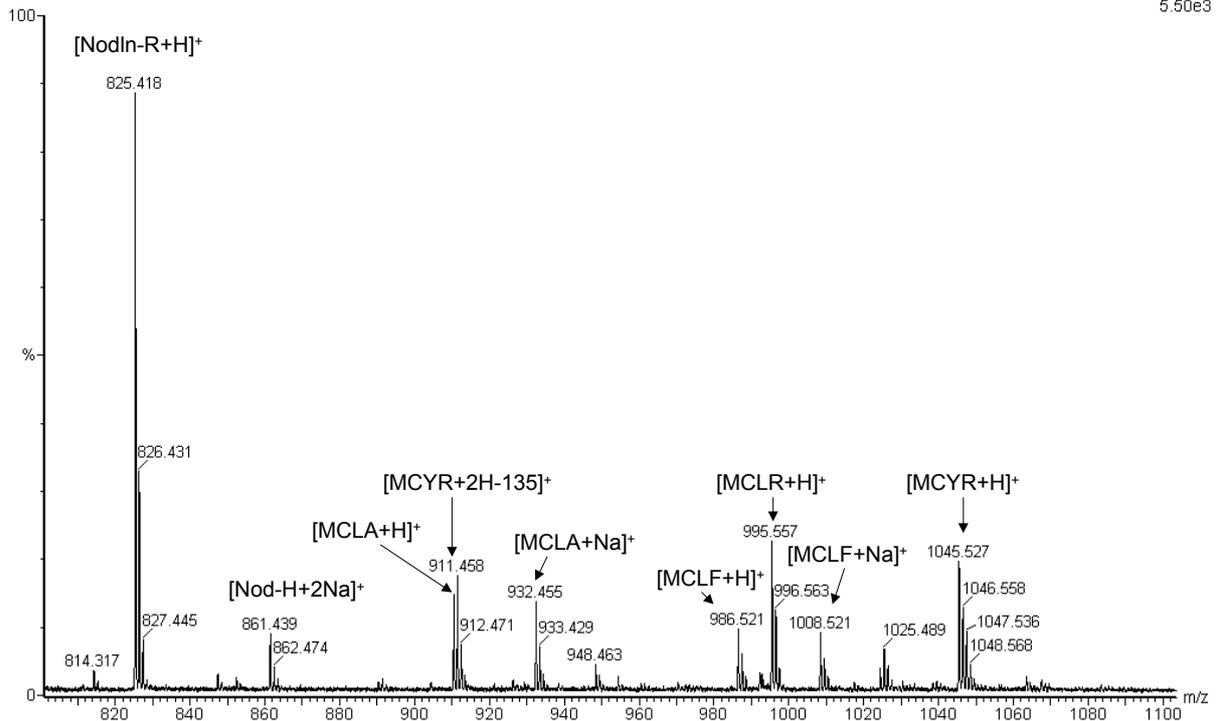


Abb. 78: Positiv-Ionen-ESI-Massenspektrum einer Microcystin-Standardmischung, bestehend aus Microcystin-YR (MCYR, $[M+H]^+ = 1045.53$); -LR (MCLR, $[M+H]^+ = 995.55$); -LA (MCLA, $[M+H]^+ = 910.49$); -LF (MCLF, $[M+H]^+ = 986.52$); -LW (MCLW, $[M+H]^+ = 1024.52$), Nodularin (Nodln-R, $[M+H]^+ = 825.45$), wobei M die monoisotopische Masse darstellt. Microcystin-RR erscheint als doppelt geladenes Ion bei m/z 519.7 und ist hier nicht dargestellt.

Die Toxine wurden in einer Konzentration von 0.5 mg/L in Wasser/Acetonitril 1:1 (+ 0.2 % Ameisensäure) mit einem Fluß von 18 μ L/min eingespritzt. Das Signal wurde über eine halbe Minute integriert (9 μ L Lösung bzw. 4.5 ng (ca. 4.5 pmol) pro Toxin).

Außer Microcystin-RR treten alle Microcystine als einfach geladene Ionen auf. Daß Microcystin-RR als doppelt geladenes Ion auftritt und damit bei der halben Molekülmasse detektiert wird, kann mit dem Vorhandensein von zwei Argininen und damit zwei basischen Guanidiniumgruppen erklärt werden. Auffällig an Abb. 78 ist das Auftreten von Natrium-Adduktionen und das Vorhandensein von Fragmentionen. Die Bildung von Adduktionen in der Massenspektrometrie von Peptiden ist zwar bekannt, in der Fachliteratur jedoch wenig beschrieben. Es wird lediglich in zwei Veröffentlichungen erwähnt [169, 170], daß bei Microcystinen, die kein Arginin enthalten (z. B. Microcystin-LA) das Natrium-Adduktion $[M+Na]^+$ als Hauptpeak auftritt. Adduktionenbildung erschwert sowohl die Quantifizierung als auch die eindeutige Identifizierung von Substanzen. Gerade cyclische Peptide scheinen in besonderer Weise dazu zu neigen, Alkalimetallionen zu binden (evtl. zu chelatisieren), da Salzaddukte auch im negativen Ionenmodus auftreten. Bisherige Bemühungen, die Adduktionenbildung durch Zusatz von Additiven, wie Kronenethern, Basen oder chelatisierenden Säuren, zu verhindern, waren wenig erfolgreich. Natrium-Adduktionen lassen sich am besten

vermeiden, wenn auf Zusatz von Säuren verzichtet wird, wie Abb. 79 zeigt. Oxalsäure ist zwar in der Lage die Adduktionenbildung, die bei Zusatz von Ameisensäure am stärksten auftritt, zu vermindern. Allerdings scheint Oxalsäure ebenfalls überschüssige Natriumionen zu enthalten, da auch hier das Mononatrium-Adduktion zu beobachten ist. Die Adduktionen entstehen nicht durch Anlagerung eines Natrium-Atoms sondern durch Austausch eines Protons. Dadurch bleibt der Ladungszustand des Moleküliions erhalten.

Da Alkalimetallionen bei der chromatographischen Trennung durch den Zusatz von Säuren kontinuierlich in das Laufmittel gelangen, läßt sich auch hierdurch die Bildung der Salzaddukte nicht unterdrücken, falls nicht speziell gereinigte Säuren und Laufmittel zur Verfügung stehen. Der Einsatz von Kronenethern zur Komplexbildung (1.2 % (v/v) 15-Krone-5) bewirkte eine Signalunterdrückung, während Adduktionen im negativen Ionenmodus weiterhin zu beobachten waren.

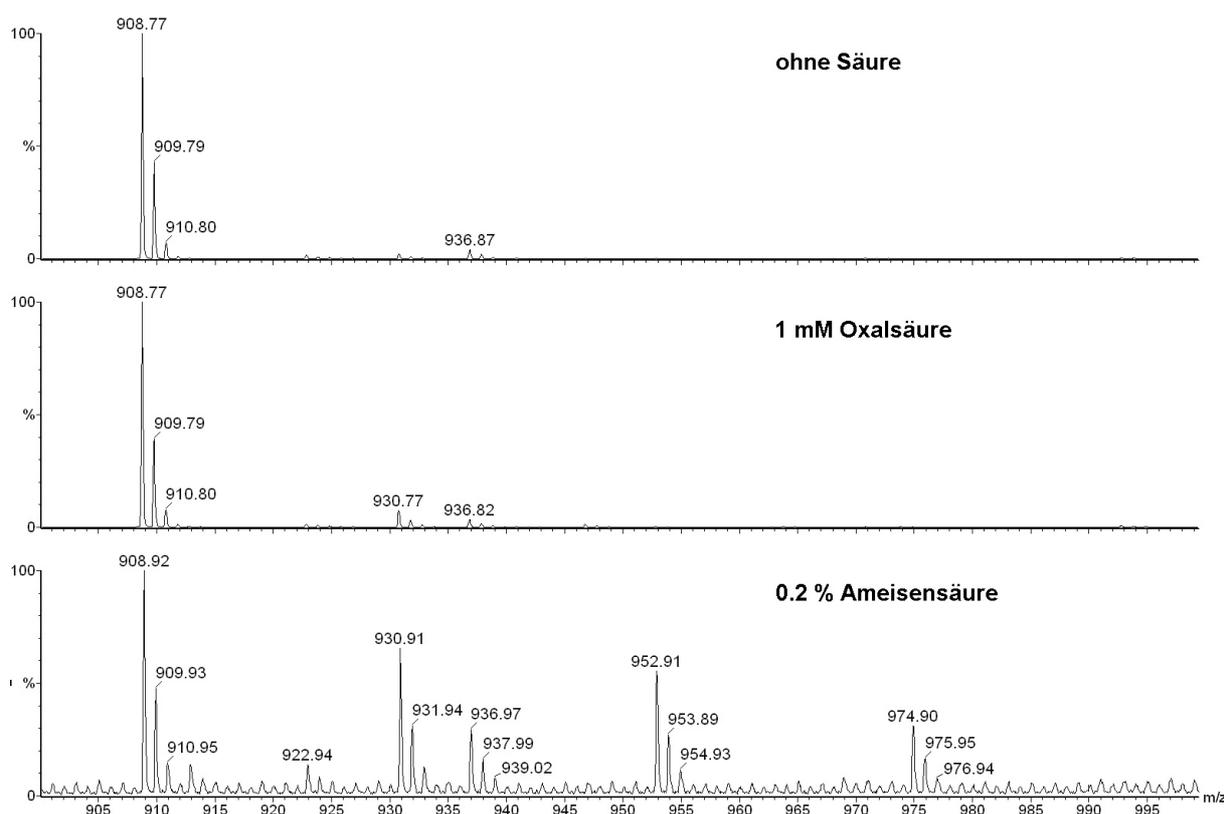


Abb. 79: *Negativ-Ionen-Elektrosprayspektrum von Microcystin-LA ($[M-H]^- = 908.92$) bei Zusätzen von verschiedenen Additiven. ($[M-2H+Na]^- = 930.91$; $[M-3H+2Na]^- = 952.91$; $[M-4H+3Na]^- = 974.90$).*

Die relativen Signalintensitäten des Peaks 908.92 sind: ohne Säure: 100 %; mit 1 mM Oxalsäure: 32 %; mit 0.2 % Ameisensäure: 5 %.

Die Messung der Microcystin-Standardmischung (250 µg/L je Toxin) im negativen Ionenmodus ist in Abb. 80 gezeigt. Hier wurde dem Lösungsmittel keine Säure zugesetzt, um die vorhandenen sauren Gruppen der Moleküle nicht zu protonieren. Auch in diesem Fall treten Natriumaddukte der Moleküle auf. Die Natriumionen stammen folglich aus der Probe.

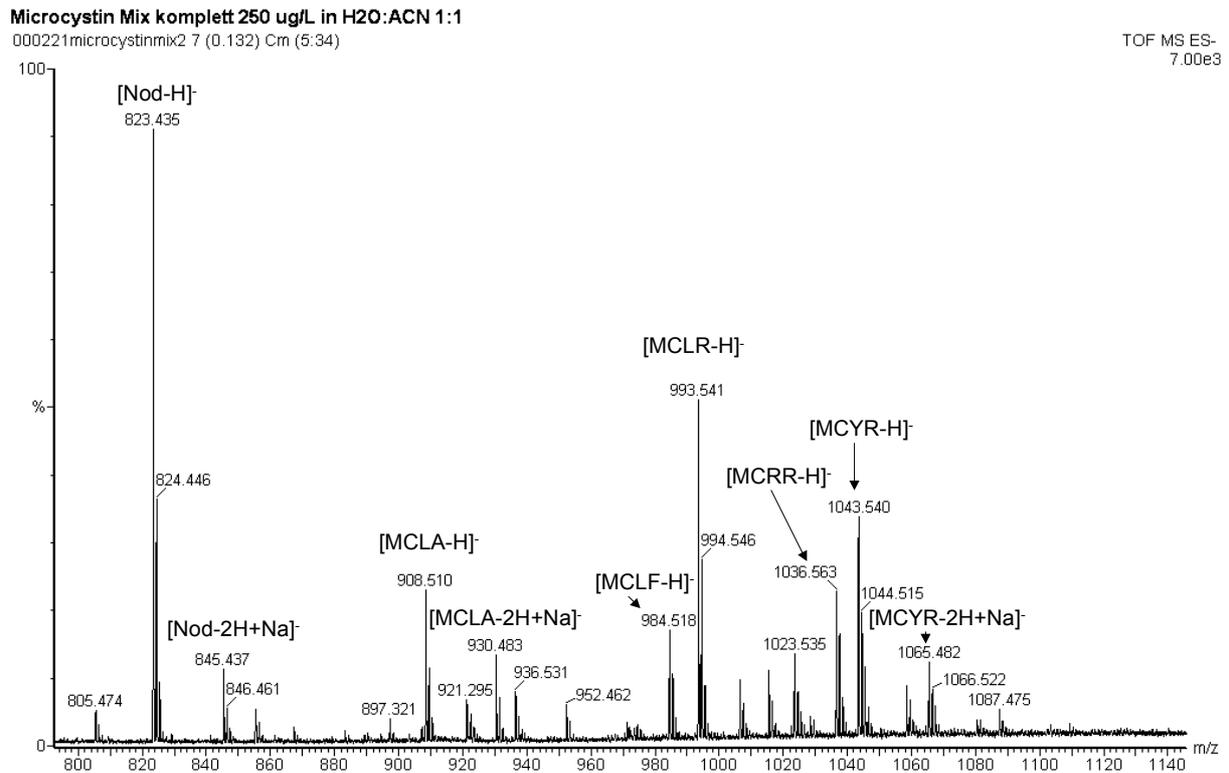


Abb. 80: *Negativ-Ionen-ESI-Massenspektrum einer Microcystin-Standardmischung, bestehend aus Microcystin-YR (MCYR, $[M-H]^- = 1043.52$); -RR (MCRR, $[M-H]^- = 1036.56$); -LR (MCLR, $[M-H]^- = 993.54$); -LA (MCLA, $[M-H]^- = 908.48$); -LF (MCLF, $[M-H]^- = 984.51$); -LW (MCLW, $[M-H]^- = 1022.51$), Nodularin (Nod, $[M-H]^- = 823.43$), wobei M die monoisotopische Masse ist.*

Die Toxine wurden in einer Konzentration von 250 µg/L in Wasser/Acetonitril 1:1 mit einem Fluß von 18 µL/min eingespritzt. Das Signal wurde über eine halbe Minute integriert (9 µL Lösung bzw. 2.25 ng (ca. 2.25 pmol) pro Toxin).

Obwohl alle Toxine zwei Carboxylgruppen besitzen, treten sie im negativen Ionenmodus als einfach geladene Ionen auf. Die Ladung der Ionen ist abhängig von der Konzentration der im Ionisierungsprozeß erzeugten Überschußladungen, von der Molekülgröße und der Säurekonstante. Die Größe der Microcystine liegt in einem Grenzbereich, in dem eine oder zwei Ladungen pro Molekül aufgenommen werden können. Deshalb sind vermutlich die Säurekonstanten verantwortlich für das Auftreten der Microcystine als einfach geladene Ionen. Da im negativen Ionenmodus ohne Säurezusatz gearbeitet werden kann, konnte hier eine geringere Nachweisgrenze erhalten werden. Abb. 81 zeigt das Massenspektrum einer Mischung aus drei Microcystinen (-LA, -RR, -YR), die mit jeweils 10 µg/L und einem Fluß von 18 µL/min kontinuierlich in das Massenspektrometer injiziert wurden. Bei der hier ermittelten Nachweisgrenze wurde als Rauschen das Signal, welches im Beobachtungszeit-

raum von m/z -Werten geliefert wurde, die nicht zu einer der zu messenden Substanzen gehören, angenommen. Dies ist ein prinzipieller Unterschied zu Nachweisgrenzen, die bei einer chromatographischen Trennung bestimmt werden, da in letzterem Fall das Signal der Analytmasse zu einem anderen Zeitpunkt als Rauschen definiert wird.

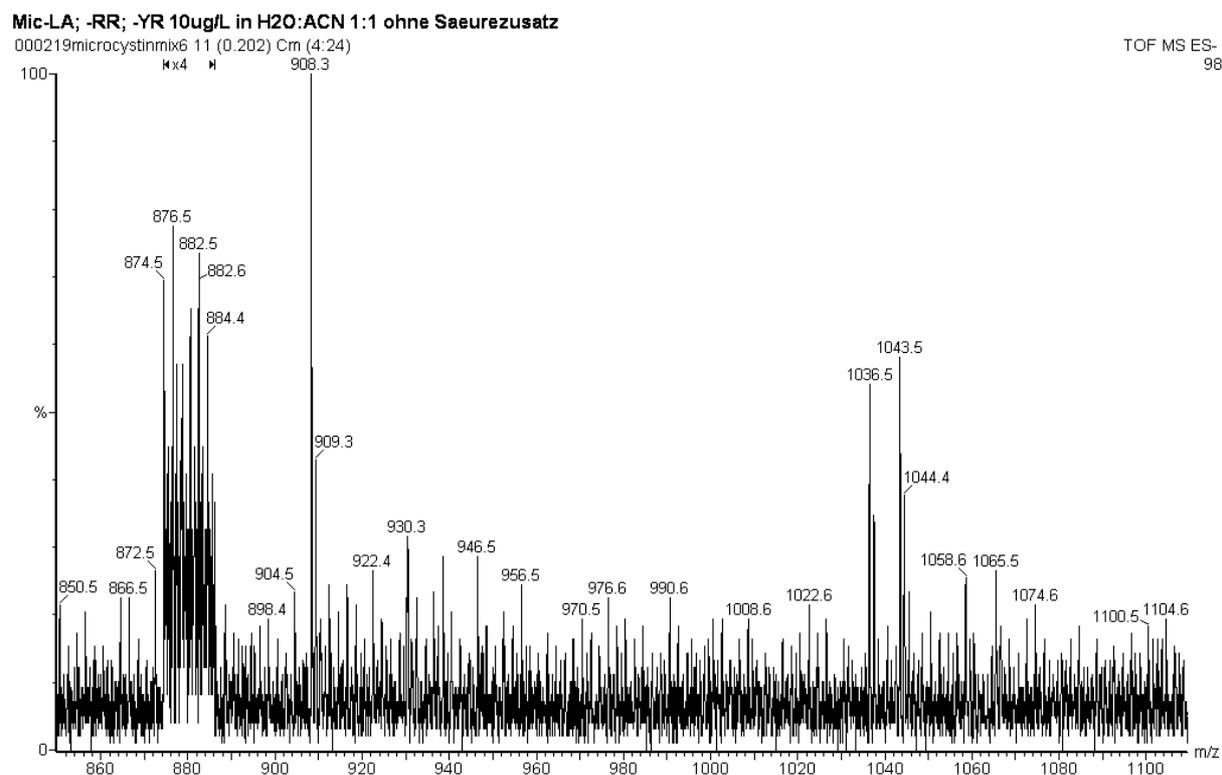


Abb. 81: Bestimmung der Nachweisgrenze von Microcystinen. Bei dieser Messung wurde Microcystin-LA ($[M-H]^- = 908.3$); -RR ($[M-H]^- = 1036.7$); -YR ($[M-H]^- = 1043.7$) in einer Konzentration von $10 \mu\text{g/L}$ mit einem Fluß von $18 \mu\text{L/min}$ kontinuierlich in das Massenspektrometer gespritzt.

Das Signal wurde über 20 Sekunden integriert, was $6 \mu\text{L}$ Standardlösung bzw. 60 pg (oder ca. 60 fmol) Toxin entspricht. Im m/z -Bereich zwischen 870 und 890 wurde das Rauschen um den Faktor 4 vergrößert, um das Signal/Rausch-Verhältnis zu veranschaulichen.

Bei der in Abb. 81 dargestellten Messung wurde das Signal über 20 Sekunden akkumuliert, was einem Volumen von $6 \mu\text{L}$ der Microcystinlösung entspricht. Die hier erhaltene Nachweisgrenze von 60 pg Microcystin absolut liegt um Faktor 10 niedriger als diejenige der HPLC-UV-Methode und nur um Faktor 1.5 höher als die Nachweisgrenze der HPLC-ELISA Detektion. Steht genügend Substanz zur Verfügung, so kann das Signal über einen längeren Zeitraum integriert werden, wobei sich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis und damit die Nachweisgrenze proportional zu der Wurzel der Zahl der akkumulierten Meßpunkte verbessert. Da sich die meisten Microcystine im Massenspektrometer ähnlich verhalten, sollten sie auch ähnliche Nachweisgrenzen haben. Im positiven Ionenmodus wurde unter denselben Bedingungen wie oben für den negativen Modus beschrieben, eine um den Faktor 6 höhere Nachweisgrenze erhalten. Ein Vergleich mit Nachweisgrenzen, die mittels Frit-FAB-LC/MS

[164] für Microcystin-RR (300 pg), -YR (350 pg) und -LR (400 pg) bzw. mittels LC/ESIMS [167] für Microcystin-LR (50 pg) im SIM-Modus (SIM = selected ion monitoring) bestimmt wurden, zeigt, daß das LCT-Gerät bei gleichzeitiger Messung eines breiten m/z -Bereichs keine Empfindlichkeit einbüßt. Die gleichzeitige Messung eines breiten Massenbereichs ist von Vorteil, da gegebenenfalls auf eine chromatographische Trennung verzichtet werden kann. Diese ist zeitaufwendig und die Detektion muß aufgrund des Säurezusatzes im weniger empfindlichen positiven Ionenmodus erfolgen. Allerdings wirkt sich bei dem direkten Nachweis der Microcystine mit dem ESI-TOF die starke Matrixanfälligkeit der Methode nachteilig aus. Eine Aufreinigung der Probe durch Immunaффinitätschromatographie oder Umkehrphasen-Chromatographie scheint deshalb in jedem Fall sinnvoll.

Eine Quantifizierung des Microcystinsignals im Massenspektrometer konnte aufgrund des Auftretens von Adduktionen und Fragmentationen nicht durchgeführt werden. Da Natrium-Adduktionen verstärkt bei Microcystinen auftreten, die keine positiv geladene Seitenkette enthalten, könnte eine Lösung des Problems darin bestehen, durch Derivatisierung weitere positive Ladungen einzuführen. SHERLOCK et al. [171] derivatisierten Microcystine mit 2-Aminoethanthiol und erhielten die doppelt geladenen Derivationen im Massenspektrum (vgl. Abb. 11). Ein anderes Derivatisierungsreagenz, welches sowohl positive als auch negative Ladungen einführt, ist Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP). Diese Substanz verhindert die Oxidation von Thiolen und wird deshalb oft Reaktionsmischungen mit Thiolen beigegeben. TCEP reagiert jedoch quantitativ mit Microcystinen, wie massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnte. Im positiven Ionenmodus wird das doppelt geladene Produkt erhalten. Die postulierte Reaktion ist in Abb. 82 dargestellt.

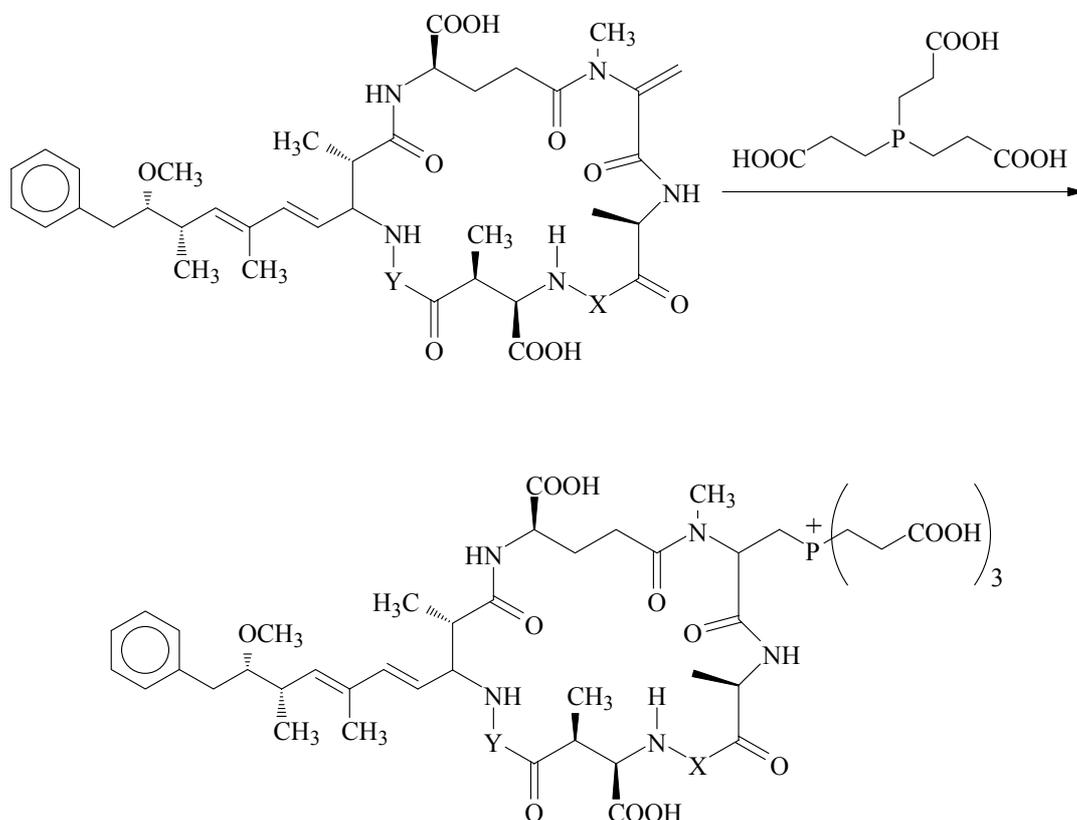


Abb. 82: Reaktion von Microcystinen mit Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP).

Da jedoch auch argininhaltige Microcystine Natrium-Adduktionen bilden, ist das Arbeiten mit sauberen Lösungsmitteln und mit einer sauberen Ionenquelle unumgänglich.

8.5 Messung von Realproben

Mit optimierten Meßbedingungen für Microcystine wurde eine microcystinhaltige Realprobe aus Australien vermessen. Diese Probe war mittels off-line-Festphasen-Extraktion gereinigt worden. Die Untersuchung dieser Probe (*Microcystis sp.*, März 1993) mittels HPLC-ELISA-Kopplung ist in Abschnitt III.6.7 beschrieben. Das Massenspektrum der Realprobe ist in Abb. 83 dargestellt. Im Gegensatz zu dem HPLC-ELISA-Immunogramm zeigt das Massenspektrum eine Vielzahl von Peaks im Massenbereich der Microcystine. Nur wenige dieser Massen können bereits bekannten und strukturell aufgeklärten Microcystinen zugeordnet werden.

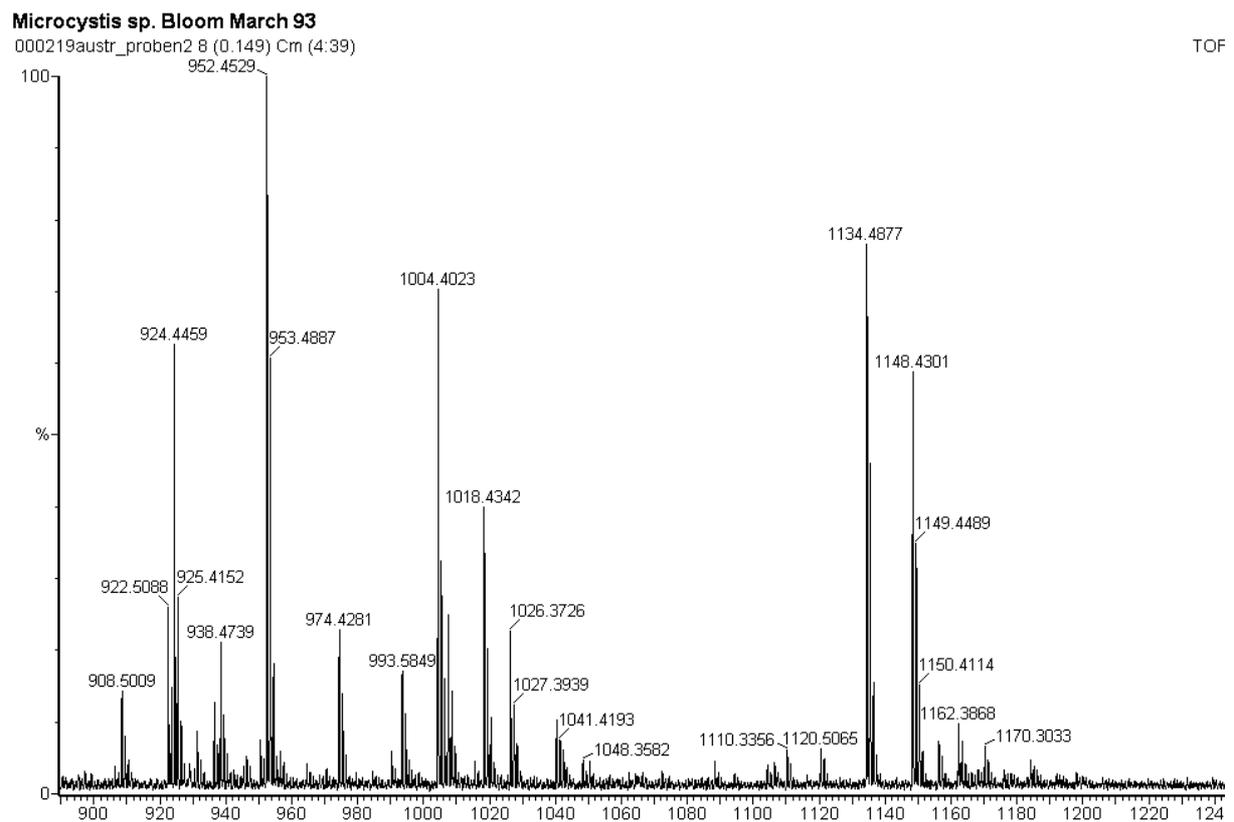


Abb. 83: Negativ-Ionen-ESI-Massenspektrum (Detektor: LCT) eines cyanobakteriellen Extrakts (*Microcystis sp.*, Blüte 1993, Australien).

Die Zuordnung der im Spektrum auftretenden Peaks zu Massen bereits bekannter Microcystine ist in Tabelle 23 aufgelistet. Die Microcystine-LR und -LA sowie der Methyl- und der Dimethylester von Microcystin-LA wurden identifiziert. Neben diesen Massen gibt es jedoch noch einige Massen, wie z. B. die intensiven Signale bei 924.4 und 1004.4, die keinen Microcystinen zugeordnet werden können. Andere Massen könnten nur sehr selten auftretenden Microcystinen zugeordnet werden.

Tabelle 23: Zuordnung der in Abb. 83 auftretenden Massen zu bereits bekannten Microcystinen.

m/z [M-H] ⁻ (Δm der theoretischen Masse [ppm])	Microcystin
908.5009 (26)	Microcystin-LA
922.5088 (17)	Microcystin-LA-Methylester oder Microcystin-LAba
924.4459	unbekannt
931.3954	unbekannt
936.5220 (15)	Microcystin-LA-Dimethylester
938.4739	unbekannt
950.5381 (15)	Microcystin-LL
952.4529 (0)	Peptid (interner Standard)
974.4281 (7)	Peptid, Natriumaddukt (interner Standard)
990.4143	unbekannt
993.5849 (44)	Microcystin-LR
1004.4023	unbekannt
1007.5962 (75)	[D-Asp ³ ,ADMAdda ⁵]Microcystin-LR
1018.4342 (-25)	Microcystin-YM
1026.3726	Natriumaddukt von 1004.4
1040.3912 (-48)	Microcystin-YM-Natriumaddukt

Da viele Peaks im Massenbereich der Microcystine nicht zugeordnet werden konnten, ist es sinnvoll, eine Methode zu entwickeln, die die Frage klärt, ob es sich bei einem Peak im Massenspektrum um ein Microcystin handelt oder nicht. Die Antwort auf diese Fragestellung ist bei Realproben vor allem deshalb relevant, weil sehr wenige Microcystinstandards zur Verfügung stehen und bisher noch nicht abzusehen ist, wie groß die Vielfalt dieser Stoffklasse ist, d. h. mit wievielen unbekanntem Microcystinen noch zu rechnen ist. Mit Hilfe der Massenspektrometrie ließe sich dieses Problem beheben, falls Microcystin-charakteristische Spaltfragmente detektiert werden können. Aus diesem Grund werden im folgenden Fragmentierungsexperimente von Microcystinen beschrieben.

8.6 Fragmentierung von Microcystinen

Mit dem ESI-TOF-Massenspektrometer können Moleküle fragmentiert werden, indem die Fragmentorspannung ("Sample Cone Voltage") erhöht wird. Abb. 84 zeigt die Massenspektren, die für Microcystin-YR bei verschiedenen Fragmentorspannungen erhalten wurden. Bei geringer Spannung (30 V, unteres Spektrum) ist nur das Produkt der α -Spaltung der Adda-Seitenkette zu beobachten ($[M+2H-135]^+$). Die zuordenbaren Fragmente sind gekennzeichnet, die Massenpeaks zwischen 200 und 400 sind Verunreinigungen der Probe. Die Spaltung der Adda-Seitenkette (Abspaltung von Methanol bzw. $\text{PhCH}_2\text{CH}(\text{OMe})$) tritt allerdings bei geringer Fragmentorspannung nicht bei allen Microcystinen auf.

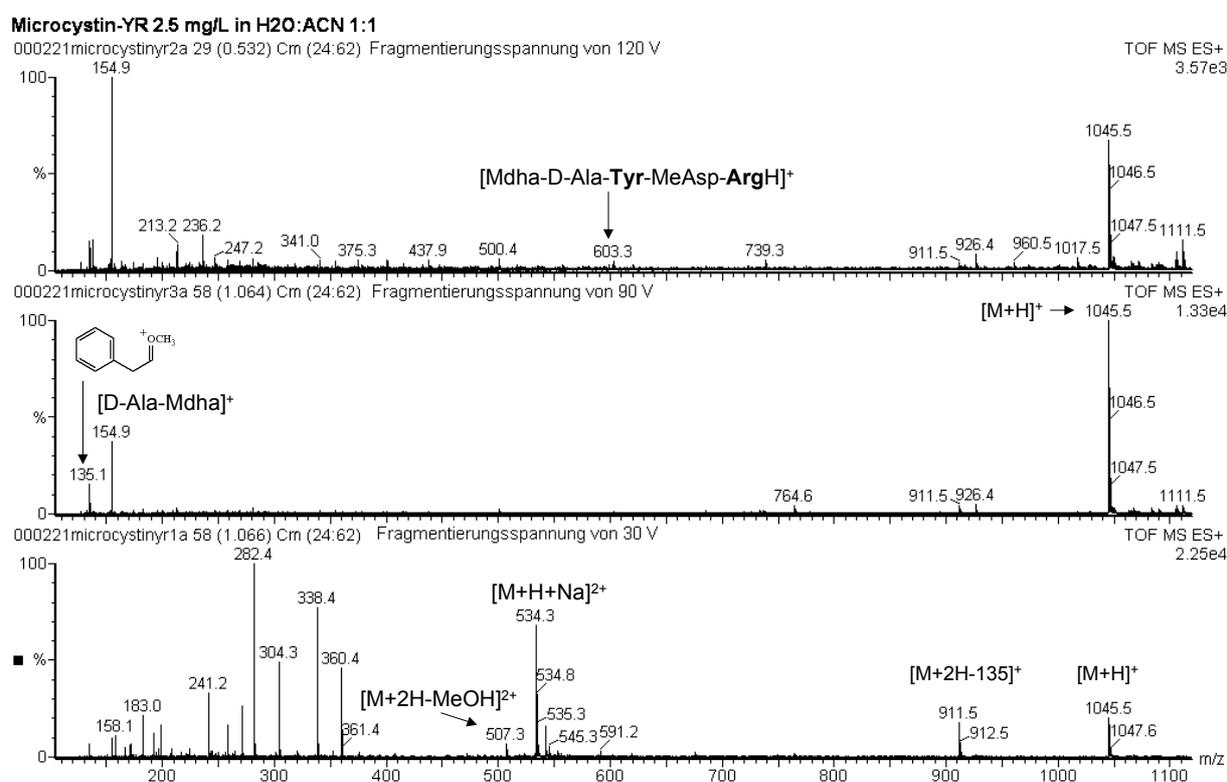


Abb. 84: Fragmentierung von Microcystin-YR (2.5 mg/L) im positiven Ionenmodus. Die Fragmentierungsspannung ist unten 30 V, in der Mitte 90 V und oben 120 V.

Bei mittleren Spannungen (90 V, mittleres Massenspektrum) treten Fragmente auf, die charakteristisch für die Microcystinstoffklasse sind. Ion 135 ($\text{PhCH}_2\text{CH}(\text{OMe})$) entsteht durch α -Spaltung der Adda-Seitenkette (vgl. Abb. 9). Ion 155 ist ein Dipeptid bestehend aus den konservierten Aminosäuren D-Ala und *N*-MethyldehydroAla. Es ist ein Produkt der Ring-spaltung. Beide Fragmente können zur Identifizierung eines Massenpeaks als Microcystin dienen. Bei hohen Fragmentorspannungen (120 V) ist die Intensität dieser Fragmente höher als diejenige des Molekülions. Bei diesen Spannungen werden auch Massen erhalten, die charakteristisch für die individuellen Microcystine sind. Beispielsweise ist bei der Masse 603 ein Spaltprodukt zu sehen, welches beide variablen Aminosäuren (Tyrosin = Y und Arginin =

R) enthält. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß eine Fragmentierung nicht nur durch Stoßaktivierung erreicht werden kann, wie in der Literatur [165, 167-169, 328] bereits beschrieben, sondern mit dem ESI-TOF-Massenspektrometer durch das Erhöhen der Fragmentorspannung.

Das Auftreten von Microcystin-Fragmentionen im Flugzeit-Massenspektrometer wurde auch für Microcystin-LR systematisch untersucht. Hierzu wurde die Fragmentorspannung stufenweise hochgesetzt. Zusätzlich wurde untersucht, welche Konzentrationen notwendig sind, um klassenspezifische oder substanzspezifische Fragmentionen zu erhalten. Tabelle 24 zeigt eine Zusammenfassung der Daten.

Tabelle 24: Fragmentierung von Microcystin-LR bei verschiedenen Fragmentorspannungen und Konzentrationen.

Fragmention X	m [Da]	Auftreten der Ionen bei Fragmentorspannung [V]						
		[X+H] ⁺	40 ^a	60 ^a	90 ^a	120 ^a	150 ^a	120 ^b
M	995.8	+	+	+	+	-	+	+
M-(PhCH ₂ CH(OMe))	861.46	+	+	+	+	-	+	-
Adda*-Glu-Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Arg	844.44	-	-	+	+	-	-	-
Glu-Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Arg	682.33	-	-	+	+	-	-	-
Adda-Arg-MeAsp	599.33	-	-	+	+	-	+	-
Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Arg-NH ₂ +H	570.32	+	+	+	+	-	-	-
MeAsp-Arg-Adda*	567.31	-	+	-	-	-	-	-
Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Arg	553.29	-	-	+	+	-	+	-
Ala-Leu-MeAsp-Arg-NH ₂ +H	487.28	+	+	-	-	-	-	-
Adda*-Glu-Mdha-Ala	446.23	-	-	+	+	-	-	-
Adda*-Glu-Mdha	375.19	-	-	+	+	-	+	-
MeAsp-Arg-NH ₂ +H	303.16	-	+	+	+	-	+	-
Glu-Mdha-Ala	285.2	-	+	+	+	-	+	-
Mdha-Ala-Leu	268.16	-	+	+	+	-	+	-
Glu-Mdha	213.09	+	+	+	+	+	+	+
Adda*-NH	163.2	-	-	+	+	+	+	-
Ala-Mdha	155.1	+	+	+	+	+	+	-
Ph-CH ₂ CH(OMe)	135.1	+	+	+	+	+	+	+
Arg	112.1	-	+	+	+	+	+	+
Leu	86.1	-	+	+	+	+	+	-

Abkürzungen: Adda*: Adda-(PhCH₂CH(OMe)); M: Molekülion; Mdha: *N*-Methyldehydroalanin; MeAsp: D-erythro- β -MethylAsparagin; langer Bindestrich (-): minus.

^a: Microcystin-LR: 10 mg/L; ^b: Microcystin-LR: 1 mg/L; ^c: Microcystin-LR: 0.1 mg/L.

Auffällig ist die Vielzahl von Fragmentionen, die die Aminosäure *N*-Methyldehydroalanin enthalten. Diese Aminosäure scheint aufgrund der α,β -ungesättigten Carbonylgruppe eine positive Ladung gut stabilisieren zu können. Neben Ion 135 gehören die Ionen 155 und 213 zu den charakteristischen Fragmentionen (vgl. Fragmentierung von Microcystin-YR, Abb. 84). Sie treten sowohl bei sehr niedrigen als auch bei sehr hohen Fragmentorspannungen auf und sind bis zu Konzentrationen von 0.1 mg/L sichtbar, wie Abb. 85 zeigt. Die optimale Fragmentorspannung liegt bei 120 V im positiven Modus. Für Spannungen unter 120 V wird keine signifikante Abnahme des Signals des Molekülions erhalten, was darauf hindeutet, daß diese Spannungen für eine Fragmentierung nicht ausreichen. Eine Mindest-Aktivierungsenergie scheint notwendig zu sein, um den Peptidring zu fragmentieren. Andererseits sind auch schon bei einer Fragmentorspannung von 40 V 135er-Ionen zu finden. Diese scheinen über einen anderen Mechanismus zu entstehen.

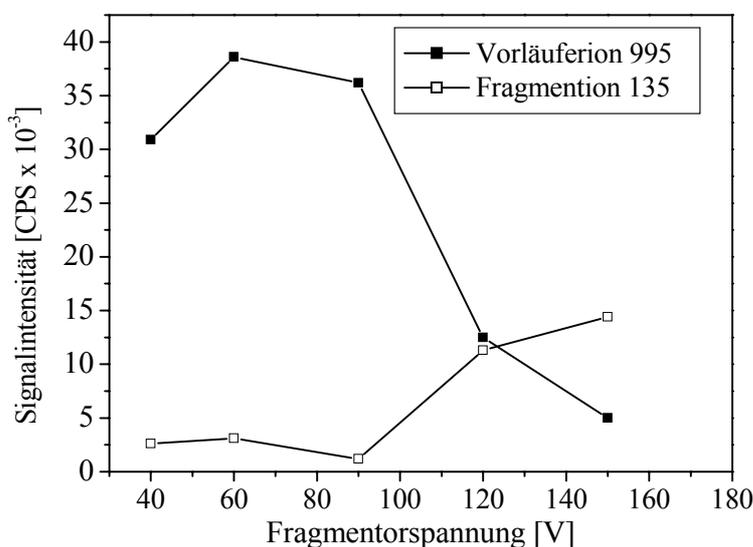


Abb. 85: Abhängigkeit der Signalintensität von der Fragmentorspannung. Microcystin-LR ($[M+H]^+$ = 995; 10 mg/L).

Bei 120 V läßt sich für Microcystin-LR bis zu einer Konzentration von 1 mg/L ein zuverlässiges Fragmentionenspektrum erzeugen. Allerdings ist die Anzahl und Intensität von Ionen, die die variablen Aminosäuren enthalten, gering. Die Hauptfragmente lassen sich bis zu Konzentrationen von 0.1 mg/L nachweisen.

Im negativen Ionenmodus ist eine Fragmentierung ebenfalls zu beobachten, wie Abb. 86 zeigt. Die Zuordnung der Massenpeaks zu Fragmenten ist bisher nicht vollständig gelungen. Spaltprodukte, die zugeordnet werden konnten, sind beschriftet. Im negativen Ionenmodus ist das Fragmention der Masse 128 typisch für Microcystine. Es handelt sich dabei wahrscheinlich entweder um Glutaminsäure oder um die isobare D-erythro- β -Methylasparaginsäure. Bei sehr hohen Fragmentorspannungen (-150 bis -160 V) nimmt die Intensität dieses Ions stark zu.

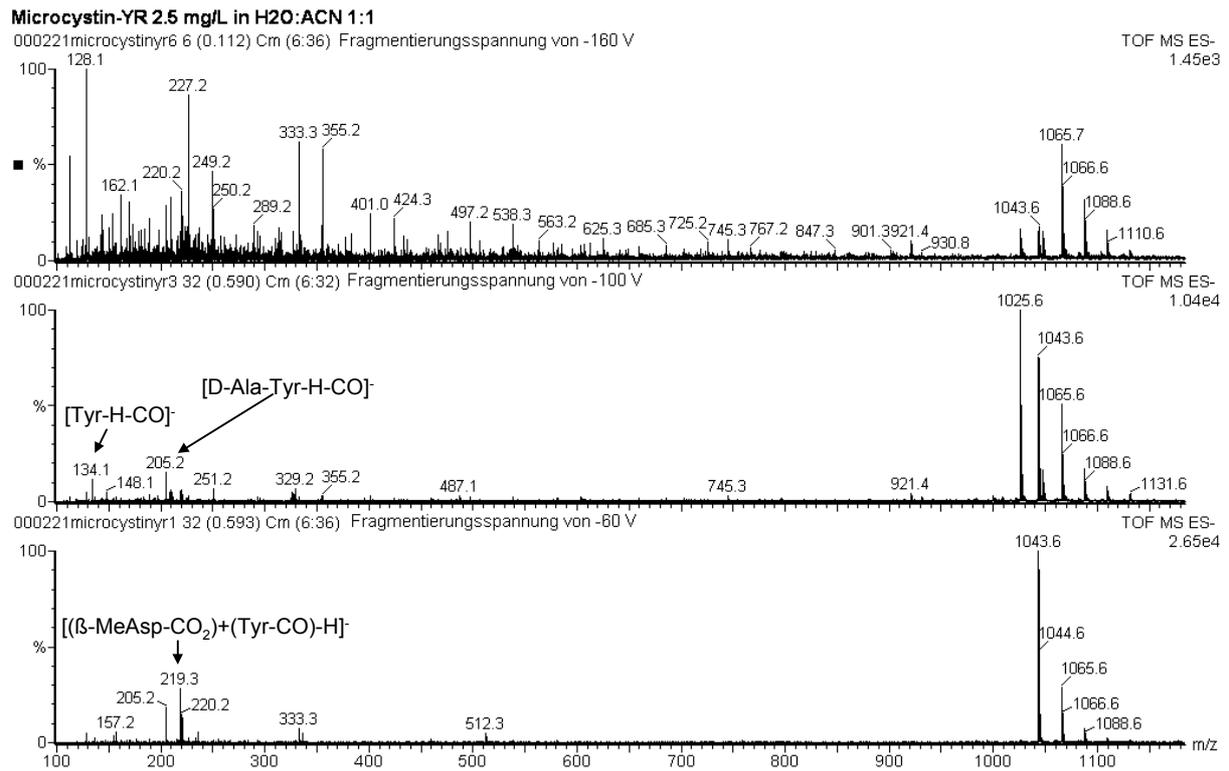


Abb. 86: Fragmentierung von Microcystin-YR (2.5 mg/L in Wasser/Acetonitril 1:1) im negativen Ionenmodus. Die Fragmentierungsspannung ist unten -60 V, in der Mitte -100 V und oben -160 V.

Ein Vergleich der Fragmentierung im positiven und negativen Ionenmodus zeigt, daß im negativen Modus eine höhere absolute Spannung notwendig ist, um Microcystine zu fragmentieren. In diesem Modus wird eine Reihe von Fragmentionen erhalten, die durch Neutralverlust von Wasser, Kohlenmonoxid oder Kohlendioxid entstehen. Beide Ionisierungsmodi zeigen vorwiegend Fragmente im niedermolekularen Bereich des Spektrums. Dies kann darauf zurückgeführt werden, daß die Aktivierungsenergie der Ringspaltung so hoch ist, daß länger-kettige lineare Peptide ebenfalls fragmentiert werden. Das Fehlen der Fragmente im Massenbereich zwischen 400 und 800 erschwert wesentlich die Strukturaufklärung der Microcystine mittels Massenspektrometrie.

8.7 Analytik von Microcystinen mittels HPLC-ESI-MS-Kopplung

Die Kopplung von HPLC und Massenspektrometrie erleichtert die Identifizierung von Microcystinen einer unbekannt Probe, da die Microcystine auf der HPLC-Säule getrennt werden und microcystinspezifische Fragmentionen besser dem jeweiligen Vorläuferion zugeordnet werden können. Zusätzlich lassen sich Matrix und Salzaddukte reduzieren.

Bei der Kopplung dieser beiden Verfahren muß allerdings ein Kompromiß zwischen den optimalen Chromatographie- und Massenspektrometrie-Bedingungen gefunden werden. Dies betrifft vor allem die Auswahl eines geeigneten Flusses und die Wahl und Konzentration der Säure, die dem Laufmittel zugesetzt wird. Wird die Chromatographie ohne massenspektrometrische Detektion angewendet, so werden optimale Bedingungen mit Wasser/Acetonitril-Gradienten mit Zusatz von 0.1 % Trifluoressigsäure (TFA) erhalten. Die Säulen haben meist einen Durchmesser von 4.5 mm, der für einen Fluß von 1 mL/min optimal ist. Um bei kleineren Flüssen arbeiten zu können, wurde die Trennmethode auf eine kleinere Säule (RP Amid-C₁₆, 5 µm, 15 cm × 2.1 mm) umgestellt. Bei der Optimierung der Trennung wurden ein geringer Fluß, geringe TFA-Gehalte im Laufmittel sowie eine Trennung innerhalb von 20 bis 30 Minuten angestrebt. Problematisch erwies sich dabei einerseits das Totvolumen der HPLC-Anlage, das bei geringen Flüssen besonders deutlich in Erscheinung tritt und andererseits die Änderung der Trennselektivität bei Änderung des TFA-Gehaltes. Der TFA-Gehalt sollte möglichst gering sein, da TFA ein potenter Ionensuppressor ist und die Signale im Massenspektrometer unterdrückt. Wie in Abschnitt III.1.3 beschrieben, hat eine Verringerung des TFA-Gehaltes im Laufmittel zwar keine starke Auswirkung auf die Trennleistung, jedoch auf die Selektivität der Trennung. Die Microcystine -LR und -YR, die bei 0.1 % TFA basisliniengetrennt auftreten, fallen bei 0.01 % TFA zusammen. Durch Erhöhung der Flußrate wird die Totzeit der Anlage deutlich verkürzt und die Microcystine -LR und -YR werden angetrennt. Statt dessen werden die hydrophoben Microcystine breiter. Abb. 87 zeigt einen optimierten Gradienten bei einer TFA-Konzentration von 0.01 % und einem Fluß von 0.4 mL/min. Die hydrophoben Microcystine (-LA, -LF, -LW) eluieren erst bei sehr hohen Acetonitril-Anteilen im Laufmittel. Diese Lösungsmittelzusammensetzung ist für die Ionisierung im Massenspektrometer nicht optimal, wie in Abschnitt 8.3 beschrieben wurde.

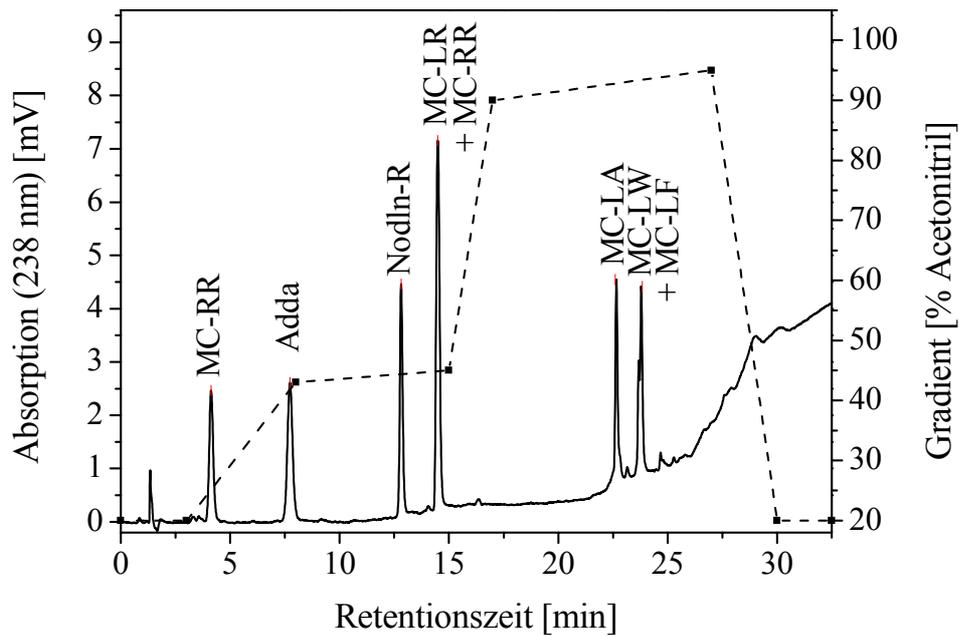


Abb. 87: Optimierung der Trennung einer Microcystin-Standardmischung mit einer RP-Amid-C₁₆-Säule (Supelco 15 cm × 2.1 mm, 5 μm, 120 Å).

Mobile Phase: Wasser/Acetonitril + jeweils 0.01 % TFA. Standards je 1 mg/L, Fluß 0.4 mL/min. Der Gradient ist gestrichelt eingezeichnet.

Das Ergebnis der HPLC-MS-Kopplung mit dem Wasser/Acetonitril-Gradienten mit 0.01 % TFA im Laufmittel ist in Abb. 88 zu sehen. Der Fluß wurde wegen der Kopplung an das Massenspektrometer auf 0.3 mL/min reduziert, weshalb sich die Retentionszeiten verschieben. Es ist zu erkennen, daß die chromatographische Trennung gut funktioniert. Unter diesen Bedingungen wird jedoch das MS-Signal stark unterdrückt. Wie Tabelle 25 zeigt, werden Microcystin -LR, -YR und Nodularin um rund 60 % unterdrückt, Microcystin-RR um 46 %. TFA scheint selbst in dieser geringen Konzentration die Ionisierung sehr effektiv zu unterdrücken. Wird Ameisensäure statt TFA dem Laufmittel zugesetzt, so werden die Signale des Massenspektrometers viel höher. Allerdings sind im UV-Chromatogramm nahezu keine Peaks mehr zu erkennen und die hydrophoben Microcystine eluieren nicht von der Säule, wie in Abb. 89 zu sehen ist.

Die Masse des C₁₃-Isotopenpeaks von Microcystin-LA (monoisotopische C₁₃-Masse: [M+H]⁺ = 911.49) überlagert sich der Masse des Spaltproduktes von Microcystin-YR ([M+2H-135]⁺ = 911.53). Da die Signale beider Massen bei der Darstellung der Massenspuren der Microcystine berücksichtigt wurden, erscheinen sowohl bei der Microcystin-LA-, als auch bei der -YR-Massenspur, Peaks bei der Retentionszeit des jeweils anderen Microcystins.

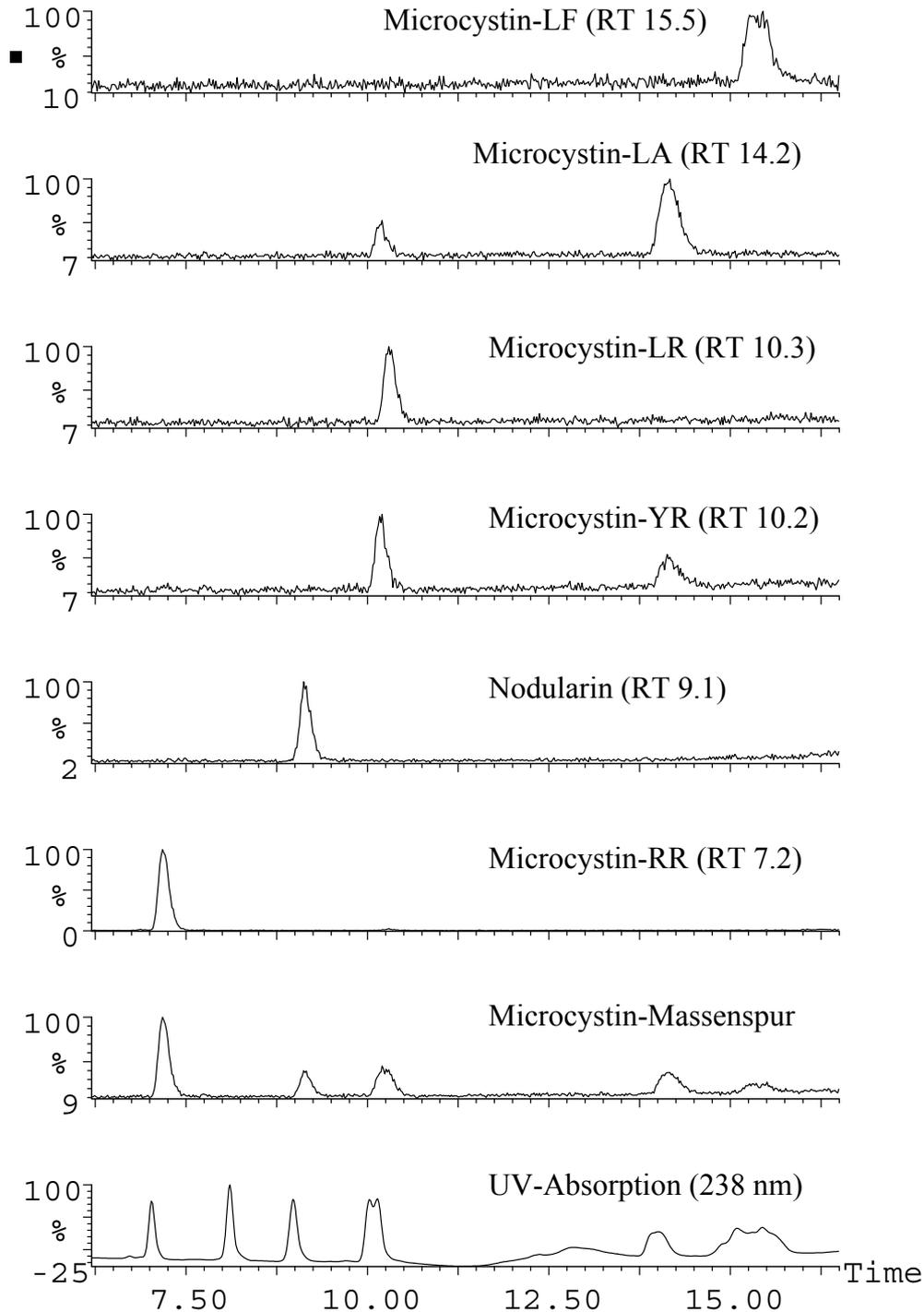


Abb. 88: HPLC-(ES⁺)-MS-Kopplung einer Microcystin-Standardmischung (Microcystin-RR, Adda, Nodularin, Microcystin-YR, Microcystin-LR, Microcystin-LA, Microcystin-LW, Microcystin-LF, je 1 mg/L) mit 0.01 % TFA-Zusatz im Laufmittel. Die unterste Spur zeigt die UV-Absorption bei 238 nm, die nächsthöhere zeigt die Gesamtmassenspur aller zu den Toxinstandards gehörenden Massen. Bei den höheren Massenspuren werden die einzelnen Microcystine angezeigt.

Fluß der HPLC-Anlage: 0.3 mL/min. Zwischen UV-Detektor und MS wurde ein Splitter montiert, der den Fluß ins Massenspektrometer auf ca. 100 µL/min reduzierte.

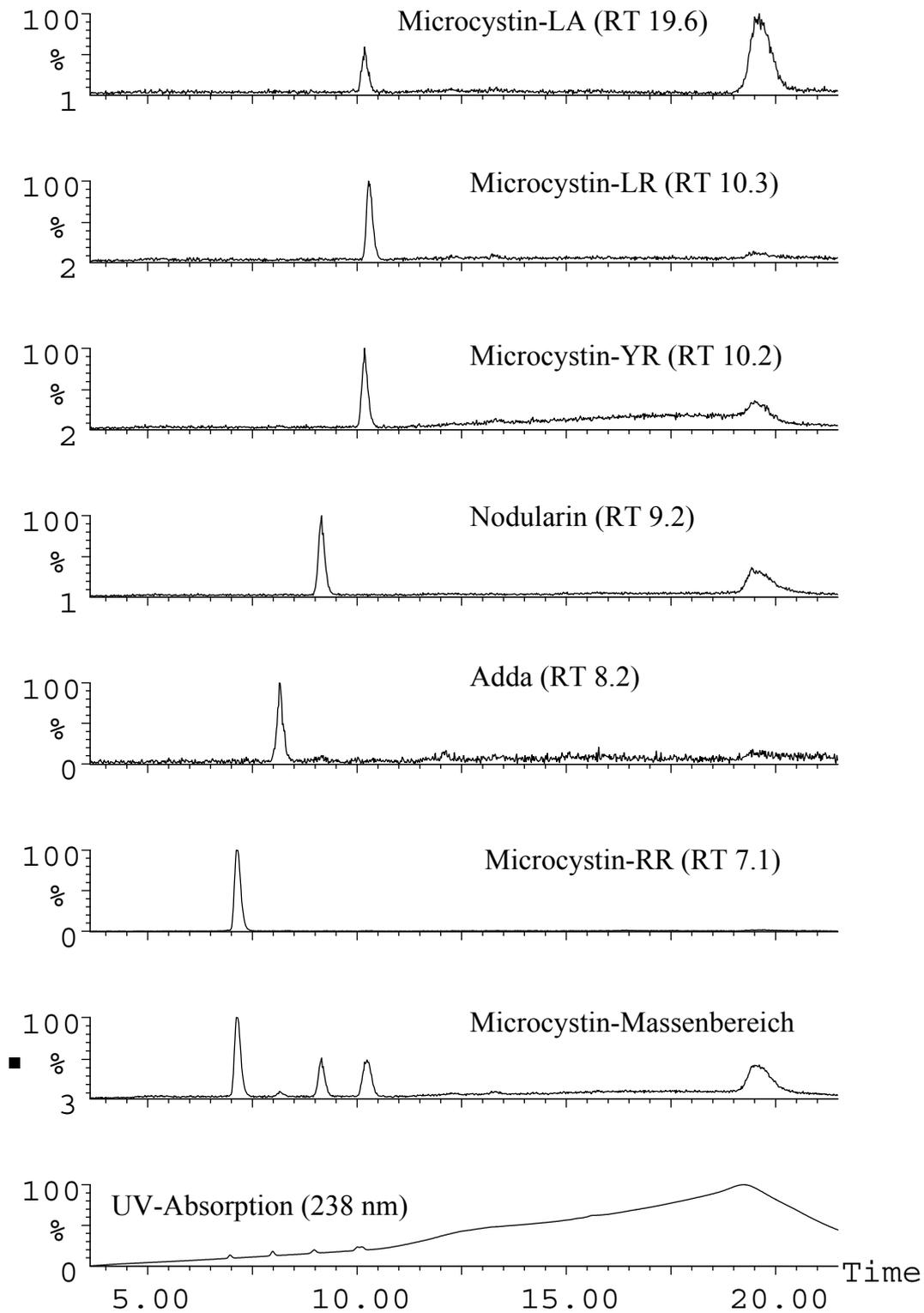


Abb. 89: HPLC-(ES⁺)-MS-Chromatogramm einer Microcystin-Standardmischung (Microcystin-RR, Adda, Nodularin, Microcystin-YR, Microcystin-LR, Microcystin-LA, Microcystin-LW, Microcystin-LF, je 1 mg/L) mit Ameisensäure-Zusatz (0.2 %) im Laufmittel. Die unterste Spur zeigt die UV-Absorption bei 238 nm, die nächsthöhere zeigt die Gesamtmassenspür aller zu den Toxin-Standards gehörenden Massen. Bei den höheren Massenspüren werden die für die einzelnen Microcystine charakteristischen Massen angezeigt. Bedingungen: s. Abb. 88.

Tabelle 25: Vergleich der Signalintensitäten für Microcystine mit 0.01 % TFA und 0.2 % Ameisensäure im Laufmittel.

Toxin	Signalintensität [AU] bei Zusatz von	
	0.01 % TFA	0.2 % Ameisensäure
Microcystin-LR	232	596
Microcystin-YR	239	647
Microcystin-RR	1080	2000
Microcystin-LA	259	264
Microcystin-LW	-	-
Microcystin-LF	144	-
Nodularin	364	987
Adda	-	107

Auf eine weitere Optimierung der HPLC-MS-Methode wurde verzichtet, da eine on-line-Festphasenanreicherung von Microcystinen mit dieser Methode verbunden wurde und hierfür andere optimale Bedingungen gelten. Die on-line-Festphasenanreicherung ist in Kapitel 9 beschrieben.

8.8 Molmassenbestimmung von Proteinen und Hapten-Protein-Konjugaten mittels ESI-TOF

Die Bestimmung der Molmasse eines Proteins ist im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit vor allem für die Bestimmung von Kopplungsdichten von Immunkonjugaten und Enzymtracern interessant. Ein rationales Design von Immunkonjugaten würde künftige Immunisierungen sehr erleichtern. Bisher ist z. B. nicht sicher bekannt, ob niedrige, mittlere oder hohe Kopplungsdichten von Haptenen an Trägerproteine zu hochaffinen Antikörpern führen.

Wird ein Protein im ESI-MS vermessen, so sollte es in möglichst sauberer Form (ohne Salze im Lösungsmittel) und in einer Konzentration von einigen $\mu\text{mol/L}$ (für Rinderserumalbumin BSA ca. 0.2 g/L) vorliegen. Die Signale, die erhalten werden, entsprechen einer homologen Reihe von m/z -Peaks, wobei die Ladung z je nach Protein von ca. 20 bis 60 jeden ganzen Zahlenwert annehmen kann. Die Messung von Rinderserumalbumin vor und nach einer Grundlinienkorrektur ist in Abb. 90 dargestellt.

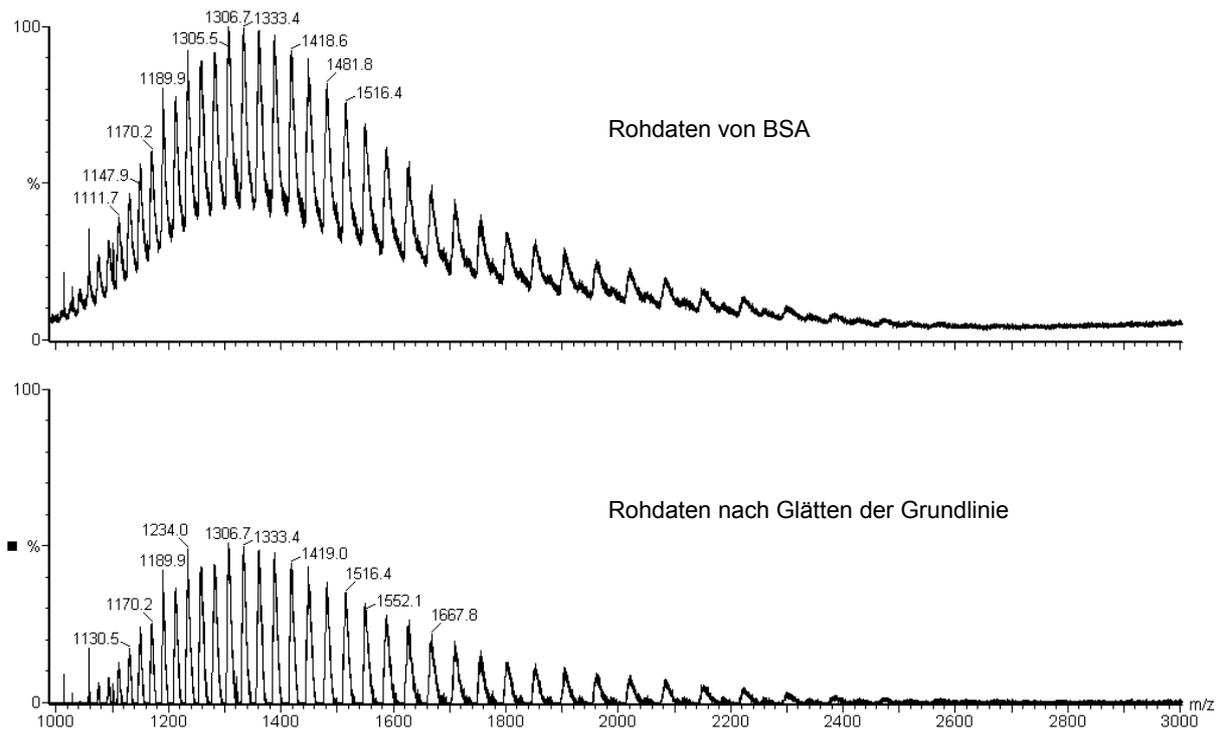


Abb. 90: Positiv-Ionen-ESI-Spektrum von Rinderserumalbumin (BSA) vor und nach Abzug der Grundlinie.

Die erhaltenen Daten werden anschließend entfaltet (MaxEnt-Programm, Maximum-Entropy-Algorithmus), so daß ein fiktives Spektrum erhalten wird, welches nur das einfach geladene Molekülion zeigt. Abb. 91 zeigt oben das entfaltete Spektrum von BSA. Hohe Intensitäten zeigen an, daß die entsprechende Masse mit hoher Wahrscheinlichkeit gefunden wurde. Die Mengenverhältnisse der einzelnen Proteinspezies werden sichtbar, wenn über die Flächen integriert wird (unteres Diagramm in Abb. 91). Die Molmasse, die in diesem Fall die höchste Wahrscheinlichkeit hat, ist die Masse 66 440, was sehr nahe an die Literaturwerte (66 432.3 [329] bzw. 66 465.8 [330]) herankommt.

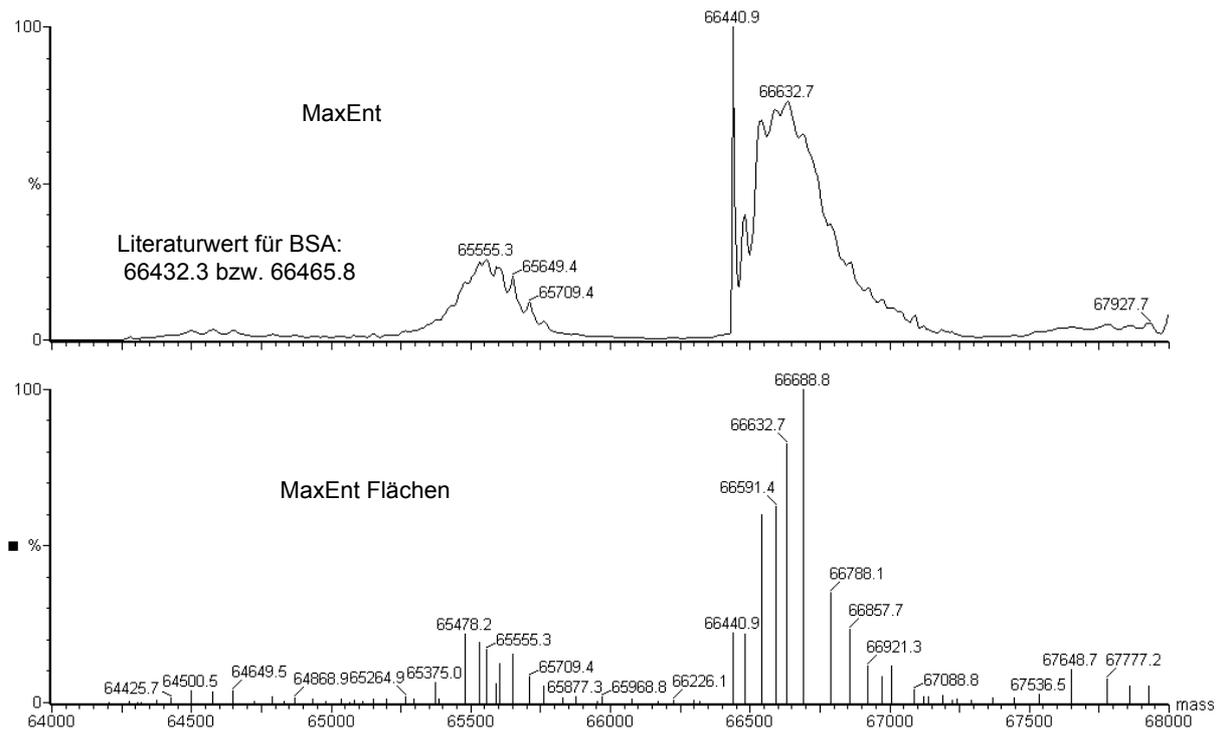


Abb. 91: Entfaltetes Positiv-Ionen-ESI-Spektrum von Rinderserumalbumin. Im oberen Diagramm stellt die y-Achse ein Maß der Wahrscheinlichkeit für die betreffende Masse dar, im unteren Diagramm ist die relative Häufigkeit gegen die Molmasse aufgetragen.

Zusätzlich zu der Bestimmung des Molekulargewichts von Rinderserumalbumin (BSA), wurde ein Konjugat aus *N*-Acetyl-ADDA und BSA vermessen. Diese Messung ist insofern komplizierter, als bei der Synthese des Konjugates Spezies unterschiedlicher Kopplungsdichte entstehen, die nicht getrennt werden können. Deshalb läßt sich nur eine mittlere Kopplungsdichte bestimmen. Obzwar das Konjugat gelchromatographisch gereinigt wurde, ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis wesentlich schlechter als bei nativem BSA, wie in Abb. 92 zu sehen ist. Allerdings ist zu erkennen, daß die m/z -Signale zu deutlich höheren Werten verschoben sind, als bei nativem BSA. Dies ist einerseits darauf zurückzuführen, daß durch die Kopplung Ladungen des Proteins vernichtet wurden, während keine weiteren Ladungen eingeführt wurden, und andererseits auf den Anstieg des Molekulargewichts gegenüber nativem BSA. Abb. 92 zeigt die Rohdaten im oberen Diagramm, die Daten nach Abzug der Grundlinie und Glätten der Kurven im mittleren Diagramm und das entfaltete Massenspektrum im unteren Diagramm.

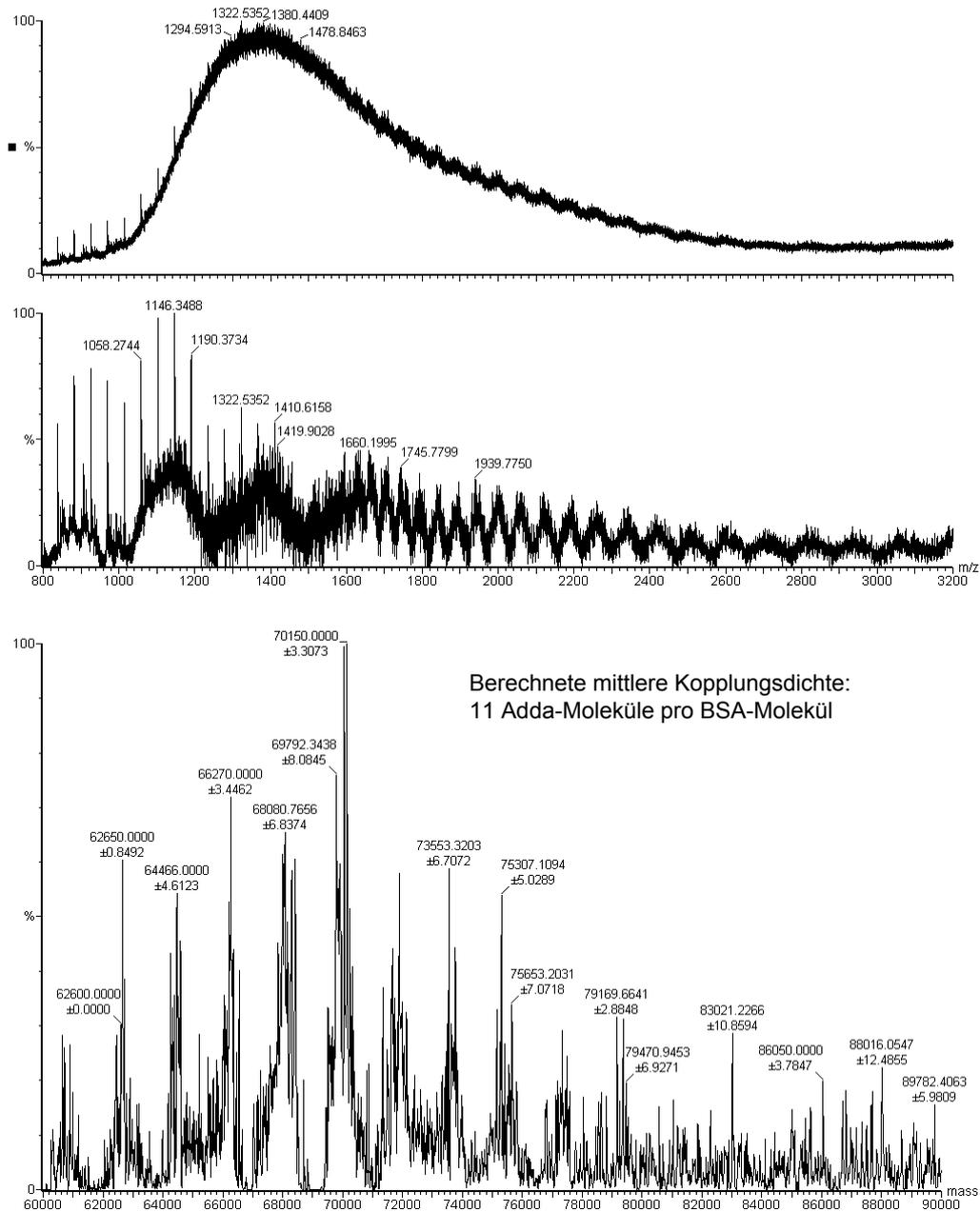


Abb. 92: Bestimmung der mittleren Kopplungsdichte eines *N*-Acetyl-Adda-BSA-Konjugats mittels Positiv-Ionen-ESI-Massenspektrometrie. Das Ion, das am häufigsten in Probe enthalten ist, hat ein Molekulargewicht von 70 150, was einer Kopplung von 11 *N*-Acetyl-Adda-Molekülen pro BSA-Molekül entspricht.

Die auf diese Weise bestimmte Kopplungsdichte beträgt 11 *N*-Acetyl-Adda-Moleküle pro BSA-Molekül. Das Experiment zeigt gleichzeitig die Grenzen der Bestimmung von Kopplungsdichten mittels Massenspektrometrie auf. Trägerproteine, die keine einheitliche Struktur haben, wie z. B. KLH oder Proteine, die über mehrere Stufen mit dem Hapten gekoppelt wurden, wie im Falle der Microcystin-Immunkonjugate, lassen eine massenspektrometrische Bestimmung der Kopplungsdichte mit ESI nicht zu.

8.9 Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

Dieses Kapitel beschreibt die massenspektrometrische Analyse von Microcystinen. Diese lassen sich mit dem Elektrospray-Flugzeit-Massenanalysator ionisieren und empfindlich nachweisen. Im positiven Ionenmodus treten alle Microcystine bis auf Microcystin-RR als einfach geladene Ionen auf. Sie bilden bei der Ionisierung neben dem Molekülion häufig Natrium-Adduktionen, welche die Identifizierung und Quantifizierung erschweren. Natrium-Adduktionen treten verstärkt bei Zusatz von Ameisensäure auf, in geringerem Maße bei Zusatz von Oxalsäure und in geringstem Maße bei Verwendung von Reinstwasser ohne Säurezusatz. Im negativen Ionenmodus sind alle Microcystine einfach geladen. Sie können in diesem Modus ebenfalls Salzaddukte bilden. Da jedoch in diesem Fall keine Säure zugegeben wird, treten Salzaddukte wesentlich seltener auf.

Die Fragmentierung der Microcystine in beiden Ionisierungsmodi ist durch Erhöhung der Spannung zwischen der Ionenquelle und der Einlaßöffnung des Massenspektrometers möglich. Einige Fragmente, die charakteristisch für Microcystine sind, treten bereits bei sehr niedrigen Spannungen auf. Im positiven Modus sind dies die Ionen 135 bzw. Ion $[M+2H-135]^+$, Produkte der Spaltung der Adda-Seitenkette. Im negativen Modus ist Ion 128 (Glutaminsäure oder D-erythro- β -Methylasparaginsäure) ein charakteristisches Fragment. Die zur Fragmentierung notwendige Spannung ist mit 120 V im positiven und 150 V im negativen Modus relativ hoch. Dieses deutet auf die hohe Stabilität des Peptidrings. Bei diesen Spannungen werden lineare Peptide ebenfalls fragmentiert, was dazu führt, daß die Fragmentenspektren von Microcystinen im höhermolekularen Bereich wenig Fragmentionen zeigen. Dies erschwert eine Strukturaufklärung mittels Massenspektrometrie. Verlässliche Fragmentenspektren werden ab Konzentrationen von 1 mg/L erhalten.

Die Arbeiten zu der HPLC-MS-Kopplung haben gezeigt, daß der für die chromatographische Trennung optimale Gradient unter Verwendung von TFA im Laufmittel für eine massenspektrometrische Detektion nicht geeignet ist. In diesem Fall eignet sich Ameisensäure als Laufmittelzusatz besser, obwohl dadurch eine Peakverbreiterung und eine Verschiebung der Retention der hydrophoben Microcystine erhalten wird. Die Detektion ist sowohl im positiven als auch im negativen Ionenmodus möglich. Natrium-Adduktionen werden auch in diesem Fall beobachtet.

Das ESI-TOF-Gerät eignet sich ebenfalls für die Bestimmung der Molekularmassen von Proteinen und Proteinkonjugaten. Letztere müssen allerdings in wenigen Stufen hergestellt worden sein und von Proteinen einheitlicher Struktur stammen.

9 On-line-SPE-HPLC-MS-UV-Methode zur Messung von Microcystinen

Während Kapitel 8 die Auswahl eines geeigneten Massenspektrometers, den Aufbau und die Optimierung der Bedingungen zur Messung von Microcystinen beschreibt, wird in diesem Kapitel die Kopplung einer on-line-Festphasenextraktion (engl. solid phase extraction, SPE) an das bestehende LC-MS-System beschrieben. Die Kopplung ist notwendig, da cyanobakterielle Realproben einen hohen Matrixanteil besitzen und gleichzeitig geringe Microcystinkonzentrationen nachgewiesen werden müssen. Ziel ist es, niedrige Nachweisgrenzen für hydrophile wie hydrophobe Microcystine in belasteten Gewässern zu erreichen und den Umgang mit den toxischen Realproben zu minimieren.

9.1 Aufbau der Apparatur

Die sich aus der Zielsetzung ergebenden Anforderungen an die on-line-Festphasenextraktion sind vielfältig. Ein hoher Volumendurchsatz ist erforderlich, um Wasserproben von 0.2-1 L in vertretbarem Zeitaufwand anreichern zu können. Dies hat zur Folge, daß die verwendeten Kartuschen, Schaltventile und Schläuche einen niedrigen Rückdruck aufweisen müssen. Die Anreicherungsbedingungen auf der Kartusche müssen weitgehend quantitativ sein und der zwischen Anreicherung und Elution erfolgende Spülschritt sollte den Großteil der Matrix entfernen. Die Transferbedingungen von der Kartusche müssen gewährleisten, daß sowohl die hydrophilen als auch die hydrophoben Microcystine eluieren und gleichzeitig auf der analytischen Säule angereichert werden. Dies erfordert den Einsatz zweier möglichst komplementärer Festphasen zur Anreicherung und chromatographischen Trennung.

Da möglichst viele Wasserproben vermessen werden sollten, wurde ein Schaltventil zur Auswahl der Wasserproben, Spül- und Elutionsmittel und ein programmierbarer Kartuschenhalter und -wechsler mit intergriertem Schaltventil (Anreicherung/Elution) verwendet.

Die experimentelle Anordnung in Abb. 93 dargestellt.

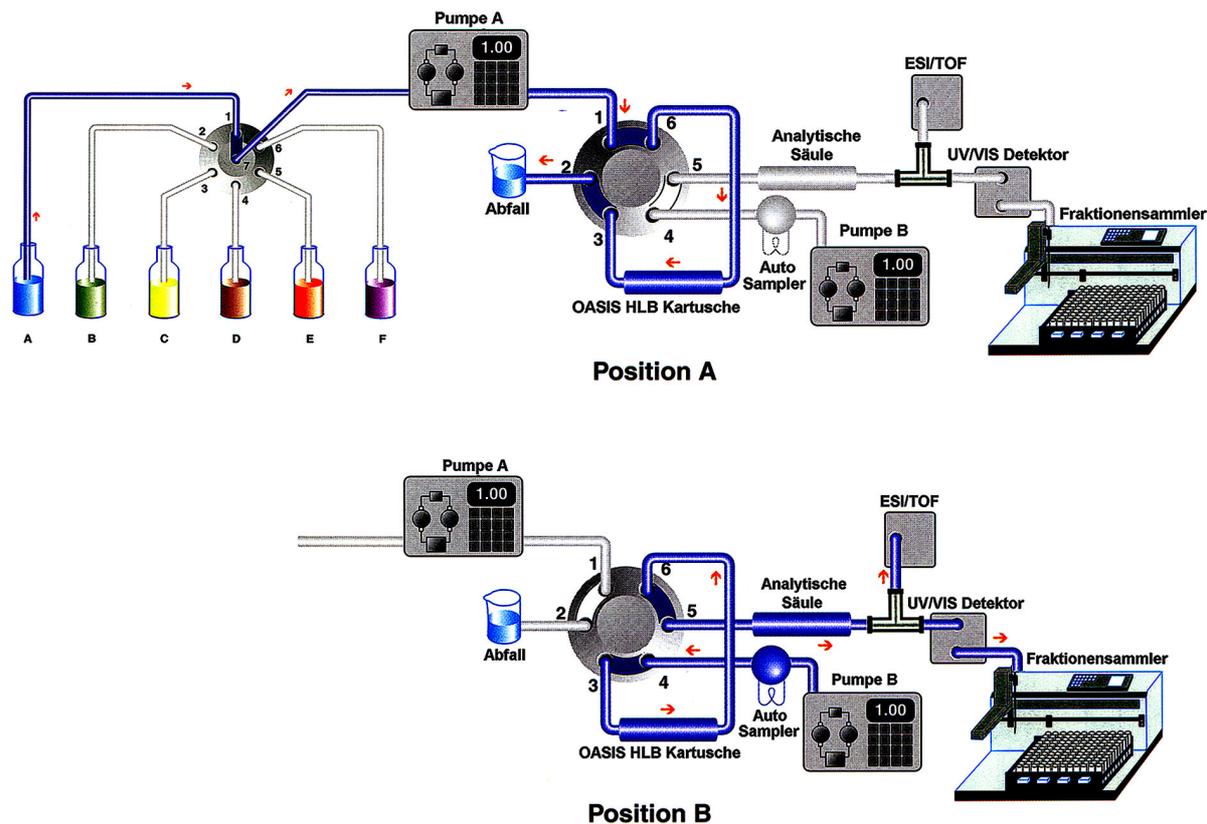


Abb. 93: Aufbau des on-line-SPE-HPLC-MS-UV-Systems.

Position A ist die Anreicherungsposition, Position B ist die Elutions-, Trenn- und Detektions-Position. In Position A befindet sich links die Proben- und Lösungsmittel-Auswahleinheit (Rheodyne-6-Kanal-Ventil). Das Lösungsmittel wird von der HPLC-Pumpe A (50-mL-Pumpenkopf) gefördert. Das 2-Wegeventil und der Kartuschenhalter sind in einer Einheit (Prospekt) integriert, die die Kartuschen automatisch wechselt, programmierbar ist und von Pumpe B gestartet wird. Diese Einheit steuert zusätzlich die Lösungsmittel-Auswahleinheit und Pumpe A. Pumpe B fördert die Laufmittel für die Trennung auf der analytischen Säule (RP-Amid-C₁₆). (Bildquelle: Rheodyne)

Die wäßrige, angesäuerte Probe wird zunächst auf der vorkonditionierten Kartusche angereichert (Position A, dunkler Lösungsmittelfluß, Abb. 93). Der Volumenstrom beträgt dabei 20 mL/min und ermöglicht somit die Anreicherung größerer Probenvolumina. Das Spülen der Kartusche erfolgt durch Auswahl eines anderen Lösungsmittelkanals, anschließend an den Anreicherungs-schritt. Während auf der Kartusche angereichert wird, wird die analytische Säule konditioniert (Position A, heller Lösungsmittelfluß, Abb. 93). Sobald das 6-Kanal-Ventil von Position A in Position B schaltet, wird die Kartusche in umgekehrter Flußrichtung von dem Laufmittel der Pumpe B gespült. Die Analyten werden von der Kartusche eluiert, auf der analytischen Säule retardiert, getrennt und im Massenspektrometer sowie im UV/VIS-Detektor nachgewiesen. Alternativ dazu kann der Lauf fraktioniert werden und anschließend immunologisch detektiert werden.

9.2 Optimierung der Parameter

9.2.1 Auswahl der Anreicherungskartusche

Als Anreicherungskartuschen wurden kommerziell erhältliche, mit dem "Prospekt"-System kompatible Kartuschen gewählt. Die Kartuschen sollten hydrophiler sein als das Festphasenmaterial der analytischen Säule (RP-Amid-C₁₆), und einen geringen Rückdruck aufweisen, um hohe Flußraten zu ermöglichen. Tabelle 26 zeigt eine Zusammenstellung der getesteten Kartuschen.

Tabelle 26: Übersicht über kommerziell erhältliche Anreicherungskartuschen und deren Eigenschaften.

	OASIS [®] HLB	HySphere-C8	HySphere-CN	LiChrospher RP-8 ADS
Partikeldurchmesser	30 µm	8 µm	8 µm	25 µm
Porendurchmesser	80 Å	130 Å	130 Å	60 Å
Eignung	geeignet	Rückdruck zu hoch	Rückdruck zu hoch	keine Prospekt-Kartusche, säurelabil

Die Festphasenmaterialien HySphere-C8 (Octyl Silica) und HySphere-CN (Cyanopropyl Silica) wurden wegen des geringen Partikeldurchmesser und des sich daraus ergebenden hohen Rückdruckes nicht weiter verwendet. Das Festphasenmaterial LiChrospher RP-8 ADS, dessen äußere Oberfläche hydrophil (Alkyl-Diol-Silica) und innere Oberfläche hydrophob (C-8-Alkylketten) ist ein "restricted access"-Material, dessen Poren nur für kleine Moleküle (< 15 000 Da) zugänglich sind. Große Moleküle, wie Proteine und Huminsäuren werden größtenteils ausgeschlossen. Nachteil dieses Festphasenmaterials ist die geringere Säurebeständigkeit und die Tatsache, daß die Kartuschen nicht im Prospekt-Format erhältlich sind. Anreicherungsexperimente ergaben keinen wesentlichen Vorteil gegenüber den OASIS-Kartuschen.

Das OASIS[®]-HLB-Festphasenmaterial ist ein Copolymer aus *N*-Vinylpyrrolidon und Divinylbenzol (s. Abb. 94). Dieses Material hat einen geringen Rückdruck, ist wasserbenetzbar und kann mit wenig Lösungsmittel konditioniert werden. Alle weiteren Optimierungsschritte wurden mit diesem Material durchgeführt.

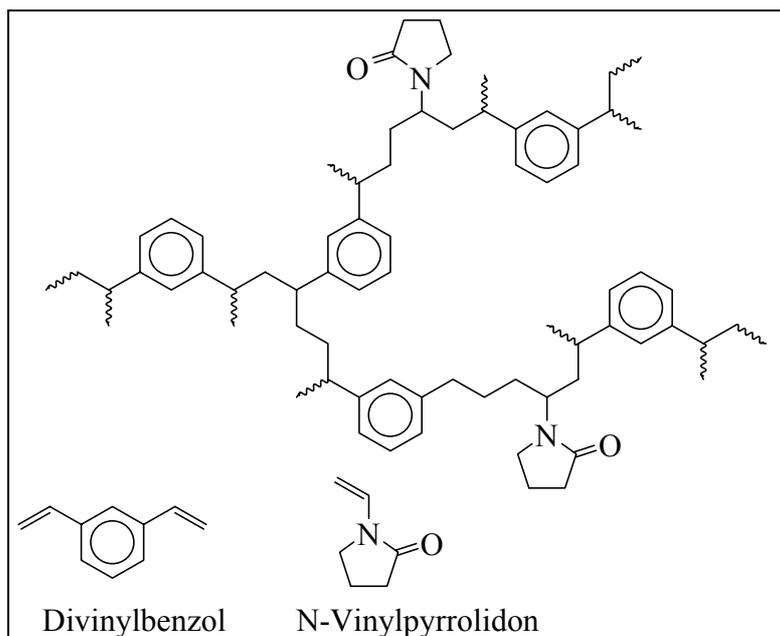


Abb. 94: Festphasenmaterial von OASIS[®] HLB (HLB, Hydrophilic-Lipophilic Balance).

9.2.2 Optimierung der Festphasenextraktion

Zunächst wurde untersucht, ob eine Festphasenextraktion mit anschließender massenspektrometrischer Detektion und ohne eine chromatographische Trennung eine geeignete Meßmethode darstellt. Dies wäre im Prinzip möglich, da mit dem Flugzeit-Massenanalysator ein großer Massenbereich ohne Empfindlichkeitsverlust gemessen werden kann. Somit wäre eine Identifizierung der Microcystine aufgrund ihrer Masse möglich, sowie eine Quantifizierung unter Verwendung eines geeigneten internen Standards. Bei einer massenspektrometrischen Detektion ist zu beachten, daß die Empfindlichkeit im negativen Ionenmodus und ohne Säurezusatz im Laufmittel am besten ist.

Die Anreicherung einer Microcystin-Standardmischung (Microcystin -RR, -LR, -YR, -LA, -LF, -LW und Nodularin, 0.16 µg/L, 150 mL Anreicherungs-volumen) erfolgte zunächst unter neutralen Bedingungen. Anschließend wurde mit Wasser gespült und mit einem 10-minütigen Wasser/Acetonitril-Gradienten mit 0.2 % Ameisensäure eluiert. In diesem Versuch wurden Lösungsmittelgemische gesucht, die Microcystine von der Kartusche eluieren. Detektiert wurde im positiven Ionenmodus. Unter den gegebenen Bedingungen eluierten die hydrophilen Microcystine schon bei sehr geringen Anteilen an organischem Lösungsmittel. Die hydrophoben Microcystine (-LF und -LW) eluierten als sehr breite Peaks bei höheren Lösungsmittelkonzentrationen. Bei Verwendung 0.1 % Ameisensäure als Probenadditiv ließ sich die Wiederfindung der Microcystine deutlich steigern. Wurde im negativen Ionenmodus detektiert, so konnte ohne Säurezusatz eluiert werden. Hier war das Signal-zu-Rausch-Verhältnis wesentlich besser als im positiven Ionenmodus.

Nodularin, dessen Retentionsverhalten ähnlich dem von Microcystin-LR ist, wurde schon bei 10 % Acetonitril im Laufmittel von der Kartusche eluiert. Ein Wechsel des Lösungsmittels

von Acetonitril zu Methanol brachte keine Änderung des Elutionsverhaltens. Eine Elution der Microcystine bei sehr geringen Anteilen an organischem Lösungsmittel hat zur Folge, daß die Probenmatrix nicht effektiv abgetrennt werden kann. Allerdings läßt sich das Retentionsverhalten durch Verwendung eines Ionenpaarreagenzes (z.B. Trifluoressigsäure) steuern. Abb. 95 zeigt, daß Nodularin bei Verwendung von 0.2 % Ameisensäure in der Probe unter Bedingungen eluiert, unter denen die Matrix (Totalionenstrom) nicht vollständig abgetrennt ist. Bei Verwendung von 0.01 % TFA in der Probe eluiert Nodularin später und kann somit von der Matrix besser getrennt werden.

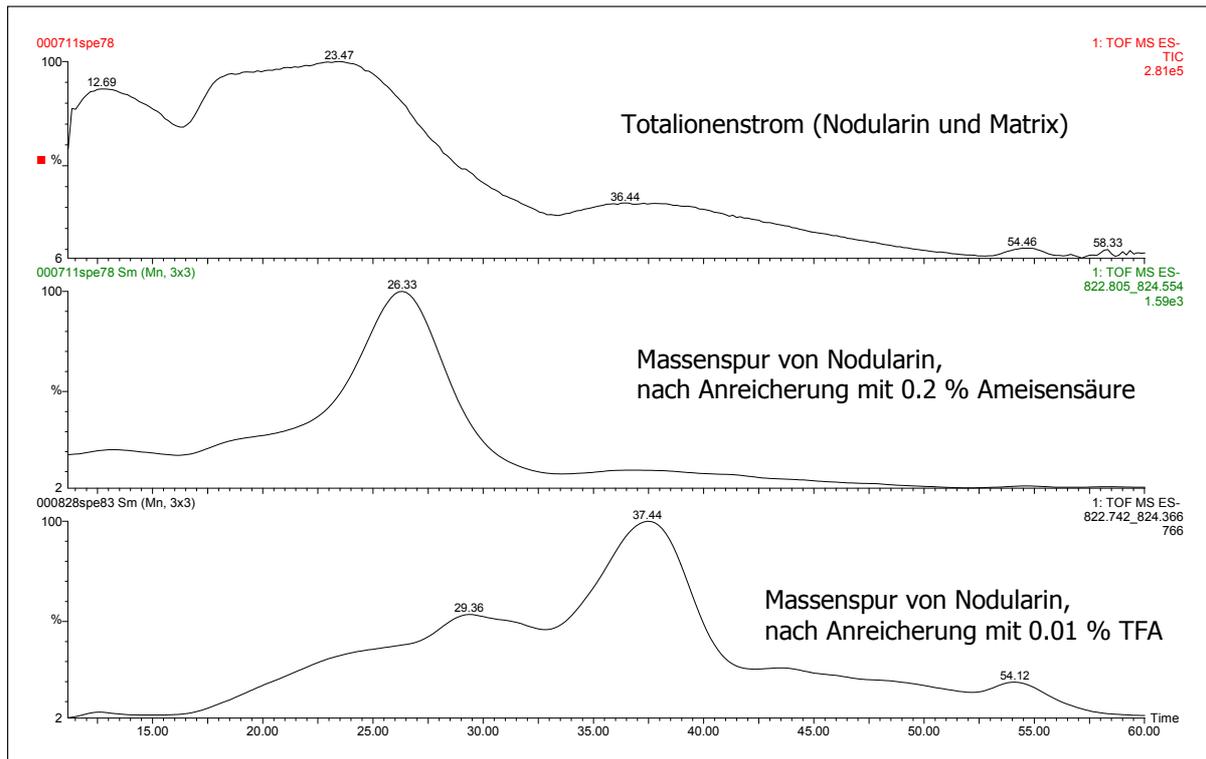


Abb. 95: Einfluß der Säure bzw. des Ionenpaarreagenzes auf die Retention von Nodularin an OASIS HLB.

Wasserprobe vom Klostersee (14.6.2000), aufgestockt mit 2 µg/L Nodularin (-R); 125 mL angereichert, eluiert mit Wasser/Acetonitril 85/15 zwischen Minute 20 und 30; danach mit einem linearen Gradienten (Minute 50 Wasser/Acetonitril 65/35).

Durch Erhöhung der TFA-Konzentration im Spülschritt läßt sich die Peakform wesentlich verbessern. Gleichzeitig verschiebt sich die Elution zu höheren Lösungsmittelanteilen, wie Abb. 96 zeigt.

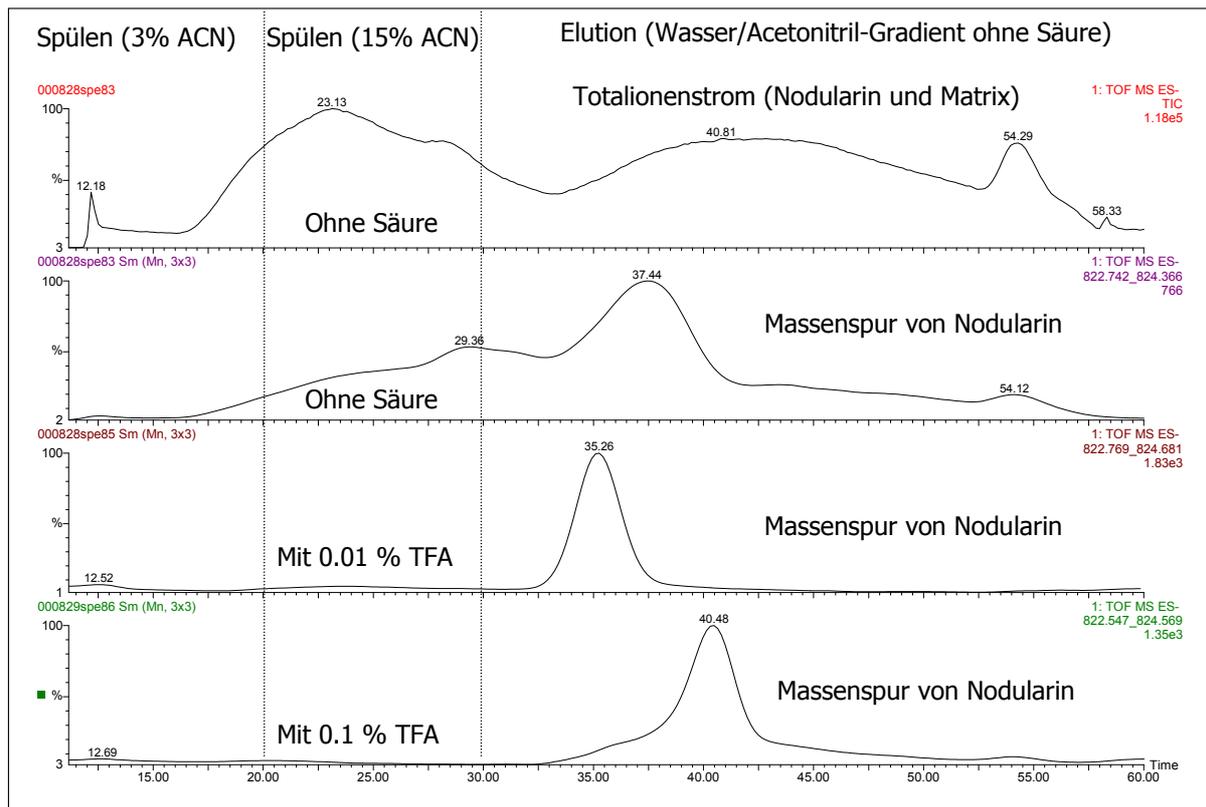


Abb. 96: Einfluß der TFA-Konzentration im Spülschritt auf das Retentionsverhalten und die Peakform von Nodularin.

Wasserprobe vom Klostersee (14.6.2000), aufgestockt mit 2 µg/L Nodularin; 125 mL angereichert.

Ausgehend von diesem Ergebnis wurden die folgenden Anreicherungsexperimente mit 0.05 % TFA in der Probe, einem Spülschritt mit Wasser (+ 0.1 % TFA) und einem Spülschritt mit Wasser/Acetonitril 85/15 (+ 0.085 % TFA) durchgeführt. Abb. 97 zeigt die Massenspektren einer Microcystin-Standardmischung sowie den Totalionenstrom nach Anreicherung einer aufgestockten Realprobe.

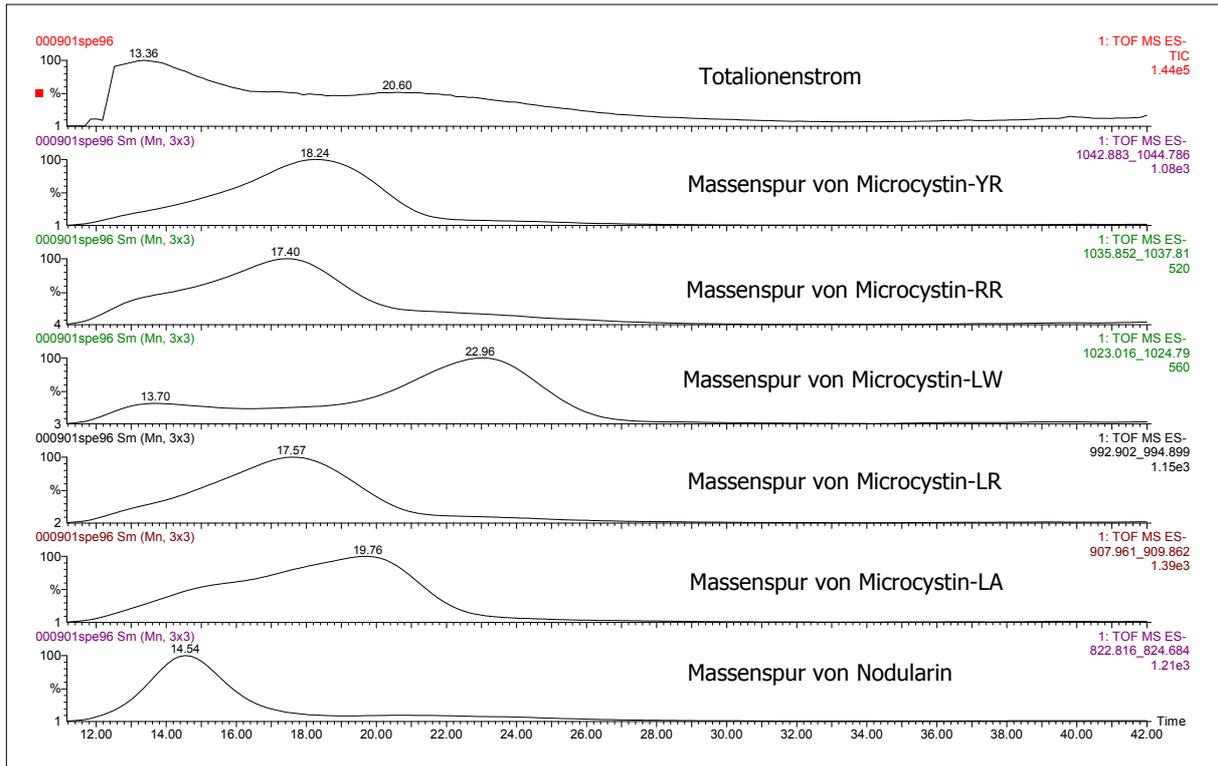


Abb. 97: Festphasenextraktion einer mit Microcystinen aufgestockten Realprobe und massenspektrometrischer Detektion (Negativ-Ionen-ESI).

Angereichert wurden 120 mL einer mit Microcystinen und Nodularin (je 2 µg/L; + 0.05 % TFA) aufgestockten Realprobe (Klostersee, 14.6.2000). Gespült wurde mit 10 mL Wasser (+ 0.1 %TFA) und 10 mL Wasser/Acetonitril (85/15 + 0.085 % TFA). Eluiert wurde mit einem Wasser/Acetonitril-Gradienten (Minute 13-16: 15 % Acetonitril, dann linear bis Minute 32: 58 % Acetonitril).

Da die Elutionspeaks der Microcystine trotz Verwendung eines steilen Lösungsmittelgradienten sehr breit blieben und eine effektive Abtrennung der Matrix nicht erfolgreich war, wurde in einem weiteren Schritt eine analytische Säule nachgeschaltet.

9.2.3 Kopplung der Festphasenextraktion an die chromatographische Trennung

Bei der on-line-Kopplung der Festphasenextraktion an die analytische Säule wurde der Effekt ausgenutzt, daß sich die Polarität der Microcystine durch den Zusatz von Trifluoressigsäure (TFA) steuern läßt. TFA wurde der Probe zur Anreicherung zugesetzt und die Kartusche mit einem TFA-haltigen Lösungsmittelgemisch aus 15 % Acetonitril und 85 % Wasser gespült. Der Transferschritt von der Kartusche auf die Säule erfolgte ohne TFA mit einem Wasser/Acetonitril-Gemisch von 85/15. Unter diesen Bedingungen werden die Microcystine auf der analytischen Säule retardiert. Die Chromatographie auf der analytischen Säule ist ohne Säurezusatz mit einem Wasser/Acetonitril-Gradienten möglich, wobei schmale Elutionspeaks erhalten werden. Daß eine chromatographische Trennung der Microcystine ohne Säurezusatz möglich ist, kann einerseits dadurch erklärt werden, daß die bei der Anreicherung entstandenen TFA-Ionenpaare stabil genug sind, um die Chromatographie zu ermöglichen. Andererseits ist zu berücksichtigen, daß ein Festphasenmaterial mit geringem Restsilanolanteil verwendet wurde. Der Verzicht auf Säure im Laufmittel hat den Vorteil, daß im negativen Ionenmodus detektiert werden kann. Dieser Modus liefert eine höhere Empfindlichkeit als der positive. Das Fließschema des optimierten on-line-SPE-HPLC-UV(PDA)-MS-Systems ist in Abb. 98 dargestellt.

Zur Überprüfung der optimierten Bedingungen wurde eine Wasserprobe mit einer Microcystin-Standardmischung (2 µg/L je Toxin) aufgestockt, angereichert und vermessen. Der Totalionenstrom und die Massenspuren der einzelnen Microcystine sind in Abb. 99 zu sehen. Abb. 99 zeigt, daß die hydrophilen Microcystine in schmalen Peaks eluieren, während die Peaks der hydrophoben Microcystine breiter sind. Die Peakflächen der einzelnen Microcystine sind unterschiedlich, was dafür spricht, daß der Transferschritt von der Kartusche auf die analytische Säule nicht für alle Microcystine gleichermaßen geeignet ist.

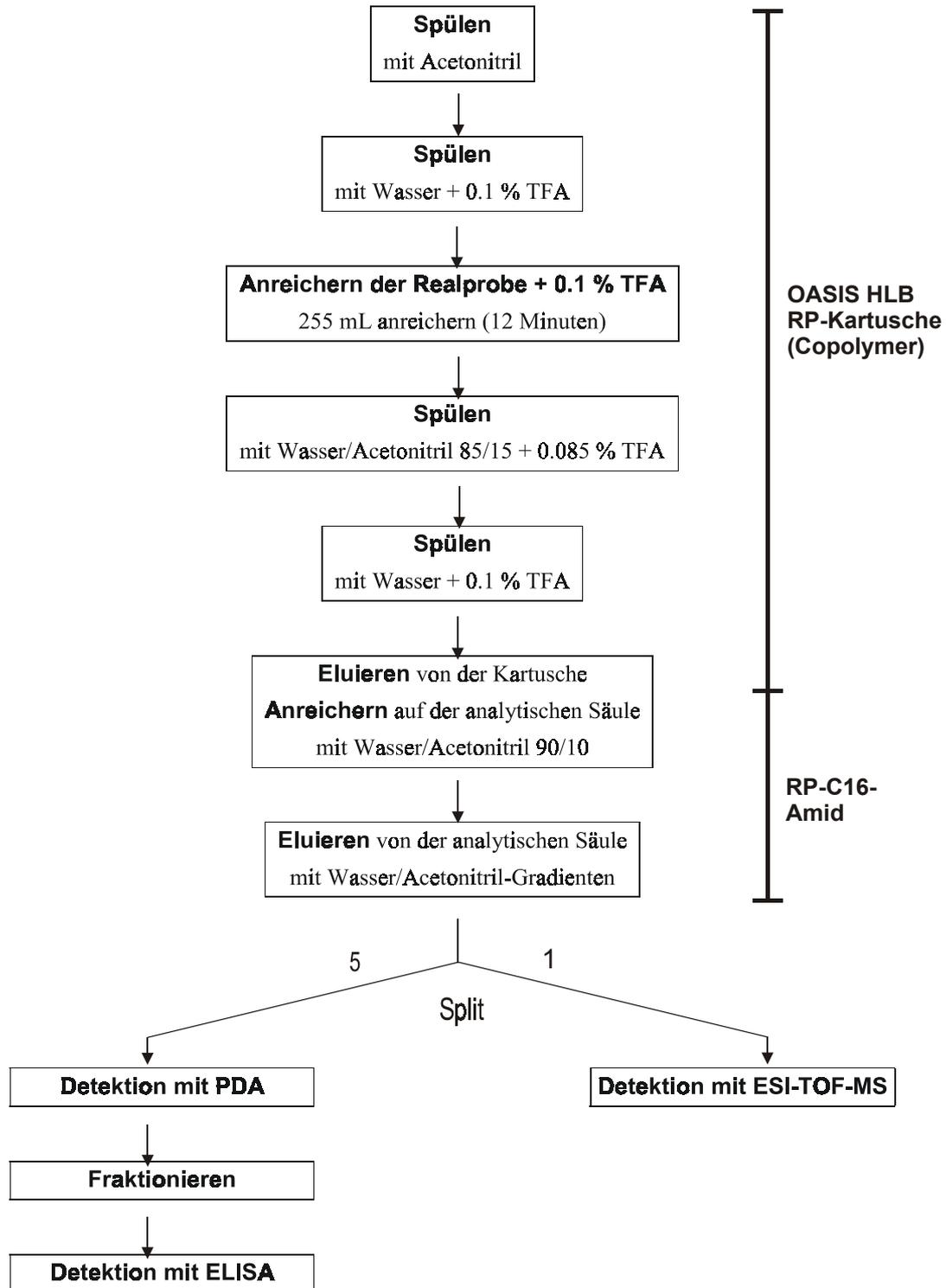


Abb. 98: Fließschema der optimierten SPE-HPLC-MS-UV-Detektion von Microcystinen.

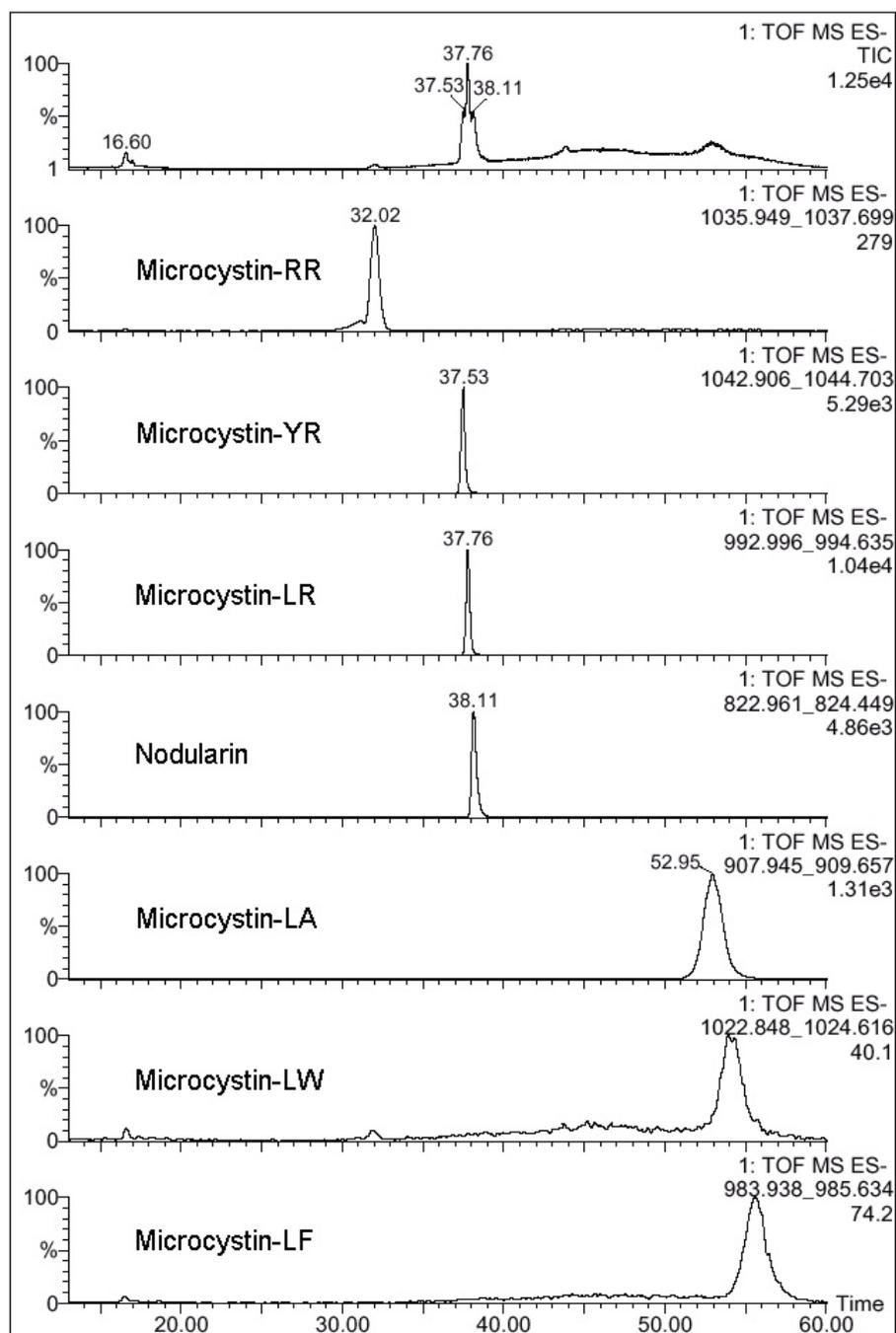


Abb. 99: On-line-SPE-HPLC-MS einer mit Microcystinen gespikten Realprobe.

Angereichert wurden 120 mL einer mit Microcystinen und Nodularin (je 2 $\mu\text{g/L}$; + 0.05 % TFA) gespikten Realprobe (Klostersee, 14.6.2000). Gespült wurde mit 10 mL Wasser (+ 0.1 % TFA) und 10 mL Wasser/Acetonitril (85/15 + 0.085 % TFA). Transferschritt: Wasser/Acetonitril 85/15 (Minute 14-25). Trennschritt: linearer Gradient bis Wasser/Acetonitril 20/80 (Minute 45), isokratisch bis Minute 50, linear bis Wasser/Acetonitril 10/90 (Minute 58); isokratisch bis Minute 58.

9.2.4 Messung von Realproben

Bei der Messung von Realproben muß beachtet werden, daß ein Großteil der Microcystine zellulär gebunden ist. Der Anteil an zellulär gebundenem Toxin kann 1000fach höher sein, als der Anteil des freien Microcystins, wie ELISA-Messungen von Wasserproben und Algenextrakten ergaben. Da der vorläufige, von der WHO vorgeschlagene Grenzwert für Microcystin-LR einen Summenwert von freiem und zellulärem Microcystin darstellt, müssen in einem Probenvorbereitungsschritt zunächst die Cyanobakterienzellen lysiert werden. Die Bedingungen der Zell-Lyse sollten mit den angewendeten analytischen Verfahren (Chromatographie und Massenspektrometrie) kompatibel sein, weiterhin die vollständige Freisetzung der Microcystine gewährleisten und für große Anreicherungsvolumina geeignet sein. Da Cyanobakterien gramnegativ sind und eine spezielle Zellmembran besitzen, ist eine enzymatische Lyse sehr schwierig. Übliche Aufschlußverfahren wie Extraktion mit organischen Lösungsmitteln können nur bei trockenen Algenproben oder Proben mit geringem wäßrigem Anteil verwendet werden und sind deshalb nicht geeignet für die hier vorgestellte Methode. Physikalische Methoden der Zell-Lyse, wie z. B. die Behandlung mit Ultraschall, Erhitzen, Mikrowellen- oder Hochdruckaufschluß sind prinzipiell möglich. Bisherige Versuche, Cyanobakterien mit Ultraschall oder durch Kochen zu lysieren, lieferten jedoch geringere Ausbeuten als die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln.

Aus oben genannten Gründen wurde zur Überprüfung, ob sich mit der oben genannten Methode Microcystine in Realproben nachweisen lassen, ein methanolisches Algenextrakt 1:100 000 mit Wasser (+ 0.1 % TFA) verdünnt und mittels SPE-HPLC-MS nachgewiesen. Der chromatographische Lauf ist in Abb. 100 zu sehen.

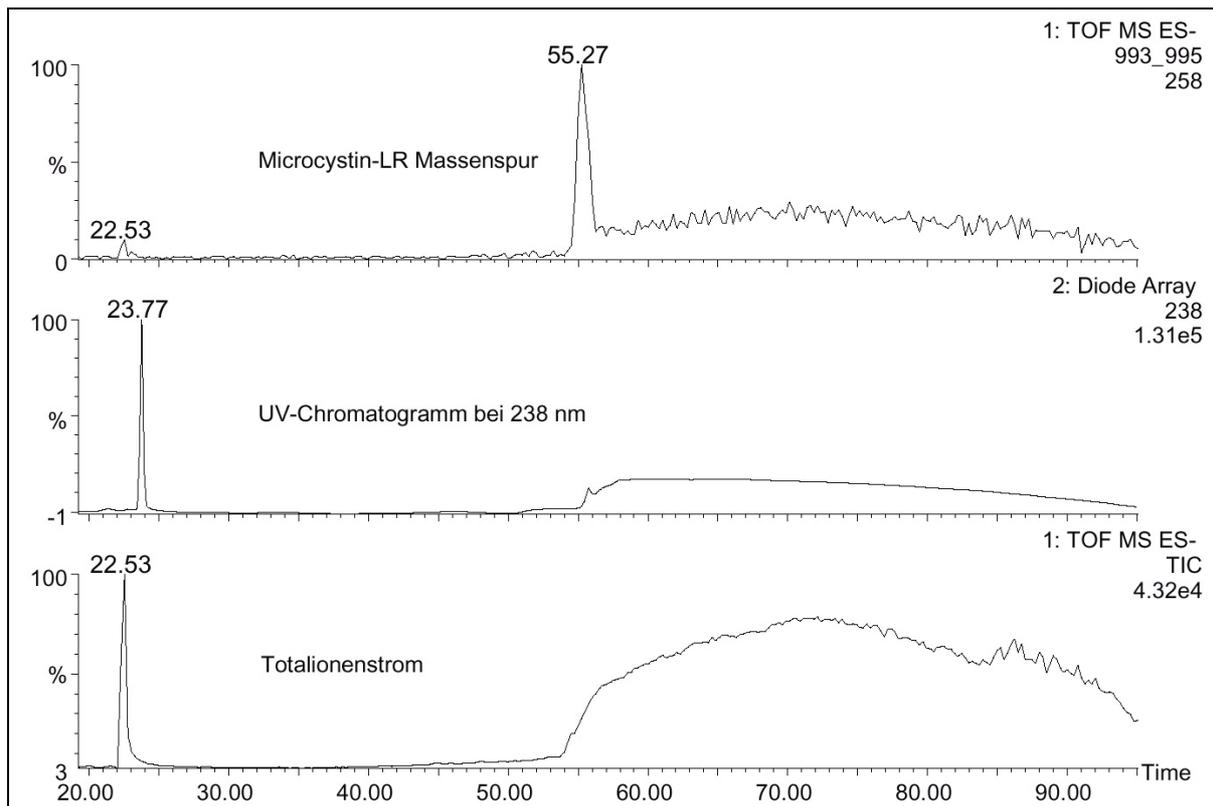


Abb. 100: On-line-SPE-HPLC-MS-UV-Lauf eines verdünnten, methanolischen Algenextraktes.

Verdünnung 1:100 000 in Wasser + 0.1 % TFA, angereichert wurden 255 mL; Bedingungen s. Abb. 99. Durch die Anreicherung einer größeren Volumens verschiebt sich der Transferschritt von der Kartusche auf die analytische Säule und dadurch die Elution der Microcystine nach hinten (Anreicherungs- und Spülschritt: Minute 0-20)

Abb. 100 zeigt, daß im Totalionenstrom und im UV-Spektrum keine eindeutigen Microcystin-Peaks zu erkennen sind. Werden jedoch die Massenspuren der Microcystine angezeigt, so ist ein deutlicher Peak bei der Masse von Microcystin-LR zu erkennen. Das Massenspektrum (Abb. 101) der Retentionszeit von Microcystin-LR zeigt, daß auch Microcystin-YR (1043 [M-H]⁻) in der Wasserprobe vom Bergknappweiher (Landkreis Weilheim, Bayern) vorhanden ist.

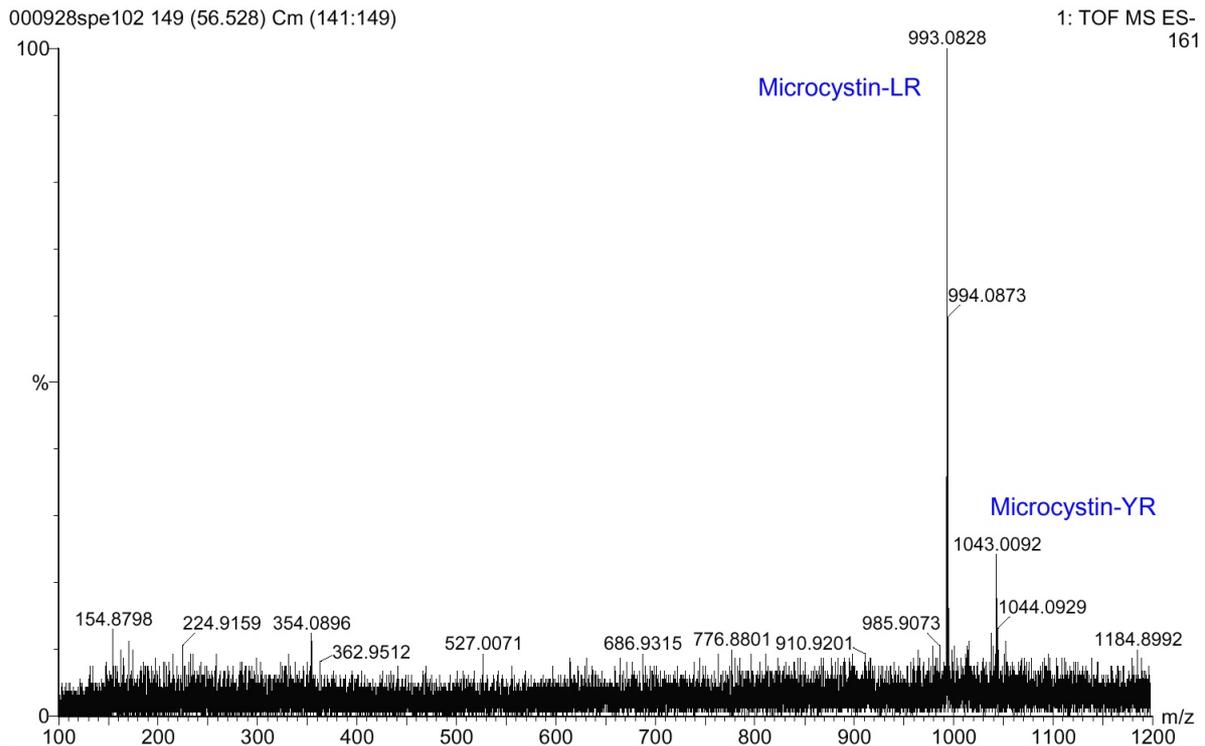


Abb. 101: Massenspektrum einer Wasserprobe vom Bergknappweiher (Landkreis Weilheim, Bayern) bei der Retentionszeit 55-57 Minuten (s. Abb. 100).

9.3 Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

Eine Apparatur zur on-line-Anreicherung und Festphasenextraktion von Microcystinen mit anschließender Detektion im Massenspektrometer wurde aufgebaut. Die Auswahl geeigneter Festphasenmaterialien ergab, daß ein Copolymer (OASIS[®] HLB) mit Partikeldurchmessern von 30 µm zur Anreicherung von großen Volumina von microcystinhaltigen Wasserproben geeignet ist. Da die Substanzklasse der Microcystine einen weiten Polaritätsbereich abdeckt, ist es schwierig, gemeinsame Bedingungen für alle Microcystine zur on-line-Festphasenextraktion-HPLC zu finden. Der Einsatz einer Immunaффinitätsanreicherung kann hier zu einer wesentlichen Verbesserung führen, da die Microcystine in diesem Fall nicht aufgrund ihrer Polarität, sondern aufgrund der selektiven Wechselwirkung mit Antikörperbindungsstellen gebunden werden. Breitbandantikörper, wie der in Kapitel 4 beschriebene monoklonale Adda-Antikörper, eignen sich besonders gut für diese Anwendung, da sie zwischen den Microcystinen nicht diskriminieren.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß der Trifluoressigsäuregehalt in der Probe und im Laufmittel die Retention von Microcystinen an hydrophoben Festphasen wesentlich beeinflusst. Die Wahl einer geeigneten TFA-Konzentrationen ermöglicht den Transferschritt von der Anreicherungskartusche auf die analytische Säule.

Mit der optimierten Methode konnten Microcystine in einer bayerischen Wasserprobe nachgewiesen werden. Die Zell-Lyse der Cyanobakterien in großen Volumina bleibt allerdings bisher ein kritischer Punkt bei der Anwendung der on-line-SPE-HPLC-MS.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Thema der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von schnellen und empfindlichen Methoden zur Detektion von cyanobakteriellen Hepatotoxinen (Microcystinen und Nodularinen). Zunächst erfolgte eine systematische Untersuchung bereits bestehender Methoden, der chromatographischen Trennung mit UV-Detektion und des immunanalytischen Nachweises mit einem monoklonalen Antikörper. Danach folgte die Herstellung zweier eigener monoklonaler Antikörper, die Etablierung von Immunoassays, die Entwicklung einer HPLC-ELISA-Kopplung, die Untersuchung der massenspektrometrischen Detektion und die Entwicklung einer on-line-SPE-HPLC-MS-Methode.

Die Untersuchung der UV-Absorptionspektren von zehn Microcystinen, einem Nodularin und Adda zeigte, daß sich die Absorption bei 238 nm sehr gut für die Quantifizierung eignet. Es kann davon ausgegangen werden, daß alle Microcystine bei dieser Wellenlänge ungefähr denselben molaren Extinktionskoeffizienten besitzen. Einzig bei Microcystinen, die Tryptophan enthalten, weicht der Extinktionskoeffizient um $> 5\%$ ab. Dies Ergebnis ist insofern wichtig, als die zur Verfügung stehenden Mengen der Microcystine oft nicht ausreichen, um die Konzentration von Stammlösungen durch Einwaage exakt einzustellen. Dies kann durch Messung der Absorption erfolgen. Weiterhin kann die Messung der Absorption bei 238 nm für die Bestimmung eines Summenwertes der Microcystine einer Probe dienen, wenn sichergestellt ist, daß keine anderen Inhaltsstoffe bei dieser Wellenlängen absorbieren. Unbekannte Microcystine können nach HPLC-Trennung mit UV-Detektion quantifiziert werden.

Bei der Untersuchung des Ionenpaarreagenzes Trifluoressigsäure (TFA) als Laufmitteladditiv für die chromatographische Trennung der Microcystine wurde festgestellt, daß die Wellenlänge 238 nm wenig vorteilhaft für die Verwendung von Wasser/Acetonitril-Gradienten mit TFA ist. Dies liegt daran, daß TFA in protonierter und deprotonierter Form unterschiedliche Absorptionsspektren besitzt. Durch Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von TFA in der wäßrigen und organischen Phase kann jedoch die Basisliniendrift weitgehend korrigiert werden. Zudem zeigt Umkehrphasen-Chromatographie mit TFA die beste Trennung der Microcystine und die schmalsten Peaks. Es konnte gezeigt werden, daß der TFA-Gehalt die Selektivität der Trennung von Microcystinen beeinflusst.

Der Vergleich einer hydrophoben C_{18} -Silica-Festphase und einer hydrophileren Amid- C_{16} -Silica-Festphase für die Trennung von Microcystinen zeigte, daß die hydrophilere Festphase das Peakpaar Adda/Microcystin-LR wesentlich besser trennen konnte. Das Peakpaar der hydrophoben Microcystine -LW und -LF wurde hingegen schlechter getrennt. Die Wahl der Festphase muß sich folglich nach der analytischen Fragestellung richten. Bemerkenswert ist, daß das Retentionsverhalten der Microcystine bei Umkehrphasen-Chromatographie wesentlich von der hydrophoben Aminosäure Adda geprägt wird. Ist eine der beiden variablen Aminosäuren der Microcystine hydrophil, so eluiert dieses Microcystin mit ähnlicher Retentionszeit wie Adda.

Für die Etablierung eines direkten, kompetitiven Immunoassays mit dem bereits existierenden monoklonalen Antikörper M8H5 erfolgte zunächst die Synthese eines Enzymtracers. Dazu

wurde eine ungewöhnliche Kopplungsschemie eingesetzt. Es wurde nicht eine Amidbindung zwischen Microcystin-LR und dem Enzym geknüpft, sondern die Kopplung erfolgte über eine MICHAEL-analoge Reaktion zwischen einem Thiol des Proteins und der vinylogenen Carbonylgruppe des Microcystins. Diese Kopplung hat den Vorteil, daß der Ladungszustand des Microcystins erhalten bleibt. Sie wurde später auch zu der Synthese von Immunkonjugaten zur Herstellung von Microcystin-Antikörpern eingesetzt. Der direkte kompetitive ELISA mit Antikörper M8H5 bestätigte eine allgemein gültige Regel der ELISA-Entwicklung: In optimierter Form wurde ein identischer Testmittelpunkt und eine identische Nachweisstärke für Microcystin-LR im direkten und im indirekten (publizierten) Format erhalten. Überraschend war jedoch, daß sich die Kreuzreaktionen einiger Microcystine im direkten und indirekten Format wesentlich unterschieden. Im Gegensatz zum indirekten Format zeigt der direkte ELISA eine breite Erkennung aller getesteten Microcystine. Eine theoretische Begründung dieses Befunds konnte bisher nicht erfolgen. Modellansätze zeigen jedoch, daß unterschiedliche Kreuzreaktionen in den beiden Testformaten prinzipiell möglich sind und von relativ vielen Parametern beeinflusst werden. Die Untersuchung von Matrixeinflüssen, wie z. B. extreme pH-Werte, Huminsäuren, Salzgehalt und organische Lösungsmittel, ergab, daß die Stabilität des Enzymtracers und weniger des Antikörpers limitierend für die Testdurchführung ist. Dies kann u. a. daran liegen, daß im direkten ELISA der Enzymtracer homogen mit der Probe vermischt wird und dadurch Matrixeinflüssen stärker ausgesetzt ist, als der Antikörper. Matrixeinflüsse können jedoch durch Verdünnen der Probe mit Blockingpuffern weitgehend eliminiert werden. Insgesamt eignet sich dieser Test gut zum empfindlichen Nachweis aller Microcystine. Es werden jedoch Microcystin-Fragmente, wie z. B. Adda, nicht erfaßt.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Herstellung eigener monoklonaler Antikörper mit möglichst unterschiedlichen Selektivitäten. Hierzu wurde einerseits ein Microcystin-LR-Proteinkonjugat und andererseits ein Adda-Proteinkonjugat immunisiert. Das Microcystin-LR-Proteinkonjugat sollte für die Generierung eines hochempfindlichen Antikörpers gegen Microcystin-LR dienen. Die Kopplungsschemie war identisch derjenigen zur Synthese des oben beschriebenen Enzymtracers. In der Haptenstruktur befand sich die positiv geladene Argininseitenkette gegenüber der Kopplungsstelle zum Protein. Es wurde folglich erwartet, daß die positive Ladung des Arginins gut erkannt wird und die Affinität des Antikörpers steigert. Tatsächlich wurde mit dieser Struktur ein Antikörper (MC10E7) mit der bisher höchsten Affinität zu Microcystinen (mindestens $(7 \pm 2) \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$) erhalten. Überraschend war allerdings die extreme Selektivität, mit der der Antikörper zwischen argininhaltigen und nichtargininhaltigen Microcystinen unterscheidet. Microcystine ohne Arginin werden praktisch nicht erkannt. Insgesamt eignet sich dieser Antikörper zum hochempfindlichen Nachweis von [4-Arginin]Microcystinen.

Durch die Immunisierung des Adda-Proteinkonjugats wurde der gewünschte Breitbandantikörper erhalten. Adda wurde dazu im Immunkonjugat dahingehend modifiziert, der peptidischen Struktur im Microcystin möglichst ähnlich zu sein. Sowohl die Carboxylgruppe als auch die Aminogruppe wurden in Amide überführt. Daß die Modifizierung notwendig war, zeigen die Kreuzreaktionen des erhaltenen Antikörpers (AD4G2): Die freie Adda-Aminosäure wird viermal schlechter erkannt, als diejenige mit peptidischer Struktur. Die

Affinität des Antikörpers AD4G2 ist etwas niedriger als diejenige des Antikörpers MC10E7, was auf die kleinere Haptenstruktur und das Fehlen von ionischen Gruppen zurückgeführt werden kann. Dieser Antikörper eignet sich jedoch sehr gut zum empfindlichen Nachweis aller Microcystine und Microcystin-Fragmente.

Der Immunisierungsverlauf zur Herstellung beider Antikörper zeigt einige Gemeinsamkeiten, die eventuell verallgemeinert werden können. Beide Immunisierungen wurden mit unlöslichen Hapten-Proteinkonjugaten gestartet. In beiden Fällen war der erhaltene Antikörpertiter im Blut sehr niedrig, eine Affinitätsreifung wurde allerdings beobachtet. Der Versuch, aus einer Maus mit geringem Antikörpertiter antikörperproduzierende Zellen zu isolieren, scheiterte jedoch. Daher kann angenommen werden, daß nur Mäuse mit hohem Titer selektiver Antikörper für eine Fusion geeignet sind. Eine drastische Erhöhung des Antikörpertiters wurde bei beiden Immunisierungen durch Verabreichung löslicher Immunkonjugate erreicht. Hierbei kam es zu einer weiteren Affinitätsreifung. Die Immunisierung von zunächst unlöslichem und dann löslichem Immunkonjugat ist folglich zur Herstellung monoklonaler Antikörper geeignet. Auch ein Wechsel des Trägerproteins ist dabei möglich.

Die optimierten Immunoassays wurden gemeinsam mit einem Proteinphosphatase-Inhibitionsassay zur parallelen Detektion einer HPLC-Trennung von Microcystinstandards bzw. Realproben eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, daß die Kopplung dieser beiden Methoden eine leistungsstarke Analytik der Microcystine erlaubt. Microcystine können empfindlich nachgewiesen und einzeln quantifiziert werden. Durch Verwendung mehrerer biologischer Rezeptorassays mit unterschiedlichen Selektivitäten kann eine Zuordnung der Microcystine zu einzelnen Untergruppen (z. B. argininhaltig oder nicht) erfolgen.

Die massenspektrometrische Detektion der Microcystine im Elektrospray-Flugzeit-Massenanalysator ist prinzipiell ohne vorherige Trennung der Microcystine empfindlich möglich. Dies liegt daran, daß der Flugzeit-Massenanalysator einen weiten Massenbereich ohne (Scannen) abdecken kann. Ein Problem bei der direkten massenspektrometrischen Analyse stellen Salz-Adduktionen dar. Salzionen können sowohl aus der Probe als auch aus dem Lösungsmittel stammen. Speziell wenn Ameisensäure dem Laufmittel zugesetzt wird, werden häufig Salzaddukte gefunden. Diese erschweren eine Zuordnung und Quantifizierung der Microcystine.

Obzwar das verwendete Massenspektrometer keine Stoßzelle besitzt, können Microcystine fragmentiert werden. Charakteristische Fragmentationen für Microcystine werden bereits bei sehr niedrigen Fragmentorspannungen und auch bei sehr niedrigen Konzentrationen erhalten. Sie können zur Identifizierung von Massenpeaks als Microcystinpeaks dienen. Im positiven Ionenmodus ist Ion 135, das Produkt der α -Spaltung der Adda-Seitenkette, ein charakteristisches Fragment. Im negativen Modus kann Ion 128 (Glutaminsäure oder Methylasparaginsäure) als solches betrachtet werden. Für eine komplette Strukturaufklärung mittels Massenspektrometrie werden Konzentrationen von 10 mg/L Microcystin und hohe Fragmentorspannungen benötigt. Allgemein ist das Fehlen von Fragmenten im höhermolekularen Massenbereich der Fragmentspektren auffällig. Di- und Tripeptide treten weit häufiger auf, als die linearisierten Hexa- oder Pentapeptide. Dies erschwert die Strukturaufklärung.

Die Entwicklung einer Methode zur on-line-SPE-HPLC-MS ermöglicht die Analyse von potentiell toxischen Wasserproben mit möglichst geringem manuellem Eingriff. Die Probenvorbereitung beschränkt sich auf die Freisetzung der Microcystine aus den Cyanobakterienzellen, das Filtrieren und Ansäuern der Probe. Die Freisetzung der Microcystine aus den Zellen sollte dabei möglichst mit physikalischen Methoden geschehen. Ein Hochdruck-Aufschlußverfahren scheint bisher am besten dafür geeignet. Als Material für die Anreicherung war bisher das Copolymer OASIS HLB am besten geeignet. Vorteilhaft sind hier die vereinfachten Schritte zur Äquilibrierung des Materials und der geringe Rückdruck, der eine Anreicherung großer Probenvolumina in kurzer Zeit erlaubt. Bei der on-line-Kopplung von SPE mit HPLC, die beide auf ähnlichen Trennmechanismen (Umkehrphasen-Chromatographie) beruhen, erwies sich TFA als sehr hilfreich. Durch die Zugabe von TFA lies sich die Polarität der Microcystine gut steuern. War TFA im Laufmittel, so retardieren die Microcystine auf der hydrophoben Festphase, fehlte TFA, so wurden sie eluiert. Da die verwendete analytische Trennsäule etwas hydrophober war als die Anreicherungskartusche, konnten beide Methoden on-line gekoppelt werden. Die Trennung auf der analytischen Säule erfolgte ohne Säurezusatz, wodurch die beste Empfindlichkeit im Massenspektrometer erhalten wurde. Gleichzeitig wurden Salz-Adduktionen unterdrückt. Für sehr hydrophobe Microcystine (-LF und -LW) ist diese Methode allerdings nur eingeschränkt geeignet. Die Polarität dieser Microcystine scheint sich durch TFA weniger gut steuern zu lassen. Die Anwendung der Methode für die Anreicherung hydrophiler Microcystine in Realproben konnte gezeigt werden.

V. AUSBLICK

Die weltweite Zunahme cyanobakterieller Massenentwicklungen macht eine kontinuierliche, flächendeckende Überwachung der Gewässer immer notwendiger. Billige, nachweisstarke und schnelle Verfahren sind hierfür notwendig. Immunoassays, wie die in dieser Arbeit entwickelten, können diese Kriterien erfüllen. Einer der entwickelten Antikörper (MC10E7) ist bereits kommerziell erhältlich. Der zweite Antikörper AD4G2 wird ebenfalls allgemein zugänglich gemacht. Durch gut dokumentierte Datenblätter soll die Einführung dieser analytischen Methode in Wasserüberwachungsbehörden gefördert werden. Erste Interessenten haben bereits mit der Etablierung der Methode begonnen. Es zeigt sich jedoch, daß nur in wenigen dieser Laboratorien Erfahrung mit Immunoassays existiert. Eine bessere Schulung des Personals und eine bessere Laborausstattung würden Immunoassays zu mehr Akzeptanz verhelfen.

Als besonders aussichtsreiche analytische Methode kann die HPLC-ELISA-Kopplung durch weitere Optimierung sowohl im Bereich der Umweltanalytik als auch in der pharmazeutischen Forschung sicherlich an Bedeutung gewinnen. Die on-line-Kopplung und die Kopplung mit anderen Trennverfahren, wie z. B. der Kapillarelektrophorese, sind Beispiele, in welche Richtungen eine Weiterentwicklung möglich wäre.

Im Bereich der Festphasenextraktion erscheinen die bisher verwendeten Methoden der Anreicherung und Aufreinigung auf der Basis der Polarität der Microcystine problematisch, da Microcystine einen sehr breiten Polaritätsbereich abdecken. Microcystin-selektive Verfahren, wie z. B. die Immunaффinitätsanreicherung unter Verwendung von Breitbandantikörpern scheinen hier die bessere Lösung.

Für die Entwicklung eines on-line-Sensors muß das Problem der kontinuierlichen Microcystinextraktion aus Cyanobakterienzellen gelöst werden. Hier kann ein Hochdruckaufschluß eine Lösung darstellen. Da Cyanobakterien in den Gewässern sehr inhomogen verteilt sind, müßte im Vorfeld untersucht werden, welcher Ort repräsentativ für die Probenahme ist. Möglicherweise wäre ein mobiler Sensor, der auf Informationen von außen (z. B. von Satelliten) reagieren kann und die Probenahme auch aus unterschiedlichen Tiefen durchführen kann, ein geeignetes Instrument der Gewässerüberwachung.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, besitzen massenspektrometrische Methoden ein großes Potential für die Untersuchung von microcystinhaltigen Proben. Um mittels Massenspektrometrie zu quantifizieren, muß allerdings das Problem des Auftretens der Natrium-Adduktionen gelöst werden. Eine vorhergehende chromatographische Reinigung kann hier teilweise Abhilfe bieten. Wird Ameisensäure als Laufmittelzusatz in der HPLC verwendet, so könnte eine in die Niederdruckseite des HPLC-Systems integrierte Ionenaustausch-Kartusche helfen.

VI. EXPERIMENTELLER TEIL

1 Verwendete Geräte

Anreicherungskartusche für Prospekt OASIS[®] HLB, 10 mm x 2 mm, 30 µm Partikelgröße (186000258, Waters, Eschborn)

Anreicherungskartusche für Prospekt HySphere-C8, 10 mm x 2 mm, 8 µm Partikelgröße (0794.607, Spark Holland, Emmen, Niederlande)

Anreicherungskartusche für Prospekt HySphere-CN, 10 mm x 2 mm, 8 µm Partikelgröße (0794.606, Spark Holland, Emmen, Niederlande)

Anreicherungskartusche LiChrospher RP-C8 ADS, 25 mm x 4 mm, 25 µm Partikelgröße, 60 Å Porendurchmesser (1.50207, Merck, Darmstadt)

ChromStar, HPLC-Datenverarbeitungssoftware (SCPA Stuhr)

Elektrospray-Flugzeit-Massenspektrometer LCT (Micromass, Manchester, GB)

Fraktionensammler (2128, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

Gefriertrocknungsanlage Lyovac GT 2 (Finn-Aqua, Hürth)

Gelchromatographie-Säulen PD-10, Sephadex G-25M (Amersham Pharmacia, Freiburg)

Glasfaserrundfilter No. 8, Ø 125 mm (Schleicher & Schuell, Dassel)

Glassäulen (3 mL Füllvolumen, LiChrolut, Merck, Darmstadt)

HPLC-Pumpe (L-6200A Intelligent Pump, Merck, Darmstadt)

HPLC-System (2690, Waters, Eschborn)

HPLC-Pumpe, 50 mL Pumpenkopf (K-120, Knauer, Berlin)

Hydrolyse Röhrchen (Vacmun Hydrolysis Tubes) (Perbio, Rockford, IL, USA)

8-Kanal-Photometer (Reader) für Mikrotiterplatten (TR 400, SLT, Overath)

8-Kanalpipette 20-200 µL (Transferpette, Brand, Wertheim)

8-Kanalpipette 50-200 µL (S8/200, Dynatech, Denkendorf)

8-Kanalpipette 5-50 µL (Transferpette, Brand, Wertheim)

8-Kanal-Waschgerät (Washer) für Mikrotiterplatten (EAS 2/4, SLT, Overath)

Mikrotiterplatten, Flachboden, hohe Bindungskapazität (655061, Greiner, Nürtingen)

Micro Splitter Valve, Flußteiler (P-451, Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA, USA)

Multipette (4780, Eppendorf, Hamburg)

Objektträger für die Mikroskopie, Kalk-Natron-Glas, 76 x 26 mm (H 872, Roth, Karlsruhe)

On-line-Entgaser (3415α, ERC, Alteglofsheim)

Origin 6.0, Datenverarbeitungssoftware (Microcal Software Inc., Northampton, USA)

Schüttler für Mikrotiterplatten Easyshaker (EAS2/4, SLT, Overath)

Parafilm M, 4 x 250 ft. (American National Can, Greenwich, USA)

Prospekt (Spark Holland, Emmen, Niederlande)

Schaltventil, 6-Kanal (PR100-106-03, Rheodyne, Bensheim)

Silica C18 Bakerbond, Säulenmaterial (7025-00, Baker, Deventer, Niederlande)

Spritzenpumpe Model 11 (Harvard Apparatus, Hollistone, MA, USA)

Trennsäule, LiChroCART[®] 100, RP18, 250 mm x 4 mm, 5 µm (1.50833, Merck, Darmstadt)

Trennsäule, Discovery RP Amid-C16, 250 mm x 4 mm, 5 µm (505064, Supelco, Bellefonte, USA)

Trennsäule, Discovery RP Amid-C16, 150 mm x 2.1 mm, 5 µm (505013-21, Supelco, Bellefonte, USA)
Trennsäule, SupelcosilTM18, 250 mm x 10 mm, 5 µm (5-8368, Supelco, Bellefonte, USA)
Toyopearl HW-50F, Säulenmaterial (Tosohaas, Stuttgart)
UV-VIS-Detektor (L-4250, Merck, Darmstadt)
UV-VIS-Detektor, Photodiodenarray (996, Waters, Eschborn)
UV-VIS-Spektrometer DU 659 (Beckmann Instruments, Fullerton, USA)
Zentrifuge Biofuge 17RS (Heraeus Sepatech, Osterode)
Zentrifuge Biofuge 28RS (Heraeus Sepatech, Osterode)

2 Chemikalien und Reagenzien

2.1 Verwendete Chemikalien

Acetonitril, gradient grade f. d. Chrom. (1.00030, Merck, Darmstadt)
Acetonitril, puriss. absolut (00709, Fluka, Neu-Ulm)
Albumin aus Eiern, grade V, > 98% (A5503, Sigma, Deisenhofen)
Albumin aus Rinderserum Fr. V 99 % (A3059, Sigma, Taufkirchen)
Ameisensäure 50%ig, HPLC grade (09676, Fluka, Neu-Ulm)
Ammoniumcarbamat, p. a. (1.01134, Merck, Darmstadt)
Borat-Salzsäure-Puffer, pH 8.0, (50082829, Merck, Darmstadt)
Bortrifluorid-Ethyletherat (15791, Fluka, Neu-Ulm)
Bortrifluorid-Methanolat, puriss, 10%ig (15716, Fluka, Neu-Ulm)
Brij[®]78 (16008, Fluka, Buchs, Schweiz)
Carboxypeptidase Y aus Hefe, 12 U/mg (21945, Fluka, Neu-Ulm)
Casein aus Kuhmilch, gereinigt (C5890, Sigma, Deisenhofen)
Cäsiumiodid, puriss. (21004, Fluka, Neu-Ulm)
Citrat-Natronlauge-Puffer, pH 5.0, (50048478, Merck, Darmstadt)
Citrat-Salzsäure-Puffer, pH 4.0, (60113046, Merck, Darmstadt)
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (36650, Fluka, Neu-Ulm)
Dikaliumhydrogenphosphat, 99 % (04248, Riedel de Haen, Seelze)
Di-(N-succinimicyl)carbonat (43720, Fluka, Neu-Ulm)
5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) Ellman's Reagenz (Sigma, Deisenhofen)
Dithiothreitol (DTT) (D5545, Sigma, Steinheim)
Eisen(III)chlorid-Hexahydrat p.a. (31232, Riedel de Haen, Seelze)
Endoproteinase Arg-C (45173, Fluka, Neu-Ulm)
Essigsäure 100 % (Eisessig) (1.00063, Merck, Darmstadt)
Essigsäure-N-Hydroxysuccinimidester (Sigma, Deisenhofen)
N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC), > 99 % (03449, Fluka, Neu-Ulm)

Ethylendiamin-Dihydrochlorid, > 99 % (03580, Fluka, Neu-Ulm)
Ethylenglycoldimethylether (20,743-2 Aldrich, Steinheim)
Glycin p.a. (1.04201, Merck, Darmstadt)
Huminsäure, Natriumsalz (7824, Roth, Karlsruhe)
4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-ethansulfonsäure (HEPES), (54459, Fluka, Buchs, Schweiz)
Hydroxylamin-Hydrochlorid \geq 99% (55459, Sigma, Deisenhofen)
N-Hydroxysuccinimid, purum (56480, Fluka, Neu-Ulm)
2-Iminothiolan·HCl, TRAUT's Reagenz (26101, Perbio, Rockford, IL, USA)
Kaliumdihydrogencitrat, Microselect (60214, Fluka, Neu-Ulm)
Kaliumdihydrogenphosphat, Microselect, > 99.5 % (60219, Fluka, Neu-Ulm)
Kaliumhydroxid, Plätzchen, p.a. (30603, Sigma, Deisenhofen)
Kaliumsorbat (S1751, Sigma, Deisenhofen)
Keyhole Limpet Hämocyanin, KLH Untereinheiten, Vacmun (Biosyn, Fellbach)
Kronenether, 15-Krone-5, puriss. (28123, Fluka, Neu-Ulm)
Methanol, getrocknet, p.a. (1.06009, Merck, Darmstadt)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (1.05832, Merck, Darmstadt)
Manganchlorid-Tetrahydrat 98.7 % (M9522, Sigma, Steinheim)
2-Morpholinoethansulfonsäure Monohydrat (MES), >99% (69892, Fluka, Neu-Ulm)
Myoglobin aus Pferdeherz (M1882, Sigma, Deisenhofen)
Natriumacetat, wasserfrei, z.A. (32319, Riedel-de-Haen, Seelze)
Natriumazid (S2002, Sigma, Deisenhofen)
Natriumcarbonat, wasserfrei, 99.5 % Suprapur (6395, Merck, Darmstadt)
Natriumchlorid, f. d. Molekularbiol. (1.01540, Merck, Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat, p.a. (6329, Merck, Darmstadt)
Natriumsulfat (6649, Merck, Darmstadt)
Natriumtetraborat, > 99 % (71997, Fluka, Neu-Ulm)
p-Nitrophenylphosphat Di(Tris)Salz (N3254, Sigma, Steinheim)
Oxalsäure-Dihydrat, > 99.5 % (75699, Fluka, Neu-Ulm)
Papain, 19.6 U/mg (76216, Fluka, Neu-Ulm)
Peptid (H-Pro-Thr-Glu-Phe-Phe(NO)₂-Arg-Leu-OH), > 98.5 % (03-30-0025, Novabiochem-Calbiochem, Bad-Soden)
Peroxidase aus Meerrettich (POD), EIAgrade (814393, Roche Diagnostics, Mannheim)
Phenylalanin (78020, Fluka, Neu-Ulm)
Polyethylenglykol-600-Disäure (81324, Fluka, Neu-Ulm)
Polyethylenglykol-1000 (81288, Fluka, Neu-Ulm)
Polypropylenglykol-1200 (81370, Fluka, Neu-Ulm)
Pronase aus *Streptomyces griseus*, 6 U/mg (81748, Fluka, Neu-Ulm)
Proteinase K (124568, Merck, Darmstadt)
Proteinphosphatase 1, catalytic subunit, α -isoform (P-7937, Lot 58H4030, Sigma, Steinheim)
Reinstwasser (Milli Q plus 185, Millipore, Bedford, MA, USA)
Salzsäure, rauchend, 37 % (84422, Fluka, Neu-Ulm)
Subtilisin aus *Bacillus licheniformis*, 11 U/mg (85968, Fluka, Neu-Ulm)
Succinimidyl-Acetylthiopropionat, SATP (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), z.A. (1.08622, Merck, Darmstadt)

Thermolysin aus *Bacillus thermoproteolyticus*, 40 E/mg (90622, Fluka, Neu-Ulm)
Titriplex III (EDTA, Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat, Merck, Darmstadt)
Toluol, z.A., 99.5 % (8325, Merck, Darmstadt)
Triethanolamin (1.08379, Merck, Darmstadt)
Trifluoressigsäure (TFA), HPLC grade (91707, Fluka, Neu-Ulm)
Tris-(2-carboxyethyl)phosphin-Hydrochlorid, TCEP (20490, Perbio, Rockford, IL, USA)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) f. d. Molekularbiol. (93362, Fluka, Neu-Ulm)
2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (37083, Serva, Heidelberg)
Triton[®] N-101 (37220, Serva, Heidelberg)
Trypsin, DPCC behandelt, aus Rinderpankreas, 8300 U/mg (93611, Fluka, Neu-Ulm)
Trypsinogen (R0875, Sigma, Deisenhofen)
L-Tryptophan, > 99.5% (93659, Fluka, Neu-Ulm)
Tween[®] 20, f. d. Molekularbiol. (1.09280, Merck, Darmstadt)
Wasserstoffperoxid, 30 %, reinst (1.08597, Merck, Darmstadt)

2.2 Standardsubstanzen

[D-Asp³, Dhb⁷]Microcystin-RR aus *Planktothrix agardhii* (AnagnosTec, Luckenwalde)
[D-Asp³]Microcystin-HtyR aus *Planktothrix rubescens* (AnagnosTec, Luckenwalde)
[D-Asp³]Microcystin-LR aus *Microcystis aeruginosa* (AnagnosTec, Luckenwalde)
[D-Asp³]Microcystin-RR aus *Planktothrix agardhii* (AnagnosTec, Luckenwalde)
Adda, Dr. D. Cundy und Dr. T. McCarthy (CSIRO Molecular Science, Clayton South, Victoria, Australien)
Microcystin-LA, ≥ 95 % aus *Microcystis aeruginosa* (475813, Calbiochem, Bad Soden)
Microcystin-LF, ≥ 95 % aus *Microcystis aeruginosa* (350-081, Alexis, Läfelfingen, Schweiz)
Microcystin-LR, ≥ 98 % aus *Microcystis aeruginosa* (350-012, Alexis, Läfelfingen, Schweiz)
Microcystin-LW, ≥ 95 % aus *Microcystis aeruginosa* (350-080, Alexis, Läfelfingen, Schweiz)
Microcystin-LY aus asiatischem Cyanobakterienstamm (AnagnosTec, Luckenwalde)
Microcystin-RR, ≥ 97 % aus *Microcystis aeruginosa* (475816, Calbiochem, Bad Soden)
Microcystin-WR aus asiatischer Cyanobakterienprobe (AnagnosTec, Luckenwalde)
Microcystin-YR, ≥ 95 % aus *Microcystis aeruginosa* (475819, Calbiochem, Bad Soden)
Nodularin (Nodularin-R), ≥ 95 % aus *Nodularia spumigena* (488002, Calbiochem, Bad Soden)

2.3 Verzeichnis der Antikörper und Tracer

Antikörper	"Antigen"	Art	Bezugsquelle	Literatur
MC10E7	Microcystin-LR	Maus, mAk, IgG ₁ κ	804-320-C200, Alexis (Läufelfingen, Schweiz)	[318]
M8H5	Microcystin-LR	Maus, mAk, IgG ₁	UENO, Tokyo, Japan	[321]
AD4G2	<i>N</i> -Acetyl-Adda	Maus, mAk, IgG ₁ κ	IWC, München	[331]
anti-Maus-IgG	Maus-IgG, Fc-Fragment	Ziege, pAk	670291, ICN Biochemicals (Costa Mesa, CA, USA)	
anti-Maus-IgG (POD markiert)	Maus-IgG, (H+L)	Pferd, pAk	PI-2000, Vector (Burlingame, CA, USA)	

Abkürzungen: mAk monoklonaler Antikörper; pAk polyklonaler Antikörper.

Enzymtracer: Microcystin-LR-POD, *N*-Acetyl-Adda-POD, diese Arbeit.

2.4 Puffer- und Stammlösungen

Für alle Lösungen wurde UV-behandeltes Reinstwasser verwendet.

Carbonatpuffer (Coating-Puffer, pH 9.6)

1.59 g (15 mmol) Na₂CO₃
 2.93 g (25 mmol) NaHCO₃
 0.20 g (3 mmol) NaN₃
 ad 1000 mL Wasser

Phosphat-Kochsalz-Puffer (PBS, pH 7.6)

1.36 g (10 mmol) KH₂PO₄
 12.20 g (70 mmol) K₂HPO₄
 8.50 g (145 mmol) NaCl
 ad 1000 mL Wasser

Waschpuffer-Konzentrat (PBS-Tween, pH 7.6)

8.17 g (60 mmol) KH_2PO_4
73.16 g (420 mmol) K_2HPO_4
51 g (870 mmol) NaCl
3 g (2 mmol) Sorbinsäure, Kaliumsalz
30 mL Tween[®] 20
ad 1000 mL Wasser

Waschpuffer (PBS, pH 7.6)

30 mL Waschpuffer-Konzentrat
ad 1800 mL Wasser

Substratpuffer (pH 3.8)

49.06 g (200 mmol) KH_2 -Citrat
0.15 g (1 mmol) Sorbinsäure, Kaliumsalz
ad 1000 mL Wasser

TMB-Stammlösung

0.375 g 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)
30 mL DMSO

Wasserstoffperoxidlösung (1%ig)

3 mL 30 % Wasserstoffperoxid
ad 100 mL Wasser

Substratlösung

25 mL Substratpuffer
300 μL TMB-Stammlösung
100 μL Wasserstoffperoxidlösung

Stopplösung

5%ige Schwefelsäure

TRIS/HCl-Pufferkonzentrat für ELISA mit Realproben (Vorlagepuffer, pH 7.4)

12.1 g (0.1 mol) Tris(hydroxymethyl)aminomethan
80 mL HCl (1 mol/L) (pH einstellen)
1 g Rinderserumalbumin (1 %)
1 g EDTA Natriumsalz (1 %)
8.76 g (150 mmol) NaCl
ad 100 mL Wasser

TRIS/HCl-Puffer für ELISA mit Realproben zur Enzymtracerverdünnung (pH 7.4)

TRIS-Pufferkonzentrat 1:10 verdünnt

TRIS/HCl-Puffer für Proteinphosphatase-Inhibitionstest (pH 7.3)

1.5 g (12.5 mmol) Tris(hydroxymethyl)aminomethan

10 mL HCl (1 mol/L) (pH einstellen)

77 mg (0.5 mmol) Dithiothreitol

1.02 g (5 mmol) MgCl₂·6 H₂O

50 mg (0.25 mmol) MnCl₂·4 H₂O

ad 250 mL Wasser

250 mg (1 g/L) BSA kurz vor Gebrauch zugeben

TRIS/HCl-Puffer für Proteinphosphatase-Inhibitionstest (pH 8.1)

1.5 g (12.5 mmol) Tris(hydroxymethyl)aminomethan

7 mL HCl (1 mol/L) (pH einstellen)

38.6 mg (0.25 mmol) DTT

1.02 g (5 mmol) MgCl₂·6 H₂O

10 mg (0.05 mM) MnCl₂·4 H₂O

ad 250 mL Wasser

125 mg (0.5 g/l) BSA kurz vor Gebrauch zugeben

3 Vorschriften zur Immunisierung und Herstellung von monoklonalen Antikörpern

3.1 Herstellung des monoklonalen MC10E7-Antikörpers

3.1.1 Immunisierung

Die Immunisierung und Generierung von Hybridomzellen wurde von der Firma NanoTools (Teningen) durchgeführt. Drei Mäuse der Rasse NMRI und vier Mäuse der Rasse BNR wurden intraperitoneal mit je 5 µg Immunogen (Microcystin-LR-cOvalbumin) immunisiert. Die Primärimmunisierung erfolgte mit komplettem FREUNDSchen Adjuvans, alle weiteren Immunisierungen mit unkomplettem FREUNDSchen Adjuvans vier Mal im Abstand von fünf Wochen. Für die ersten beiden Immunisierungen wurde das unlösliche Immunkonjugat verwendet und für alle weitere das lösliche. Die Blutentnahme erfolgte jeweils vier Wochen nach den ersten beiden Immunisierungen und eine Woche nach der dritten Immunisierung.

3.1.2 Fusion und Reklonierung

Nach der dritten Immunisierung war eine der drei NMRI-Mäuse positiv. Die Maus wurde intraperitoneal mit 50 µg löslichem Immunogen ohne Adjuvans immunisiert. Vier Tage später wurde die Milz entnommen und eine Zellsuspension durch Pressen der Milz durch ein Zellsieb hergestellt. Nach dem Waschen der Zellen wurde die Hälfte des Ansatzes mit Myelomzellen mit Hilfe von Polyethylenglykol (PEG1500) fusioniert. Die andere Hälfte wurde kryokonserviert und eine Woche später fusioniert. Die Zellsuspension wurde auf 16 96-er Platten ausplattiert und mit Selektionsmedium HAT (Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin) behandelt. Der Zellkulturüberstand wurde mittels direktem ELISA auf Antikörper getestet, die den Microcystin-LR-Enzymtracer binden. Der positive Zellklon wurde 2mal rekloniert und die Zellkulturüberstände mit demselben Test gescreent. Die Zuordnung der monoklonalen Antikörper zu Immunglobulinsubklassen erfolgte mit dem Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (IsoStrip) von Roche Diagnostics (Mannheim).

3.1.3 Screening der Zellkulturüberstände

Die Zellkulturüberstände der primären Hybridomzellen und der reklonierten Zellen wurden mittels direktem nichtkompetitivem ELISA getestet. Die Mikrotiterplatten (MTP) wurden dazu über Nacht bei Raumtemperatur (RT) mit anti-Maus-IgG (Verdünnung 1:3 000 in Coating-Puffer, 250 µL pro Kavität) unter Schütteln inkubiert. Nach einem Waschschrift (dreimaliges Waschen der MTP mit Waschpuffer) wurden die Zellkulturüberstände (Verdünnung 1:40 in PBS, 200 µL pro Kavität) 2 h bei RT inkubiert. Als positive Kontrolle diente das polyklonale Serum der Maus vor der Fusion (Verdünnung 1:600 in PBS). Nach einem

weiteren Waschschrift wurde Microcystin-LR-Enzymtracer (Verdünnung 1:4 000 in PBS, 200 μL pro Kavität) eine Stunde inkubiert. Die MTPs wurden gewaschen und 200 μL pro Kavität einer frisch angesetzten Substratlösung wurden zugegeben. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 100 μL pro Kavität der Stopplösung beendet und die Platten wurden bei 450 nm ausgelesen.

3.2 Herstellung des monoklonalen AD4G2-Antikörpers

3.2.1 Immunisierung

Die Immunisierung und Generierung von Hybridomzellen wurde von der Firma Connex (Martinsried) durchgeführt. Drei Mäuse der Rasse Balb/cxC57 (6-12 Wochen alt) wurden mit je 7.5 μg unlöslichem *N*-Acetyl-Adda-KLH intraperitoneal immunisiert. Dazu wurde das Konjugat zu einem feinen Pulver gemörsert und zunächst mit komplettem FREUNDSchen Adjuvans, danach mit inkomplettem FREUNDSchen Adjuvans vermischt und verabreicht. Die Nachimmunisierungen erfolgten im Abstand von fünf Wochen, wobei jeweils acht bis zehn Tage nach der Immunisierung Blut zur Kontrolle der Immunantwort abgenommen wurde. Ab der vierten Immunisierung erfolgten alle Immunisierungen mit je 7.5 μg löslichem *N*-Acetyl-Adda-BSA. Die Seren der Blutungen wurden zunächst mit einem indirekten kompetitiven ELISA getestet und ab der zweiten Immunisierung mit dem direkten kompetitiven ELISA getestet.

3.2.2 Fusion und Reklonierung

Um Hybridomzellen zu erzeugen, wurde Maus 218 durch dreimalige Immunisierung an aufeinanderfolgenden Tagen mit je 15 μg löslichem *N*-Acetyl-Adda-BSA ohne FREUNDSches Adjuvans auf die Fusion vorbereitet. Zwei Tage nach der letzten Immunisierung wurde die Milz entnommen, die Milzzellen mit Myelomzellen (P3x63-Ag8.653) fusioniert und in HAT- (Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin) Medium selektioniert. Die Zellsuspension wurde in Zellkulturplatten (96 Kavitäten) in einer statistischen Verdünnung von 50 000 Zellen pro Kavität ausgesät. Die Zellkulturüberstände wurden mittels direktem nicht-kompetitiven ELISA auf Antikörper getestet, die den *N*-Acetyl-Adda-Enzymtracer binden. Die positiven Hybridomzellen wurden 3mal rekloniert, wobei zunächst eine Zelldichte von 10 Zellen pro Kavität ausgesät wurde und danach jeweils 1 Zelle pro Kavität (statistisch).

3.2.3 Indirekter kompetitiver ELISA zum Testen der Seren von N-Acetyl-Adda-KLH-immunisierten Mäusen

Die Kavitäten einer Mikrotiterplatte wurden mit *N*-Acetyl-Adda-BSA (70 µg/L in Coatingpuffer, 200 µL pro Kavität) für 6 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden freie Oberflächenplätze mit Casein (1 % m/v in PBS, gekocht, filtriert, 250 µL pro Kavität) durch Inkubation für 30 Minuten geblockt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden Adda bzw. Microcystinstandards (100 µL pro Kavität) und die Seren der Blutungen (Verdünnung 1:5 000 in PBS, 100 µL pro Kavität) zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Der Sekundäantikörper (anti-Maus-POD, Verdünnung 1:50 000 in PBS, 200 µL pro Kavität) wurde nach einem weiteren Waschschrift zugegeben und 1 h inkubiert. Die Signalentwicklung erfolgte wie bereits beschrieben.

3.2.4 Screening der Zellkulturüberstände

Das Screening der Zellkulturüberstände erfolgte wie für Antikörper MC10E7 beschrieben. Der *N*-Acetyl-Adda-Enzymtracer wurde in einer Verdünnung von 1:10 000 eingesetzt.

4 Standardprozeduren

Alle ELISAs wurden in farblosen Mikrotiterplatten (MTP) mit 96 Kavitäten (8x12) durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben, erfolgten alle Inkubationsschritte bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Die Mikrotiterplatten wurden dazu mit Parafilm abgedeckt, um Verdunstung und Austrocknung zu verhindern. Zur Bestimmung der Kreuzreaktion wurde auf jeder Platte neben der Verdünnungsreihe des Kreuzreaktanden auch die von Microcystin-LR mitgeführt.

4.1 Ansetzen von Analytstandards

Stammlösungen der Microcystine werden in Methanol oder Ethanol in Konzentrationen von ungefähr 1 g/L angesetzt. Die alkoholische Stammlösung wird mit Reinstwasser auf eine Konzentration von ungefähr 10 mg/L vorverdünnt und im UV-Spektrometer vermessen. Da die zur Verfügung stehenden Mengen der Microcystine für eine Einwaage nicht oft ausreichen, wird die Konzentration durch Messung der UV-Absorption bei 238 nm ($\epsilon = 39\,800\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ Microcystin-LR [105]) bestimmt. Dieser Extinktionskoeffizient wird für alle Microcystine angenommen. Für die Herstellung des konzentriertesten Standards (1 mg/L)

wird die wäßrige Stammlösung mit Reinstwasser weiter verdünnt. Der Konzentrationsbereich der Standards wird so gewählt, daß vier Konzentrationen oberhalb des Testmittelpunktes und drei unterhalb zur Verfügung stehen. Außerdem wird je ein Nullwert ohne Analyt (nur Reinstwasser) mit vermessen. Die Abstufung zwischen den einzelnen Konzentrationen beträgt in der Regel eine Zehnerpotenz. Microcystin-Standards sind über mehrere Monate stabil, wenn die Lösungen in sauberen, mehrfach mit organischen Lösungsmitteln und Reinstwasser gespülten Schraubdeckel-Glasfläschchen aus Braunglas aufbewahrt werden. Um Verdunstung zu verhindern, ist darauf zu achten, daß die Behälter stets dicht verschlossen aufbewahrt werden. Nach Möglichkeit sollen sie kühl gelagert werden.

4.2 Direkter kompetitiver ELISA für die Antikörper M8H5, MC10E7 und AD4G2

Vorbeschichten: Anti-Maus-IgG (Verdünnung 1:3 000 in Coatingpuffer, 250 µL pro Kavität) wird in die Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert und sieben bis dreißig Stunden bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die vorbeschichteten Platten können bei 4 °C auch eine Woche gelagert werden.

Waschen: Die Platten werden dreimal mit PBS-Waschpuffer gewaschen, wobei die Kavitäten bei jedem Durchgang zweimal aufgefüllt und abgesaugt werden. Der Waschpuffer enthält Tween 20. Nach dem Waschschrift werden noch anhaftende Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen entfernt. Die weiteren Pipettierschritte sollten zügig erfolgen, um ein Austrocknen der Kavitäten zu verhindern.

Beschichten: Je nach ELISA wird einer der monoklonalen Antikörper in PBS-Puffer verdünnt (M8H5 20 µg/L; MC10E7 17 µg/L; AD4G2 12 µg/L) und 200 µL werden pro Kavität zupipettiert. Die Inkubation erfolgt bei RT mindestens 3 h, bei längerer Inkubationszeit (bis zu 100 h) bei 4 °C im Kühlschrank.

Waschen: siehe oben.

Vorinkubation der Standards, Kreuzreaktanden oder Proben: Werden viele verschiedene Lösungen in diesem Schritt pipettiert, so empfiehlt es sich, 20 µL Puffer (PBS oder TRIS) pro Kavität vorzulegen, um Austrocknungseffekte zu vermeiden. Werden Standards und Proben gleichermaßen verdünnt, so muß der Verdünnungsfaktor bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden. Jede Kavität wird mit 200 µL Standard- bzw. Probenlösung gefüllt. Die Inkubationszeit und der Konzentrationsbereich der Standards für die Kalibrierkurven richten sich nach dem verwendeten Antikörper (M8H5: 0.001-1000 µg/L Microcystin-LR-Standards, 30 Minuten Inkubationszeit; MC10E7: 0.0001-100 µg/L Microcystin-LR-Standards, 2 h Inkubationszeit; AD4G2 analog M8H5).

Tracerinkubation: 50 µL Microcystin-LR-Enzymtracer (0.64 mg/L in PBS) bzw. *N*-Acetyl-Adda-Enzymtracer (0.2 mg/L in PBS) werden in die bereits mit Standard- oder Probenlösung gefüllten Kavitäten gegeben und 15 Minuten inkubiert.

Waschen: Die Kompetitionsreaktion wird durch erneutes Waschen mit Waschpuffer abgebrochen.

Enzymreaktion: In jede Kavität werden 200 μL der Substratlösung gegeben und zwischen zehn und dreißig Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Entwicklung dauert so lange, bis eine deutliche Blaufärbung eingetreten ist, jedoch maximal 30 Minuten, da bei längeren Entwicklungszeiten die Eigenoxidation des Substrates überwiegt. Bei der Zugabe der Lösung ist darauf zu achten, daß die einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatte zügig und in konstanten Abständen mit der Substratlösung befüllt werden. Dadurch werden Fehler, die durch unterschiedliche Dauer der Enzymreaktion entstehen, vermieden. Während der Entwicklung soll die MTP lichtundurchlässig (z. B. mit Aluminiumfolie) abgedeckt werden, da der Farbstoff lichtempfindlich ist.

Abstoppen: Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von 100 μL 5%iger Schwefelsäurelösung pro Kavität abgestoppt. Das Pipettieren der Stopplösung in die Kavitäten muß analog zur Zugabe der Substratlösung erfolgen (Einhalten der Reihenfolge und der Zeitabstände mit dem die Spalten der Platte gefüllt werden). Nach Zugabe der Stopplösung wird die Platte kurz und intensiv auf dem Horizontalschüttler geschüttelt. Der gebildete gelbe Farbstoff ist relativ stabil, die MTP sollte trotzdem innerhalb von 30 Minuten vermessen werden.

Absorptionsmessung: Die Absorption der Lösung in den Kavitäten wird bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm in einem ELISA-Photometer gemessen. Bei sehr starker Signalentwicklung (Absorption >1) kann die Absorptionsmessung auch bei 405 nm erfolgen, da der Farbstoff hier einen geringeren Extinktionskoeffizienten hat.

4.3 Bestimmung von Realproben im ELISA

Für die Messung von Realproben wird der oben beschriebene ELISA leicht modifiziert, um möglichen Matrixeffekten Rechnung zu tragen. Vor der Zugabe der Standards bzw. der Wasserproben werden 20 μL TRIS-Pufferkonzentrat (1 M, pH 7.5, 1 % BSA, 1 % EDTA, 87.6 g/L NaCl) pro Kavität zugegeben. Anschließend erfolgt die Zugabe der Standards bzw. Wasserproben (200 μL pro Kavität). Der Enzymtracer wird in dem 1:10-verdünnten TRIS/HCl-Pufferkonzentrat verdünnt und 50 μL pro Kavität werden zugegeben. Die restliche Durchführung ist identisch zu dem oben beschriebenen Protokoll. Werden methanolische Algenextrakte gemessen, so sollte der Methanol-Anteil 10 % nicht überschreiten. Die Standards sollten den gleichen Methanolanteil enthalten.

4.4 Optimierung der Antikörper- und Tracerkonzentration und Bestimmung der Affinitätskonstanten

Die Optimierung der Antikörper- und Tracerkonzentration kann mit der Methode der "Checkerboard-Titration" [332, S. 154] erfolgen. Hierzu wird ein direkter nichtkompetitiver ELISA durchgeführt. Die Variation der Antikörperkonzentration erfolgt auf der Mikrotiterplatte in einer Richtung (z. B. von links nach rechts), während die Variation des Enzymtracers senkrecht dazu erfolgt (z. B. von oben nach unten). Dadurch wird ein schachbrettartiges Muster erhalten. Als optimale Kombination der variierten Konzentrationen können diejenigen gelten, die nach 15 Minuten Entwicklungszeit eine Absorption von 0.5 aufweisen. Für die Übertragung der Ergebnisse auf den direkten kompetitiven ELISA muß die Enzymtracer-Verdünnung berücksichtigt werden, die durch die Zugabe der Standards verursacht wird.

Für die Bestimmung der Affinitätskonstanten des Antikörpers müssen ebenfalls beide Konzentrationen variiert werden. Dies geschieht in einem direkten kompetitiven ELISA. Die Konzentrationen der Antikörper- bzw. Enzymtracerlösung werden so lange erniedrigt, bis der Testmittelpunkt sich nicht mehr ändert und das Minimum erreicht ist. Die beiden Parameter können hierbei nicht unabhängig voneinander optimiert werden.

4.5 Proteinphosphatase-Inhibitionsassay für HPLC-Kopplung

Für HPLC-Kopplung

Eine Stammlösung des Enzyms (Proteinphosphatase 1) wird durch Lösen von 25 µg in 100 µL TRIS-Puffer (50 mM, pH 7.0, 200 µM MnCl₂, 5 mM DTT, 200 µM EDTA) hergestellt. Das Substrat *p*-Nitrophenylphosphat wird in TRIS/HCl-Puffer pH 8.1 gelöst, um eine Konzentration von 33 mM zu ergeben. 144 µL pro Kavität werden zugegeben und mit 50 µL der HPLC-Fractionen (Verdünnung 1:2 in TRIS/HCl-Puffer pH 7.4) für 12 Minuten bei 30 °C inkubiert. 20 µL der Enzymlösung (Verdünnung 1:1000 der Enzymstammlösung in TRIS/HCl-Puffer pH 8.1) werden pro Kavität zugegeben und 2 h bei 30 °C inkubiert. Die Absorption wird bei 405 nm mit der Referenzwellenlänge 620 nm gemessen. Für Langzeitmessungen kann die Entwicklung auch über mehrere Tage bei 4 °C im Kühlschrank stattfinden.

Für Kalibrierkurven

Die Testdurchführung für die Erzeugung der Kalibrierkurven ist in der Bildunterschrift Abb. 65 beschrieben.

5 Synthesen und Spaltungsexperimente

5.1 Synthesen von Microcystin-LR-Immunogenen und -Tracern

5.1.1 Herstellung des Microcystin-LR-POD-Tracers

Meerrettichperoxidase (10 mg, 0.23 μmol) wurde in einem 2-mL-Schraubdeckelgläschen mit Schraubverschluß und Butyl/Teflonseptum in 500 μL Triethanolaminpuffer (50 mM, pH 8, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA) gelöst. Durch Einführen zweier Kanülen wurde die Lösung mit N_2 gespült. TRAUT's-Reagenz (4 g/L in Wasser, 150 μL , 4.4 μmol) wurde mittels einer Spritze zugegeben und die Lösung wurde 15 Minuten bei RT gerührt. Danach wurden weitere 50 μL (1.5 μmol) TRAUT's-Reagenzlösung zugegeben und 2 h bei RT gerührt. Die Reinigung der SH-modifizierten Peroxidase erfolgte mittels Gelchromatographie (Sephadex PD-10, G-25) mit PBS. Die Fraktionen werden in einer Mikrotiterplatte aufgefangen und die Proteinfractionen, die an ihrer braunen Farbe zu erkennen sind, vereinigt und mit N_2 überschichtet. Microcystin-LR (1.82 g/L in Acetonitril mit 9 % DMSO, 138 μL , 0.25 μmol) wurde zu der Lösung des modifizierten Enzyms zugegeben. Der pH-Wert wurde mit 40 μL Boraxpuffer (0.1 M, pH 9.2) auf pH 8 eingestellt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht (16 h) bei RT gerührt. Der Reaktionsumsatz wurde mittels HPLC überprüft. Dazu wurden 2 μL der Reaktionslösung mit 8 μL Acetonitril versetzt, zentrifugiert und der Überstand 1:10 mit Wasser verdünnt. 20 μL der Lösung wurden in die HPLC eingespritzt und der Microcystin-LR-Peak quantifiziert. Die HPLC-Analyse ergab, daß 40 % des Microcystins mit dem Enzym reagiert hatten. Der Enzymtracer wurde durch dreimalige gelchromatographische Reinigung an Sephadex PD-10 (G-25) gereinigt.

5.1.2 Herstellung des Microcystin-LR-KLH-Konjugates

KLH-Untereinheiten ("Vacmun liquid", 6.8 mg, 19.9 g/L in Wasser) wurden mit 26 μL Phosphatpuffer (1 M, pH 7.8) versetzt und gerührt. Zu dieser Lösung wurden 180 μL (7.34 μmol) einer SATP-Lösung (10 g/L in DMSO) in Aliquoten von 10 μL zugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht (15 h) bei RT gerührt, der Niederschlag wurde abzentrifugiert und 150 μL (75 μmol) einer Hydroxylamin-Hydrochlorid-Lösung (0.5 M in Phosphatpuffer 0.1 M, pH 7.8, 25 mM EDTA) wurden zugegeben. Es wurde 3 h bei RT gerührt. Das modifizierte Protein wurde mittels Gelchromatographie gereinigt und die Proteinfractionen mit dem ELLMAN's-Reagenz sichtbar gemacht. Hierzu wurden 100 μL pro Kavität einer 5 mM ELLMAN's-Lösung in Phosphatpuffer mit je 5 μL der gelchromatographisch gereinigten Fraktionen versetzt. Anhand der gelben Farbe bzw. der Absorption bei 405 nm lassen sich thiohaltige Substanzen erkennen. Die Proteinfractionen wurden sofort vereinigt und Microcystin-LR (1 g/L in Methanol, 460 μL , 0.5 μmol) wurde in Aliquoten von 25 μL zupipettiert. Das Reaktionsgefäß wurde während der Zugabe mit N_2 gespült. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei RT gerührt. Ein Teil des Proteins (1.2 mg) denaturierte und wurde abzentrifugiert.

Die Reaktionslösung wurde auf 300 μL eingeengt und 2mal gelchromatographisch auf Sephadex PD-10 (G-25) mit Wasser als Elutionsmittel gereinigt.

5.1.3 Synthese von kationisiertem Ovalbumin (cOVA)

Ovalbumin (50 mg, 1.1 μmol) wurde in 4 mL MES-Puffer (0.1 M, pH 5.7) gelöst und Ethylendiamin-Dihydrochlorid (668 mg, 5 mmol), gelöst in 4 mL des gleichen MES-Puffers, wurde zugegeben. EDC (20 mg, 0.1 mmol) wurde zugegeben und die Lösung über Nacht bei RT gerührt. Die Reinigung erfolgte in Aliquoten von je 0.7 mL mittels Gelchromatographie an Sephadex PD-10 mit Phosphatpuffer (0.1 M, pH 7.5, 0.9 M NaCl, 1 mM EDTA) als Elutionsmittel. Die Kopplungsdichte wurde durch Derivatisierung mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure bestimmt. Ein Vergleich von TNBS-modifiziertem Ovalbumin und von TNBS-modifiziertem kationisiertem Ovalbumin zeigte, daß alle zugänglichen Aminogruppen modifiziert wurden. Die Massenbestimmung mittels MALDI ergab 15 zusätzlich eingeführte Aminogruppen im kationisierten Ovalbumin.

5.1.4 Synthese des löslichen Microcystin-LR-cOVA-Konjugates

Kationisiertes Ovalbumin (5.1 mg, 0.11 μmol) wurde in 0.5 mL Natriumhydrogencarbonatpuffer (0.1 M, pH 8) gelöst. 54 μL (4 μmol) einer Lösung von SATP (18.3 g/L) in DMSO wurden zugegeben und die Reaktionslösung wurde 1.5 h bei RT gerührt. Währenddessen wurde die Lösung trüb und 28 % des Proteins denaturierten. Dieses wurde durch Zentrifugieren abgetrennt. 5.2 μL (8 μmol) einer frisch angesetzten Lösung aus Hydroxylaminhydrochlorid (60 g/L in NaHCO_3 -Puffer, 0.1 M, pH 8) sowie 15 μL einer 5 M NaOH-Lösung wurden zu dem Überstand gegeben, um die Acetylenschutzgruppen zu entfernen. Das SH-modifizierte Protein wurde gelchromatographisch (Sephadex PD-10) mit PBS-Puffer gereinigt und in Mikrotiterplatten fraktioniert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels ELLMAN's Test sichtbar gemacht, vereinigt, mit N_2 überschichtet und mit einer Microcystin-LR-Lösung (1.2 mg, 1.2 μmol gelöst in 650 μL Acetonitril mit 0.9 % DMSO) versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit 70 μL einer 5 M NaOH-Lösung auf pH 12 eingestellt und über Nacht gerührt. Die Umsatzkontrolle erfolgte mittels HPLC wie für die Synthese des Microcystin-LR-KLH-Konjugates beschrieben. Ein 95%iger Umsatz des Microcystins wurde gemessen. Freie SH-Gruppen wurden durch Zugabe von 2.4 mg Iodacetat und 15-minütiges Rühren geblockt. Die Reinigung des Konjugates erfolgte mittels Gelchromatographie mit einer Säule von 22 cm Höhe und 1 cm Durchmesser, die mit Sephadex G25F gefüllt war. Die Kopplungsdichte betrug 13 Microcystin-LR-Moleküle pro Proteinmolekül, wie aus der Umsatzkontrolle mittels HPLC-UV abgeschätzt wurde.

5.1.5 Synthese des unlöslichen Microcystin-LR-cOVA-Konjugates

Das unlösliche Konjugat wurde nach demselben Syntheseprotokoll hergestellt, wie das lösliche Konjugat. Der einzige Unterschied bestand in dem molaren Verhältnis, in dem SATP in bezug auf die Aminogruppen des kationisierten Ovalbumins eingesetzt wurde. Für die Synthese des unlöslichen Konjugates wurde SATP in vierfachem molaren Überschuß gegenüber den Aminogruppen des Proteins eingesetzt. Um die Oxidation des Proteins zu verhindern, wurde TCEP-Hydrochlorid zu der Reaktionsmischung zugegeben. Dieses muß bei der gelchromatographischen Reinigung des SH-modifizierten Proteins jedoch entfernt werden, da es anderenfalls quantitativ mit Microcystin-LR reagiert. Microcystin-LR wurde äquimolar zu der maximalen Zahl an möglichen SH-Gruppen des Proteins eingesetzt. Mittels HPLC-Umsatzkontrolle wurde festgestellt, daß 60 % des Microcystins mit dem Protein reagiert hatten. Das denaturierte Protein wurde durch Zentrifugieren vom Überstand getrennt, mehrmals mit PBS-Puffer gewaschen und im Vakuum getrocknet. Anschließend wurde es zu einem feinen Pulver gemörsert und mit NaCl-Lösung (150 mM) suspendiert.

5.2 Synthese von Adda-Derivaten, -Immunogenen und -Tracern

5.2.1 Synthese von *N*-Acetyl-Adda

Adda (5 mg, 15 µmol) wurde in 1 mL Boraxpuffer (0.1 M, pH 9.2), 400 µL Acetonitril und 400 µL Methanol gelöst. Die Lösung blieb leicht trüb. Dann wurden in Abständen von 2 Minuten 20 Aliquote von je 10 µL Essigsäure-NHS-Ester (150 g/L gelöst in trockenem Acetonitril) zugegeben (Σ 30 mg/0.26 mmol). Zehn Minuten nach dem Start der Zugabe wurde die Lösung klar. Sie wurde über Nacht bei RT gerührt, mit 30 µL 37%iger Salzsäure angesäuert, unter N₂ zur Trockne eingedampft und im Exsikkator unter Vakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 600 µL Glyme aufgenommen, zentrifugiert und in zwei Fraktionen geteilt. 300 µL wurden für weitere Reaktionen verwendet und 300 µL wurden gereinigt. Für die Reinigung wurden 220 µL Wasser zugegeben und die Lösung über eine 500-µL-Injektionsschleife auf eine semipräparative HPLC (Supelcosil C18, 5 µm, 25 cm x 1 cm) gegeben. Gradient (A: Wasser; B: Acetonitril; Fluß: 6 mL/min): 0 = 1 min 70% A; 30 min 20% A; 35 min 10% A; 45 min 70% A, Detektionswellenlänge: 238 nm, Retentionszeit von *N*-Acetyl-Adda: 14 min. Die Reaktion verlief quantitativ. Die Identität des Produktes wurde mit ESI-MS (negativer Ionenmodus) überprüft: *m/z* (%): 372.3 (100) [(M-H)⁻]; 328.3 (65) [(M-H-CO₂)⁻].

5.2.2 Synthese des aktivierten NHS-Esters von *N*-Acetyl-Adda

N-Acetyl-Adda (4.2 mg; 11.3 μmol) wurde in 400 μL trockenem Glyme (1,2-Dimethoxyethan) gelöst. *N*-Hydroxysuccinimid (1.5 mg; 13 μmol) und Di-(*N*-succinimidyl)-carbonat (5.7 mg; 22 μmol) wurden zugegeben und für 1 h bei RT gerührt. Dann wurde *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (4 mg; 20.8 μmol) zugegeben und über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde sodann zentrifugiert und der Überstand im N_2 -Strom auf 200 μL eingeeengt, mit 200 μL Wasser vermischt und sofort mittels semipräparativer HPLC gereinigt. HPLC-Bedingungen: s. Synthese von *N*-Acetyl-Adda, Retentionszeit von *N*-Acetyl-Adda-NHS-Ester: 19 min. Die Produktfraktion wurde sofort bei $-23\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Ausbeute der Reaktion betrug nach der Reinigung 30 % laut HPLC. Bei $-23\text{ }^\circ\text{C}$ friert Wasser aus und die organische Phase kann von der wäßrigen abgetrennt werden. Der aktivierte Ester wurde mit der Acetonitrilphase abdekantiert. Die wäßrige Phase wurde aufgetaut und zwei weitere Male mit Acetonitril extrahiert. Die Acetonitrilphasen wurden vereinigt und sofort mit Na_2SO_4 getrocknet.

5.2.3 Synthesen der *N*-Acetyl-Adda-KLH-, -BSA- und -POD- Konjugate

Eine Stammlösung aus KLH-Untereinheiten (245 μL einer 20.4 g/L Lösung, 0.46 μmol Aminogruppen) wurde mit 500 μL Boraxpuffer (0.1 M, pH 9.2) vermischt. *N*-Acetyl-Adda-NHS (ca. 0.57 μg , 1.2 μmol in 230 μL Acetonitril) wurde in Aliquoten von 10 μL zu der KLH-Lösung gegeben. Nach einer Stunde wurde die Reaktionsmischung trüb und das Protein fiel aus. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und je einmal mit 500 μL Methanol (+ 0.1 % Essigsäure) und mit reinem Methanol gewaschen. Der Reaktionsüberstand enthielt nur noch Spuren des Proteins, welche jedoch zur Überprüfung der Kopplung in einem indirekten nicht-kompetitiven ELISA ausreichten. Das lösliche *N*-Acetyl-Adda-KLH diente als Coatingantigen und Antikörper M8H5 als primärer Antikörper. Der Ablauf des ELISA erfolgte analog zu der in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen Prozedur. Als Negativkontrolle wurde KLH verwendet.

Die Kopplung von *N*-Acetyl-Adda-NHS an BSA und POD wurde analog zu der Synthese des KLH-Konjugates durchgeführt. Beide Konjugate blieben löslich und wurden mittels Gelchromatographie (Sephadex PD-10) gereinigt. Die Zahl der *N*-Acetyl-Adda-Moleküle pro BSA-Molekül wurde mittels ESI-TOF bestimmt und betrug 11. Die Kopplungsdichte betrug somit 28 %, wenn von einer Gesamtzahl von 36 zugänglichen Aminogruppen ausgegangen wird.

5.3 Enzymatische Spaltexperimente von Microcystin-LR

Für die enzymatische Spaltung wurden die Enzyme in Puffer gelöst wie unten angegeben, mit 5 µL einer Microcystin-LR-Lösung (1 g/L in Methanol oder Ethanol) versetzt und für 15-22 h bei 30-37 °C inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden mit Wasser verdünnt und in der HPLC gemessen. Dabei wurde auf eine Abnahme des Microcystinpeaks und auf das Auftauchen weiterer Peaks geachtet.

Pronase: 2 mL, 0.1 g/L, 1.2 U (Puffer: Phosphat, 10 mM, pH 7.7)

Trypsin: 2 mL, 0.1 g/L, 1600 U (Puffer: TRIS-HCl, 50 mM, pH 8.6, 20 mM Ca²⁺)

Carboxypeptidase Y: 0.6 mL, 8.3 g/L, 60 U (Puffer: Phosphat, 67 mM, pH 6.5)

Thermolysin: 1 mL, 3.6 g/L, 144 U (Puffer: Phosphat, 10 mM, pH 7.7)

Endoproteinase Arg-C: 1 mL, 102 U (Puffer: TRIS-HCl, 0.2 M, pH 8)

Papain: 1 mL, 2.5 g/L, 49 U (NaOH pH 6, 10 mM NaCl, 5 mM Cystein, 2 mM EDTA)

Proteinase K: 0.5 mL, 4 g/L (Puffer: TRIS-HCl, 50 mM, pH 8)

Subtilisin: 1 mL, 9 g/L, 99 U (Puffer: TRIS-HCl, 0.2 M, pH 7.6, 0.1 M Ca²⁺)

5.4 Kopplung von Microcystin-LR an aminomodifizierte Glaträger

Die Herstellung aminosilanisierter Glaträger erfolgte wie von SCHÜTZ [327, S. 200] beschrieben. Die Glaträger wurden in einem zweiten Schritt thiolmodifiziert. Hierzu wurden sie 1 h in eine Lösung aus TRAUT's Reagenz (2.35 g/L in Triethanolaminpuffer, 50 mM, pH 8) getaucht. Danach wurden sie mit Wasser und Methanol gespült und im N₂-Strom getrocknet. Die Kopplung von Microcystin-LR erfolgte durch Aufpipettieren einer Lösung von 9 mg/L Microcystin-LR in Wasser (+ 10 % Glycerin) mit Standardpipetten oder mit einem Nanopipettiersystem auf die Glaträger. Die Glaträger wurden 2.5 h im Kühlschrank (+ 4 °C) gelagert, um die Tropfen vor Verdunstung zu schützen und eine möglichst lange Reaktionszeit zu gewährleisten. Anschließend wurden sie mit Wasser und Methanol gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Nicht modifizierte freie Aminogruppen wurden durch chemische Modifizierung mit Bernsteinsäureanhydrid blockiert [327, S. 201]. Die Kopplung von Microcystin-LR in basischen Puffern war nicht erfolgreich.

6 Chromatographische Methoden

6.1 Off-line-Festphasenextraktion gefriergetrockneter Cyanobakterien

Zwischen 2 und 8 mg Trockenmasse werden in einem Eppendorfgemäß eingewogen. Da die Trockenmasse oft elektrostatisch geladen ist, sollte die Einwaage unter einem Abzug und unter Zuhilfenahme eines elektrostatischen Entladegerätes erfolgen. Als einfache Maßnahme kann der Spatel geerdet werden. 1 mL eines Methanol/Wasser-Gemisches (3:1) wird zugegeben und die Proben werden 10 min im Ultraschallbad extrahiert, über Nacht in der Extraktionslösung stehen gelassen und noch einmal 10 min mit Ultraschall behandelt. Anschließend werden sie 10 min bei 17 000 U/min zentrifugiert, 900 µL des Überstandes werden abgenommen und im N₂-Strom zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in 500 µL 5%iger Essigsäure aufgenommen. Für die Festphasenextraktion werden Merck LiChrolut Glassäulen (3 mL Füllvolumen) mit PTFE-Fritte versehen, mit 500 mg Festphasenmaterial (Bakerbond C18, 40 µm Partikeldurchmesser) gefüllt und mit einem PTFE-Fritte verschlossen. Die Säulchen werden mit 10 mL Methanol und 20 mL Wasser konditioniert. Die Probe (500 µL in 5%iger Essigsäure) wird aufgegeben und die Säulchen werden mit 20 mL Wasser, 20 mL 10 % Methanol und 10 mL 20 % Methanol gewaschen. Anschließend werden sie durch Anlegen von Vakuum getrocknet. Die Microcystine werden mit 5 mL Methanol eluiert und das Lösungsmittel wird im N₂-Strom entfernt. Für die Messung der Proben in der HPLC wird der Rückstand in 250 µL Wasser (+ 10 % Acetonitril und 0.1 % TFA) und 100 µL Methanol gelöst.

6.2 HPLC-UVD, HPLC-ELISA und HPLC-MS

HPLC, die ausschließlich mit UV-Detektion betrieben wurde, sowie die HPLC-ELISA-Kopplung wurden mit Geräten der Firma Merck, die in Abschnitt 1 aufgelistet sind, durchgeführt. Die Methode wurde für Microcystin-Standards, cyanobakterielle Extrakte, die Kontrolle der enzymatischen Spaltung und die Umsatzkontrolle der Konjugatsynthesen eingesetzt. Die HPLC-Methoden, die für die Herstellung von *N*-Acetyl-Adda und *N*-Acetyl-Adda-NHS verwendet wurden, sind in den entsprechenden Synthesevorschriften enthalten.

Parameter für die analytische Trennung:

Stationäre Phase:	LiChroCART® 100, RP18, 250 mm x 4 mm, Partikeldurchmesser 5 µm
oder:	Discovery RP C16 Amid®, 250 mm x 4 mm, Partikeldurchmesser 5 µm
Mobile Phase:	Eluent A: Wasser mit 0.1 % Trifluoressigsäure (TFA) Eluent B: Acetonitril mit 0.04 % TFA
Flußgeschwindigkeit:	1 mL/min
Injektion:	20 µL über Injektionsschleife
Detektion:	238 nm

Gradientenprogramm für die analytische Trennung:

0-1 Minuten:	90 % A, 10 % B
1-60 Minuten:	90 % A, 10 % B → 10 % A, 90 % B
60-62 Minuten:	10 % A, 90 % B
62-65 Minuten:	10 % A, 90 % B → 90 % A, 10 % B

Automatische Fraktionierung für die HPLC-ELISA-Kopplung:

Der programmierbare Fraktionensammler wurde an den Ausgang des UV-Detektors angeschlossen und sammelte 5 bzw. 2 Tropfen (ca. 130 bzw. 50 µL) pro Kavität einer Mikrotiterplatte. In die Kavitäten der Mikrotiterplatten wurden 120 µL Puffer (PBS, pH 7.6 oder TRIS/HCl-Puffer pH 7.4 bei der Messung von Realproben) vorgelegt. Es wurde nur im Retentionszeitfenster der Microcystine Eluat gesammelt. Nach der Fraktionierung wurden die Mikrotiterplatten mit selbstklebender Folie verschlossen und kühl gelagert, bis der ELISA durchgeführt wurde.

Für die Messung der Microcystine mit HPLC-MS-Kopplung wurden die Geräte der Firmen Waters und Micromass verwendet. Nach der Säule wurde eine PEEK-Kapillare (1/16" Außendurchmesser, 0.005" Innendurchmesser, Farbcode rot) angeschlossen, danach ein Flußteiler. Am unteren Ausgang wurde die PEEK-Kapillare zum MS angeschlossen (1/16" Außendurchmesser, 0.007" Innendurchmesser, Farbcode gelb) und am oberen Ausgang die PEEK-Kapillare mit dem geringsten Rückdruck (1/16" Außendurchmesser, 0.01" Innendurchmesser, Farbcode blau). Der Flußteiler wurde so eingestellt, daß der Fluß in das Massenspektrometer ca. 50 µL/min betrug.

Parameter für die analytische Trennung:

Stationäre Phase:	Discovery RP C16 Amid®, 150 mm x 2.1 mm, 5 µm
Mobile Phase:	Eluent A: Wasser mit 0.01 % Trifluoressigsäure (TFA) bzw. 0.2 % Ameisensäure Eluent B: Acetonitril mit 0.01 % TFA bzw. 0.2 % Ameisensäure
Flußgeschwindigkeit:	0.3 mL/min
Injektion:	50 µL über Injektionsschleife
Detektion:	200-400 nm, 1 nm Auflösung, 1 Spektrum/Sekunde

Gradientenprogramm für die analytische Trennung:

- 0-7 Minuten: 85 % A, 15 % B → 62 % A, 38 % B
 7-9 Minuten: 62 % A, 38 % B → 40 % A, 60 % B
 9-11.5 Minuten: 40 % A, 60 % B → 30 % A, 70 % B
 11.5-15 Minuten: 30 % A, 70 % B → 5 % A, 95 % B
 15-15.2 Minuten: 5 % A, 95 % B
 15.2-20 Minuten: 5 % A, 95 % B → 85 % A, 15 % B

7 Massenspektrometrie (MS)

Die Aufnahme der Massenspektren für Microcystine erfolgte mit dem Elektrospray-Flugzeit-massenspektrometer LCT™ der Firma Micromass. Mit diesem Massenspektrometer wird eine Massenauflösung von 6 100 und eine Massengenauigkeit von 5 ppm (intern kalibriert) bei einer Molmasse von 1 000 erreicht.

7.1 MS-Parameter und Massenkalisierung

Eine Zusammenstellung der MS-Parameter und der optimalen Werte zur Bestimmung von Microcystinen im positiven und negativen Ionenmodus ist in Tabelle 27 aufgelistet.

Tabelle 27: Optimierte MS-Parameter.

MS-Parameter	Wert (ESI+)	Wert (ESI-)
Spannung der LC-Kapillarspitze	3400 V	3100 V
Spannung der "Sample Cone"	30 V	-60 V
Spannung der "Extraction Cone"	5 V	-4 V
Spannung der Hexapol-Transfer-Linsen	200-400 V	200-400 V
TDC (Time-to-Digital Converter)	800 mV	780 mV
Temperatur der Quelle	100 °C	100 °C
Desolvatisierungstemperatur	350 °C	350 °C
Stickstoffstrom für Vernebelung	100 L/h	100 L/h
Stickstoffstrom für Desolvatisierung	450 L/h	450 L/h
Fluß	10-30 µL/min	10-30 µL/min

Die Massenkalisierung für Microcystine wurde mit einem CsI-Standard für einen Massenbereich von 100 bis 1 500 durchgeführt. Der Standard (0.125 g/L CsI) wurde durch Verdünnung einer CsI-Stammlösung (1 g/L in Reinstwasser) in einer Wasser/Acetonitril-Mischung (1:1) hergestellt. Er kann sowohl für die Kalibrierung im negativen als auch im positiven Ionenmodus verwendet werden. Für den positiven Ionenmodus gilt die Formel $C_{n+1}I_n$, $n=1-6$ (m/z : 132.905; 392.715; 652.525; 912.335; 1172.145; 1431.955). Für den negativen Ionenmodus gilt die Formel C_nI_{n+1} , $n=1-6$ (m/z : 126.9045; 386.7144; 646.5243; 906.3342; 1166.1441; 1425.9540). Werden nur Microcystine gemessen, so kann mit einer Microcystin-Standardmischung kalibriert werden. Die Molmassen im positiven wie im negativen Ionenmodus sind in Tabelle 28 aufgelistet.

Tabelle 28: Monoisotopische Massen der einiger Toxine im negativen und positiven Ionenmodus.

Microcystin	Summenformel	Molmasse (monoisotopisch) Positiv geladen	Molmasse (monoisotopisch) Negativ geladen
Microcystin-LR	$C_{49}H_{74}N_{10}O_{12}$	995.5566	993.5409
Microcystin-YR	$C_{52}H_{72}N_{10}O_{13}$	1045.5358	1043.5202
Microcystin-RR	$C_{49}H_{75}N_{13}O_{12}$	1038.5736	1036.5580
Microcystin-LA	$C_{46}H_{67}N_7O_{12}$	910.4926	908.4801
Microcystin-LW	$C_{54}H_{71}N_8O_{12}$	1024.5269	1022.5113
Microcystin-LF	$C_{52}H_{71}N_7O_{12}$	986.5239	984.5083
Nodularin	$C_{41}H_{60}N_8O_{10}$	825.4511	823.4354

Die Massenkalisierung zur Messung von Proteinen und Hapten-Protein-Konjugaten erfolgte mit einem Myoglobin-Trypsinogen-Standard (Myoglobin 5 $\mu\text{mol/L}$; Trypsinogen 10 $\mu\text{mol/L}$ in Wasser/Acetonitril (1:1) mit 0.2 % Ameisensäure. Mit diesem Standard wird ein Massenbereich zwischen m/z 600 bis 2 100 abgedeckt.

7.2 On-line-SPE-HPLC-MS

7.2.1 Probenvorbereitung

Das Oberflächenwasser wurde über einen Glasfaserfilter (GF 8) filtriert. Das Filtrat wurde mit TFA auf eine Konzentration von 0.05 % TFA angesäuert und gegebenenfalls mit Microcystin-Standards aufgestockt.

7.2.2 Anreicherungsprogramm

Kartusche: OASIS[®] HLB 10 mm x 2 mm, 30 µm Partikelgröße

Flußgeschwindigkeit: 20 mL/min

Steuerung: Das Anreicherungsprogramm wurde von der MassLynx-Software gestartet. Die HPLC-Pumpe B (Waters) gab das Start-Signal an das Prospekt-System. Dieses führt das Anreicherungsprogramm autonom aus. Es steuert das Lösungsmittelauswahl-Ventil (Rheodyne) und die Anreicherungspumpe. Während der gesamten Anreicherung blieb der Fluß konstant. Der Zeitplan ist in Tabelle 29 aufgelistet. Um den Lösungsmittelverbrauch bei der Konditionierung der Kartusche und den Spülschritten gering zu halten, wurde kurz gespült und danach eine Einwirkzeit in das Programm eingebaut.

Tabelle 29: Zeitplan der automatischen Festphasen-Anreicherung.

Links ist der Zeitpunkt angegeben, rechts, die zu diesem Zeitpunkt ausgeführte Aktion.

Zeitpunkt	Rheodyne-Ventilposition (Kanal)	Anreicherungspumpe	Prospekt-Ventilposition
0 sec*	Luft (1)	aus	aus
20 sec	Acetonitril (2)	an	Anreicherung
40 sec	Acetonitril (2)	aus	Anreicherung
1 min 40 sec	Wasser + 0.1 % TFA (3)	an	Anreicherung
2 min	Wasser + 0.1 % TFA (3)	aus	Anreicherung
2 min 50 sec	Probe (4)	an	Anreicherung
9 min	Wasser + 0.1 % TFA (3)	an	Anreicherung
10 min	Wasser/Acetonitril 85/15 + 0.085 % TFA (5)	an	Anreicherung
11 min	Wasser + 0.1 % TFA (3)	aus	Anreicherung
14 min	Luft (1)	aus	Elution

* Start durch die HPLC-Pumpe B (Waters) über das MassLynx-Programm.

7.2.3 Elutionsprogramm

Säule: Discovery RP-Amid[®]-C16 , 150 mm x 2.1 mm, 5 µm

Mobile Phase: Eluent A: Wasser

Eluent B: Acetonitril

Gradient: 0-14.2 Minuten: 85 % A, 15 % B; Fluß: 0.2 mL/min

(Zeit für die Festphasenextraktion)

14.2-25 Minuten: 85 % A, 15 % B; Fluß 0.2 → 0.3 mL/min

(Matrixelution)

25-45 Minuten: 85 % A, 15 % B → 20 % A, 80 % B; Fluß: 0.3 mL/min

(Elution der Microcystine)

45-50 Minuten: 20 % A, 80 % B; Fluß: 0.3 mL/min

50-55 Minuten: 20 % A, 80 % B → 10 % A, 90 % B; Fluß: 0.3 mL/min

55-58 Minuten: 10 % A, 90 % B; Fluß: 0.3 mL/min

58-60 Minuten: 10 % A, 90 % B → 85 % A, 15 % B; Fluß: 0.3 mL/min

VII. ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
AD4G2	Monoklonaler Antikörper gegen Adda-Komponente der Microcystine
Adda	(2S,3S,8S,9S)-3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4E,6E-diensäure
ADMAdda	O-Acetyl-O-desmethyl-Adda
BSA	Rinderserumalbumin
cOVA	Kationisiertes Ovalbumin (Eialbumin, Huhn)
C	Testmittelpunkt der sigmoidalen Kalibrierkurve
CCD	Charge Coupled Device
CR	Kreuzreaktion
DAD	Diodenarray-Detektor
DiFMUP	6,8-Difluoro-4-methylumbelliferylphosphat
Dha	Dehydroalanin
Dhb	Dehydrobuttersäure
D-MeAsp	D- <i>erythro</i> - β -Methylasparaginsäure
DMAdda	O-desmethyl-Adda
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	Di-(N-succinimidyl)-carbonat
DTT	DL-Dithiothreitol
EDC	N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELLMAN's Reagenz	5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)
ESI-TOF	Elektrospray-Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometer
FAB	Fast-Atom-Bombardment
GC	Gaschromatographie
HPDL	Human Phage Display Library
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
Hty	Homotyrosin
IC ₅₀	Testmittelpunkt sigmoidaler Kalibrationskurven; entspricht 50 % Inhibition
i. p.	intraperitoneal
PDA	Photodiodenarray-Detektor
POD	Peroxidase
KLH	Keyhole Limpet Hämocyanin (aus <i>Megatura crenulata</i>)
KR	Kreuzreaktant
LC	Flüssigchromatographie
LD ₅₀	Lethale Dosis bei 50 % der Versuchstiere
M8H5	Monoklonaler Antikörper gegen Microcystin
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation

MC	Microcystin
MC10E7	Monoklonaler Antikörper gegen [4-Arginin]Microcystine
Mdhb	2-(Methylamino)-2-dehydrobuttersäure
MeAla-GSH	Glutathion-Konjugat durch Addition von Glutathion an die α,β -ungesättigte Carbonylfunktion von <i>N</i> -Methyldehydroalanin
MeLan	<i>N</i> -Methylanthionin
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat
MeSer	<i>N</i> -Methylserin
MMPB	<i>erythro</i> -2-Methyl-3-methoxy-4-phenylbuttersäure
MS	Massenspektrometrie
MTP	Mikrotiterplatte
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
Nodln	Nodularin (-R in dieser Arbeit)
NMR	Kernresonanzspektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance)
PBS	Phosphat-Kochsalzpuffer
PLL	Poly-L-lysin
<i>p</i> NPP	<i>p</i> -Nitrophenylphosphat
PP	Proteinphosphatase
RP	Umkehrphase (Reversed Phase)
RT	Raumtemperatur bzw. Retentionszeit in Zusammenhang mit Chromatographie
SATP	Succinimidyl-Acetylthiopropionat
SBTI	Sojabohnen-Trypsininhibitor
sp.	Spezies
spp.	Mehrere Spezies
SPE	Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction)
TCEP-HCl	Tris(2-carboxyethyl)phosphin-Hydrochlorid
TIC	Totalionenstrom (Total Ion Current)
TFA	Trifluoressigsäure
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TOF	Flugzeit-Massenspektrometer (Time-of-Flight)
TRAUT's Reagenz	2-Iminothiolan-Hydrochlorid
TRIS	α,α,α -Tris(4-hydroxymethyl)-methylamin
UV	Ultraviolett
UVD	UV-Detektor
WHO	Weltgesundheitsorganisation

VIII. LITERATUR

- [1] D. VOET, J. G. VOET: Biochemie, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1994.
- [2] P. D. BAKER, L. D. FABBRO: A Guide to the Identification of Common Blue-Green Algae (Cyanoprokaryotes) in Australian Freshwaters, Cooperative Research Centre for Freshwater Ecology CRCFE, Identification Guide No. 25, Thurgoona 1999.
- [3] W. W. CARMICHAEL: *The Toxins of Cyanobacteria*, Sci. Americ. **270** (1994) 64-72.
- [4] B. C. HITZFELD, C. S. LAMPERT, N. SPAETH, D. MOUNTFORT, H. KASPAR, D. R. DIETRICH: *Toxin Production in Cyanobacterial Mats from Ponds on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica*, Toxicon **38** (2000) 1731-1748.
- [5] G. M. HALLEGRAEFF: *A Review of Harmful Algal Blooms and Their Apparent Global Increase*, Phycologia **32** (1993) 79-99.
- [6] G. A. CODD, C. J. WARD, K. A. BEATTIE, S. G. BELL: *Widening Perceptions of the Occurrence and Significance of Cyanobacterial Toxins*, in: The Phototrophic Prokaryotes, G. A. Peschek, W. Löffelhardt, G. Schmetterer (Hrsg.), S. 623-631, Plenum Publishers, New York 1999.
- [7] W. W. CARMICHAEL: *Toxic Microcystis and the Environment*, in: Toxic Microcystis, M. F. Watanabe, K. I. Harada, W. W. Carmichael, H. Fujiki (Hrsg.), S. 1-13, CRC Press, Boca Raton 1996.
- [8] K. ANAGNOSTIDIS, J. KOMAREK: *Modern Approach to the Classification System of Cyanophytes, 5. Stigonematales*, Arch. Hydrobiol. Suppl. **86** (1990) 1-73.
- [9] L. R. MUR, O. M. SKULBERG, H. UTKILEN: *Cyanobacteria in the Environment*, in: Toxic Cyanobacteria in Water - A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management, I. Chorus, J. Bartram (Hrsg.), S. 15-34, E & FN Spon, London 1999.
- [10] C. E. W. STEINBERG, C. WIEGAND, I. CUBIC, D. BAGANZ, S. PFLUGMACHER, G. A. CODD: *Cyanobakterien als Bioindikatoren für Gewässergüte - Einige überholte Paradigmen*, Jahrestagung Wasserchemische Gesellschaft 2000, Weimar 2000 (Poster).
- [11] I. CHORUS, I. DEUCKERT, J. FASTNER, G. KLEIN: *Toxine und Allergene aus Algen in Badegewässern*, Bundesgesundheitsblatt **35** (1992) 404-407.
- [12] J. RAPALA, K. SIVONEN, C. LYRA, S. I. NIEMELA: *Variation of Microcystins, Cyanobacterial Hepatotoxins, in Anabaena spp. as a Function of Growth Stimuli*, Appl. Environ. Microbiol. **63** (1997) 2206-2212.
- [13] J. LEHTIMAKI, P. MOISANDER, K. SIVONEN, K. KONONEN: *Growth, Nitrogen Fixation, and Nodularin Production by Two Baltic Sea Cyanobacteria*, Appl. Environ. Microbiol. **63** (1997) 1647-1656.
- [14] B. SEDMAK, G. KOSI: *The Role of Microcystins in Heavy Cyanobacterial Bloom Formation*, J. Plankton Res. **20** (1998) 691-708.

- [15] *Die erste Plage: Verwandlung aller Gewässer in Blut*, in: Die Bibel, Mose 7:20-21, Deutsche Bibelgesellschaft, Stuttgart 1985.
- [16] G. FRANCIS: *Poisonous Australian Lake*, Nature **18** (1878) 11-12.
- [17] I. CHORUS: *Algal Metabolites and Water Quality: Toxins, Allergens, and Taste-and-Odor-Substances*, Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia - Intern. J. Limnol. **52** (1993) 257-280.
- [18] T. KUIPER-GOODMAN, I. FALCONER, J. FITZGERALD: *Human Health Aspects*, in: Toxic Cyanobacteria in Water - A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management, I. Chorus, J. Bartram (Hrsg.), S. 113-153, E & FN Spon, London 1999.
- [19] P. R. HUNTER: *Cyanobacterial Toxins and Human Health*, J. Appl. Microbiol. **84** (1998) S35-S40.
- [20] E. M. JOCHIMSEN, W. W. CARMICHAEL, J. S. AN, D. M. CARDO, S. T. COOKSON, C. E. M. HOLMES, M. B. DE C. ANTUNES, D. A. DE MELO FILHO, T. M. LYRA, V. S. T. BARRETO, S. M. F. O. AZEVEDO, W. R. JARVIS: *Liver Failure and Death After Exposure to Microcystins at a Hemodialysis Center in Brazil*, New Engl. J. Med. **339** (1998) 139-139.
- [21] S. POURIA, A. DE ANDRADE, J. BARBOSA, R. L. CAVALCANTI, V. T. S. BARRETO, C. J. WARD, W. PREISER, G. K. POON, G. H. NEILD, G. A. CODD: *Fatal Microcystin Intoxication in Haemodialysis Unit in Caruaru, Brazil*, Lancet **352** (1998) 21-26.
- [22] Y. UENO, S. NAGATA, T. TSUTSUMI, A. HASEGAWA, M. F. WATANABE, H. D. PARK, G. C. CHEN, G. CHEN, S. Z. YU: *Detection of Microcystins, a Blue-Green Algal Hepatotoxin, in Drinking Water Sampled in Haimen and Fusui, Endemic Areas of Primary Liver Cancer in China, by Highly Sensitive Immunoassay*, Carcinogenesis **17** (1996) 1317-1321.
- [23] K. I. HARADA, M. OSHIKATA, H. UCHIDA, M. SUZUKI, F. KONDO, K. SATO, Y. UENO, S. Z. YU, G. CHEN, G. C. CHEN: *Detection and Identification of Microcystins in the Drinking Water of Haimen City, China*, Natural Toxins **4** (1996) 277-283.
- [24] I. FALCONER, J. BARTRAM, I. CHORUS, T. KUIPER-GOODMAN, H. UTKILEN, M. BURCH, G. A. CODD: *Primary Liver Cancer and Cyanotoxins in China*, in: Toxic Cyanobacteria in Water - A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management, I. Chorus, J. Bartram (Hrsg.), S. 165, E & FN Spon, London 1999.
- [25] H. BERNHARDT, J. CLASEN: *Probleme der Entfernung von Mikroorganismen durch Flockung in der Trinkwasseraufbereitung*, Veröffentlichungen des Lehrstuhls für Wasserchemie, Universität Karlsruhe **Heft 3** (1967) 294-338.
- [26] M. HENNING, J. G. KOHL: *Toxic Blue-Green Algae Water Blooms Found in Some Lakes in the German Democratic Republic*, Int. Rev. Ges. Hydrobiol. **66** (1981) 553-561.

- [27] A. STEINER: *Algenbürtige Stoffe in Oberflächengewässern*, in: Schadstoffbelastung und Ökosystemschutz im aquatischen Bereich, S. 281-295, R. Oldenburg Verlag, München, Wien 1985.
- [28] H. FROMME, A. KOHLER, R. KRAUSE, D. FUHLING: *Occurrence of Cyanobacterial Toxins - Microcystins and Anatoxin-a - in Berlin Water Bodies With Implications to Human Health and Regulations*, Environ. Toxicol. **15** (2000) 120-130.
- [29] J. FASTNER, M. ERHARD, W. W. CARMICHAEL, F. SUN, K. L. RINEHART, H. ROENICKE, I. CHORUS: *Characterization and Diversity of Microcystins in Natural Blooms and Strains of the Genera Microcystis and Planktothrix from German Freshwaters*, Arch. Hydrobiol. **145** (1999) 147-163.
- [30] M. WELKER, S. HOEG, C. STEINBERG: *Hepatotoxic Cyanobacteria in the Shallow Lake Müggelsee*, Hydrobiologia **409** (1999) 263-268.
- [31] B. WIRSING, T. FLURY, C. WIEDNER, U. NEUMANN, J. WECKESSER: *Estimation of the Microcystin Content in Cyanobacterial Field Samples from German Lakes Using the Colorimetric Protein-Phosphatase Inhibition Assay and RP-HPLC*, Environ. Toxicol. **14** (1999) 23-29.
- [32] J. FASTNER, R. HEINZE, I. CHORUS: *Microcystin-Content, Hepatotoxicity and Cytotoxicity of Cyanobacteria in Some German Water Bodies*, Water Sci. Technol. **32** (1995) 165-170.
- [33] C. JAKOBI, K. L. RINEHART, G. A. CODD, I. CARMENKE, J. WECKESSER: *Occurrence of Toxic Water Blooms Containing Microcystins in a German Lake Over a Three Year Period*, System. Appl. Microbiol. **19** (1996) 249-254.
- [34] J. FASTNER, U. NEUMANN, B. WIRSING, J. WECKESSER, C. WIEDNER, B. NIXDORF, I. CHORUS: *Microcystins (Hepatotoxic Heptapeptides) in German Fresh Water Bodies*, Environ. Toxicol. **14** (1999) 13-22.
- [35] I. CHORUS: *Toxische Cyanobakterien in deutschen Gewässern - Verbreitung, Kontrollfaktoren und ökologische Bedeutung*, WaBoLu-Hefte, Berlin 1997.
- [36] *Keine Blaualgengefahr in Bayern*, Pressemitteilungen des Bayerischen Umweltministeriums, München 1997.
- [37] D. SCHAUMBURG: *Cyanobakterien in bayerischen Gewässern*, Persönliche Mitteilung, Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, München 1997.
- [38] *Schutz von Badenden vor Algentoxinen und Allergenen in Badegewässern durch Einhaltung der Anforderungen nach EG-Richtlinie*, Bundesgesundheitsblatt **35** (1992) 320.
- [39] I. R. FALCONER, M. D. BURCH, D. A. STEFFENSEN, M. CHOICE, O. R. COVERDALE: *Toxicity of the Blue-Green Alga (Cyanobacterium) Microcystis aeruginosa in Drinking Water to Growing Pigs, as an Animal Model for Human Injury and Risk Assessment*, Environ. Toxicol. Water Qual. **9** (1994) 131-139.

- [40] NHMRC/ARMCANZ: *Microcystins Fact Sheet No.17a*, in: Australian Drinking Water Guidelines, National Health and Medical Research Council, Canberra 2001.
- [41] K. RUDI, O. M. SKULBERG, F. LARSEN, K. S. JAKOBSEN: *Quantification of Toxic Cyanobacteria in Water by Use of Competitive PCR Followed by Sequence-Specific Labeling of Oligonucleotide Probes*, Appl. Environ. Microbiol. **64** (1998) 2639-2643.
- [42] K. SIVONEN, G. JONES: *Cyanobacterial Toxins*, in: Toxic Cyanobacteria in Water - A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management, I. Chorus, J. Bartram (Hrsg.), S. 41-111, E & FN Spon, London 1999.
- [43] E. D. DE SILVA, D. E. WILLIAMS, R. J. ANDERSEN, H. KLIX, C. F. B. HOLMES, T. M. ALLEN: *Motuporin, a Potent Protein Phosphatase Inhibitor Isolated from the Papua New Guinea Sponge Theonella swinhoei Gray*, Tetrahed. Lett. **33** (1992) 1561-1564.
- [44] Anagnostec GmbH: *MALDI-TOF Analysis of Cyanobacterial Peptides*, <http://www.anagnostec.de/cyanpep.htm>, Luckenwalde, Germany 2001.
- [45] W. W. CARMICHAEL: *The Cyanotoxins*, Adv. Bot. Res. **27** (1997) 211-256.
- [46] K. I. HARADA: *Chemistry and Detection of Microcystins*, in: Toxic Microcystis, M. F. Watanabe, K. I. Harada, W. W. Carmichael, H. Fujiki (Hrsg.), S. 103-149, CRC Press, Boca Raton 1996.
- [47] D. P. BOTES, A. A. TUINMAN, P. L. WESSELS, C. C. VILJOEN, H. KRUGER, D. H. WILLIAMS, S. SANTIKARN, R. J. SMITH, S. J. HAMMOND: *The Structure of Cyanoginosin-LA, a Cyclic Heptapeptide Toxin from the Cyanobacterium Microcystis aeruginosa*, J. Chem. Soc. Perkin Trans. **1** (1984) 2311-2318.
- [48] K. L. RINEHART, K. I. HARADA, M. NAMIKOSHI, C. CHEN, C. A. HARVIS, M. H. G. MUNROE, J. W. BLUNT, P. E. MULLIGAN, V. R. BEASLEY, A. M. DAHLEM, W. W. CARMICHAEL: *Nodularin, Microcystin, and the Configuration of Adda*, J. Americ. Chem. Soc. **110** (1988) 8557-8558.
- [49] M. NAMIKOSHI, K. L. RINEHART, A. DAHLEM, V. R. BEASLEY, W. W. CARMICHAEL: *Total Synthesis of ADDA, the Unique C20 Amino Acid of Cyanobacterial Hepatoxins*, Tetrahed. Lett. **30** (1989) 4349-4352.
- [50] T. K. CHAKRABORTY, S. P. JOSHI: *Total Synthesis of N-Phthaloyl ADDA Methyl Ester: All Stereocenters Originating from a Single Chiral Epoxyalcohol*, Tetrahed. Lett. **31** (1990) 2043-2046.
- [51] F. D'ANIELLO, A. MANN, M. TADDEI: *1,3-Stereocontrol with Bromoallenes. Synthesis of N-Boc-ADDA, the Unique Amino Acid Present in Several Inhibitors of Serine/Threonine Phosphatases*, J. Org. Chem. **61** (1996) 4870-4871.
- [52] N. SIN, J. KALLMERTEN: *Synthesis of (2S,3S,8S,9S)-Adda from D-Glucose*, Tetrahed. Lett. **37** (1996) 5645-5648.
- [53] F. D'ANIELLO, A. MANN, A. SCHOENFELDER, M. TADDEI: *Stereoconvergent Synthesis of (2S,3S,8S,9S,4E,6E)-N-Boc-ADDA Starting from (S)-Serine and (S)-Phenyllactic Acid*, Tetrahed. **53** (1997) 1447-1456.

- [54] D. J. CUNDY, A. C. DONOHUE, T. D. MCCARTHY: *Towards an Asymmetric Synthesis of ADDA Conjugates*, Tetrahed. Lett. **39** (1998) 5125-5128.
- [55] D. J. CUNDY, A. C. DONOHUE, T. D. MCCARTHY: *An Asymmetric Synthesis of ADDA and ADDA-Glycine Dipeptide Using the Beta-Lactam Synthone Method*, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 (1999) 559-567.
- [56] J. M. HUMPHREY, J. B. AGGEN, A. R. CHAMBERLIN: *Total Synthesis of the Serine-Threonine Phosphatase Inhibitor Microcystin-LA*, J. Americ. Chem. Soc. **118** (1996) 11759-11770.
- [57] R. SAMY, H. Y. KIM, M. BRADY, P. L. TOOGOOD: *Total Synthesis of Motuporin and 5-[L-Ala]-Motuporin*, J. Org. Chem. **64** (1999) 2711-2728.
- [58] J. GOLDBERG, H. B. HUANG, Y. G. KWON, P. GREENGARD, A. C. NAIRN, J. KURIYAN: *Three-Dimensional Structure of the Catalytic Subunit of Protein Serine/Threonine Phosphatase-1*, Nature **376** (1995) 745-753.
- [59] J. R. BAGU, F. D. SÖNNICHSEN, D. WILLIAMS, R. J. ANDERSEN, B. D. SYKES, C. F. B. HOLMES: *Comparison of the Solution Structures of Microcystin-LR and Motuporin*, Struct. Biol. **2** (1995) 114-116.
- [60] A. ANNILA, J. LEHTIMAKI, K. MATTILA, J. E. ERIKSSON, K. SIVONEN, T. T. RANTALA, T. DRAKENBERG: *Solution Structure of Nodularin - An Inhibitor of Serine/Threonine-Specific Protein Phosphatases*, J. Biol. Chem. **271** (1996) 16695-16702.
- [61] Fachlexikon ABC Chemie, Brockhaus Verlag, Leipzig 1987.
- [62] J. E. ERIKSSON, L. GRÖNBERG, S. NYGARD, J. P. SLOTTE, J. A. O. MERILUOTO: *Hepatocellular Uptake of 3H-Dihydromicrocystin-LR a Cyclic Peptide Toxin*, Biochim. Biophys. Acta **1025** (1990) 60-66.
- [63] M. RUNNEGAR, N. BERNDT, N. KAPLOWITZ: *Microcystin Uptake and Inhibition of Protein Phosphatases: Effects of Chemoprotectants and Self-Inhibition in Relation to Known Hepatic Transporters*, Toxicol. Appl. Pharmacol. **134** (1995) 264-272.
- [64] K. L. RINEHART, M. NAMIKOSHI, B. W. CHOI: *Structure and Biosynthesis of Toxins from Blue-Green Algae (Cyanobacteria)*, J. Appl. Phycol. **6** (1994) 159-176.
- [65] B. C. NICHOLSON, J. ROSITANO: *The Chemistry of Freshwater Algal Toxins*, Chemistry in Australia (1992) 452-454.
- [66] F. Y. I. KONDO, H. OKA, M. OKUMURA, N. ISHIKAWA, K. I. HARADA, K. MATSUURA, H. MURATA, M. SUZUKI: *Formation, Characterization, and Toxicity of the Glutathione and Cysteine Conjugates of Toxic Heptapeptide Microcystins*, Chem. Res. Toxicol. **5** (1992) 591-596.
- [67] J. K. FAWELL, R. E. MITCHELL, D. J. EVERETT, R. E. HILL: *The Toxicity of Cyanobacterial Toxins in the Mouse: I Microcystin-LR*, Human Exp. Toxicol. **18** (1999) 162-167.
- [68] R. M. DAWSON: *The Toxicology of Microcystins - Review Article*, Toxicon **36** (1998) 953-962.

- [69] F. KONDO, H. MATSUMOTO, S. YAMADA, N. ISHIKAWA, E. ITO, S. NAGATA, Y. UENO, M. SUZUKI, K. HARADA: *Detection and Identification of Metabolites of Microcystins Formed In Vivo in Mouse and Rat Livers*, Chem. Res. Toxicol. **9** (1996) 1355-1359.
- [70] WHO: *Water, Sanitation and Health - Guidelines for Drinking Water Quality*, in: Health Criteria and other Supporting Information, S. 940-949, 1996 und Nachtrag von 1998, S. 281-283, World Health Organization (Hrsg.), Genf 1996 und Nachtrag 1998.
- [71] R. HEINZE: *Toxicity of the Cyanobacterial Toxin Microcystin-LR to Rats After 28 Days Intake With the Drinking Water*, Environ. Toxicol. **14** (1999) 57-60.
- [72] Y. UENO, Y. MAKITA, S. NAGATA, T. TSUTSUMI, F. YOSHIDA, S. TAMURA, M. SEKIJIMA, F. TASHIRO, T. HARADA, T. YOSHIDA: *No Chronic Oral Toxicity of a Low Dose of Microcystin-LR, a Cyanobacterial Hepatotoxin, in Female BALB/c Mice*, Environ. Toxicol. **14** (1999) 45-55.
- [73] R. NISHIWAKI-MATSUSHIMA, T. OHTA, S. NISHIWAKI, M. SUGANUMA, K. KOHYAMA, T. ISHIKAWA, W. W. CARMICHAEL, H. FUJIKI: *Liver Tumor Promotion by the Cyanobacterial Cyclic Peptide Toxin Microcystin-LR*, J. Cancer Res. Clin. Oncol. **118** (1992) 420-424.
- [74] T. OHTA, E. SUEOKA, N. IIDA, A. KOMORI, M. SUGANUMA, R. NISHIWAKI, M. TATEMATSU, S. J. KIM, W. W. CARMICHAEL, H. FUJIKI: *Nodularin, a Potent Inhibitor of Protein Phosphatases 1 and 2A, is a New Environmental Carcinogen in Male F344 Rat Liver*, Cancer Res. **54** (1994) 6402-6.
- [75] H. FUJIKI, E. SUEOKA, M. SUGANUMA: *Carcinogenesis of Microcystins*, in: Toxic Microcystis, M. F. Watanabe, K. I. Harada, W. W. Carmichael, H. Fujiki (Hrsg.), S. 203-233, CRC Press, Boca Raton 1996.
- [76] J. ROSITANO, B. C. NICHOLSON, P. PIERONNE: *Destruction of Cyanobacterial Toxins by Ozone*, Ozone Sci. Eng. **20** (1998) 223-238.
- [77] B. C. NICHOLSON, J. ROSITANO, M. D. BURCH: *Destruction of Cyanobacterial Peptide Hepatotoxins by Chlorine and Chloramine*, Water Res. **28** (1994) 1297-1303.
- [78] K. TSUJI, T. WATANUKI, F. KONDO, M. F. WATANABE, H. NAKAZAWA, M. SUZUKI, H. UCHIDA, K. I. HARADA: *Stability of Microcystins from Cyanobacteria - 4. Effect of Chlorination on Decomposition*, Toxicon **35** (1997) 1033-1041.
- [79] K. KAYA, T. SANO: *A Photodetoxification Mechanism of the Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin-LR by Ultraviolet Irradiation*, Chem. Res. Toxicol. **11** (1998) 159-163.
- [80] K. TSUJI, T. WATANUKI, F. KONDO, M. F. WATANABE, S. SUZUKI, H. NAKAZAWA, M. SUZUKI, H. UCHIDA, K. I. HARADA: *Stability of Microcystins from Cyanobacteria: II. Effect of UV Light on Decomposition and Isomerization*, Toxicon **33** (1995) 1619-1631.
- [81] G. S. SHEPHARD, S. STOCKENSTROM, D. DEVILLIERS, W. J. ENGELBRECHT, E. W. SYDENHAM, G. F. S. WESSELS: *Photocatalytic Degradation of Cyanobacterial Microcystin Toxins in Water*, Toxicon **36** (1998) 1895-1901.

- [82] K. TSUJI, S. NAITO, F. KONDO, N. ISHIKAWA, M. F. WATANABE, M. SUZUKI, K. I. HARADA: *Stability of Microcystins from Cyanobacteria: Effect of Light on Decomposition and Isomerization*, Environ. Sci. Technol. **28** (1994) 173-177.
- [83] K. LAHTI, J. RAPALA, M. FARDIG, M. NIEMELA, K. SIVONEN: *Persistence of Cyanobacterial Hepatotoxin, Microcystin-LR in Particulate Material and Dissolved in Lake Water*, Water Res. **31** (1997) 1005-1012.
- [84] K. I. HARADA, K. TSUJI, M. F. WATANABE, F. KONDO: *Stability of Microcystins from Cyanobacteria - III. Effect of pH and Temperature*, Phycologia **35** (1996) 83-88.
- [85] D. G. BOURNE, G. J. JONES, R. L. BLAKELEY, A. JONES, A. P. NEGRI, P. RIDDLES: *Enzymatic Pathway for the Bacterial Degradation of the Cyanobacterial Cyclic Peptide Toxin Microcystin LR*, Appl. Environ. Microbiol. **62** (1996) 4086-4094.
- [86] T. HERESZTYN, B. C. NICHOLSON: *Nodularin Concentrations in Lakes Alexandrina and Albert, South Australia, During a Bloom of the Cyanobacterium (Blue-Green Alga) Nodularia spumigena and Degradation of the Toxin*, Environ. Toxicol. Water Qual. **12** (1997) 273-282.
- [87] S. HRUDEY, M. BURCH, M. DRIKAS, R. GREGORY: *Remedial Measures*, in: Toxic Cyanobacteria in Water - A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management, I. Chorus, J. Bartram (Hrsg.), S. 275-312, E & FN Spon, London 1999.
- [88] W. SCHMIDT: *Trinkwasseraufbereitung aus algenbürtigen Wässern*, Energie Wasser Praxis **3** (2001) 28-29.
- [89] H. UTKILEN, J. FASTNER, J. BARTRAM: *Fieldwork: Site Inspection and Sampling*, in: Toxic Cyanobacteria in Water - A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management, I. Chorus, J. Bartram (Hrsg.), S. 329-345, E & FN Spon, London 1999.
- [90] L. LAWTON, M. BLAHOŠLAV, J. PADISAK, I. CHORUS: *Determination of Cyanobacteria in the Laboratory*, in: Toxic Cyanobacteria in Water - A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management, I. Chorus, J. Bartram (Hrsg.), S. 347-367, E & FN Spon, London 1999.
- [91] J. S. METCALF, G. A. CODD: *Microwave Oven and Boiling Waterbath Extraction of Hepatotoxins from Cyanobacterial Cells*, FEMS Microbiol. Lett. **184** (2000) 241-246.
- [92] A. EIKENBERG: *Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern zur Detektion von Microcystinen*, Diplomarbeit, Universität Stuttgart, 2000.
- [93] J. MERILUOTO: *Chromatography of Microcystins*, Anal. Chim. Acta **352** (1997) 277-298.
- [94] L. A. LAWTON, C. EDWARDS, G. A. CODD: *Extraction and High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Microcystins in Raw and Treated Waters*, Analyst **119** (1994) 1525-1530.

- [95] R. W. MOOLLAN, B. RAE, A. VERBEEK: *Some Comments on the Determination of Microcystin Toxins in Waters by High-Performance Liquid Chromatography*, Analyst **121** (1996) 233-238.
- [96] K. TSUJI, S. NAITO, F. KONDO, M. F. WATANABE, S. SUZUKI, H. NAKAZAWA, M. SUZUKI, T. SHIMADA, K. I. HARADA: *A Clean-Up Method for Analysis of Trace Amounts of Microcystins in Lake Water*, Toxicon **32** (1994) 1251-1259.
- [97] R. P. GREGSON, R. R. LOHR: *Isolation of Peptide Hepatotoxins from the Blue-Green Alga *Microcystis aeruginosa**, Comp. Biochem. Physiol. **74C** (1983) 413-417.
- [98] T. KRISHNAMURTHY, W. W. CARMICHAEL, E. W. SARVER: *Toxic Peptides from Freshwater Cyanobacteria (Blue-Green Algae) . I. Isolation, Purification and Characterization of Peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae**, Toxicon **24** (1986) 865-873.
- [99] W. P. BROOKS, G. A. CODD: *Extraction and Purification of Toxic Peptides from Natural Blooms and Laboratory Isolates of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa**, Lett. Appl. Microbiol. **2** (1986) 1-3.
- [100] M. NAMIKOSHI, K. L. RINEHART, R. SAKAI, A. M. STOTTS, V. R. DAHLEM, V. R. BEASLEY, K. SIVONEN, W. W. CARMICHAEL, W. R. EVANS: *Identification of 12 Hepatotoxins from a Homer Lake Bloom of the Cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, and *Microcystis wesenbergii*: Nine New Microcystins*, J. Org. Chem. **57** (1992) 866-872.
- [101] C. HUMMERT, M. REICHEL, C. LEGRAND, E. GRANELI, B. LUCKAS: *Rapid Clean-Up and Effective Sample Preparation Procedure for Unambiguous Determination of the Cyclic Peptides Microcystin and Nodularin*, Chromatographia **50** (1999) 173-180.
- [102] C. RIVASSEAU, M. C. HENNION: *Potential of Immunoextraction Coupled to Analytical and Bioanalytical Methods (Liquid Chromatography, ELISA Kit and Phosphatase Inhibition Test) for an Improved Environmental Monitoring of Cyanobacterial Toxins*, Anal. Chim. Acta **399** (1999) 75-87.
- [103] F. KONDO, H. MATSUMOTO, S. YAMADA, K. TSUJI, Y. UENO, K. HARADA: *Immunoaffinity Purification Method for Detection and Quantification of Microcystins in Lake Water*, Toxicon **38** (2000) 813-823.
- [104] T. TSUTSUMI, S. NAGATA, A. HASEGAWA, Y. UENO: *Immunoaffinity Column as Clean-up Tool for Determination of Trace Amounts of Microcystins in Tap Water*, Food Chem. Toxicol. **38** (2000) 593-597.
- [105] K. I. HARADA, K. MATSUURA, M. SUZUKI, M. F. WATANABE, S. OISHI, A. M. DAHLEM, V. R. BEASLEY, W. W. CARMICHAEL: *Isolation and Characterization of the Minor Components Associated with Microcystins LR and RR in the Cyanobacterium (Blue-Green Algae)*, Toxicon **28** (1990) 55-64.
- [106] K. I. HARADA, M. SUZUKI, A. M. DAHLEM, V. R. BEASLEY, W. W. CARMICHAEL, K. L. J. RINEHART: *Improved Method for Purification of Toxic Peptides Produced by Cyanobacteria*, Toxicon **26** (1988) 433-440.

- [107] G. WINKLER: *Increasing the Sensitivity of UV Detection in Protein and Peptide Separations when Using TFA-Acetonitrile Gradients*, LC/GC **5** (1987) 1044-1045.
- [108] Vydac (The Separations Group): *The Handbook of Analysis and Purification of Peptides and Proteins by Reversed-Phase HPLC*, Vydac, Hesperia, CA, USA 1995.
- [109] K. I. HARADA, K. MATSUURA, M. SUZUKI, H. OKA, M. F. WATANABE, S. OISHI, A. M. DAHLEM, V. R. BEASLEY, W. W. CARMICHAEL: *Analysis and Purification of Toxic Peptides from Cyanobacteria by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*, J. Chromatogr. **448** (1988) 275-283.
- [110] K. I. HARADA, M. OSHIKATA, T. SHIMADA, A. NAGATA, N. ISHIKAWA, M. SUZUKI, F. KONDO, M. SHIMIZU, S. YAMADA: *High-Performance Liquid Chromatographic Separation of Microcystins Derivatized with a Highly Fluorescent Dienophile*, Natural Toxins **5** (1997) 201-207.
- [111] H. MURATA, H. SHOJI, M. OSHIKATA, K. I. HARADA, M. SUZUKI, F. KONDO, H. GOTO: *High-Performance Liquid Chromatography with Chemiluminescence Detection of Derivatized Microcystins*, J. Chromatogr. A **693** (1995) 263-270.
- [112] P. S. GATHERCOLE, P. G. THIEL: *Liquid Chromatography Determination of the Cyanoginosins, Toxins Produced by the Cyanobacterium Microcystins aeruginosa*, J. Chromatogr. **408** (1987) 435-440.
- [113] J. MERILUOTO: *Liquid Chromatographic Analysis of Cyanobacterial Peptide Hepatotoxins*, in: Acta Academiae Aboensis, Ser. B, G. Högnas (Hrsg.), S. 1-32, Abo Akademis Förlag (Abo Academy Press), Abo 1990.
- [114] K. KAYA, T. SANO: *Total Microcystin Determination Using Erythro-2-methyl-3-(methoxy-d(3))-4-phenylbutyric Acid (MMPB-d(3)) as the Internal Standard*, Anal. Chim. Acta **386** (1999) 107-112.
- [115] K. I. HARADA, H. MURATA, Z. QIANG, M. SUZUKI, F. KONDO: *Mass-Spectrometric Screening Method for Microcystins in Cyanobacteria*, Toxicon **34** (1996) 701-710.
- [116] H. SIREN, M. JUSSILA, H. W. LIU, S. PELTONIEMI, K. SIVONEN, M. L. RIEKKOLA: *Separation, Purity Testing and Identification of Cyanobacterial Hepatotoxins with Capillary Electrophoresis and Electrospray Mass Spectrometry*, J. Chromatogr. A **839** (1999) 203-215.
- [117] J. WILSON, M. W. RAYNOR, B. RAE: *Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography of Algal Toxins*, J. High Resol. Chromatogr. **20** (1997) 34-38.
- [118] P. C. H. LI, S. HU, P. K. S. LAM: *Development of a Capillary Zone Electrophoretic Method for the Rapid Separation and Detection of Hepatotoxic Microcystins*, Marine Pollut. Bull. **39** (1999) 250-254.
- [119] I. OJANPERÄ, A. PELANDER, E. VUORI, K. HIMBERG, M. WARIS, K. NIINIVAARA: *Detection of Cyanobacterial Hepatotoxins by TLC*, J. Planar Chromatogr. **8** (1995) 69-72.

- [120] A. PELANDER, I. OJANPERA, K. SIVONEN, K. HIMBERG, M. WARIS, K. NIINIVAARA, E. VUORI: *Screening for Cyanobacterial Toxins in Bloom and Strain Samples by Thin Layer Chromatography*, Water Res. **30** (1996) 1464-1470.
- [121] A. PELANDER, I. OJANPERA, K. LAHTI, K. NIINIVAARA, E. VUORI: *Visual Detection of Cyanobacterial Hepatotoxins by Thin-Layer Chromatography and Application to Water Analysis*, Water Res. **34** (2000) 2643-2652.
- [122] K. I. HARADA, F. KONDO, L. LAWTON: *Laboratory Analysis of Cyanotoxins*, in: Toxic Cyanobacteria in Water - A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management, I. Chorus and J. Bartram (Hrsg.), S. 369-405, E & FN Spon, London 1999.
- [123] S. SHENOLIKAR: *Protein Serin/Threonine Phosphatases - New Avenues for Cell Regulation*, Annu. Rev. Cell Biol. **10** (1994) 55-86.
- [124] M. CRAIG, H. A. LUU, T. L. MCCREADY, D. WILLIAMS, R. J. ANDERSEN, C. F. B. HOLMES: *Molecular Mechanisms Underlying the Interaction of Motuporin and Microcystins with Type-1 and Type-2A Protein Phosphatases*, Biochem. Cell Biol. **74** (1996) 569-578.
- [125] J. AN, W. W. CARMICHAEL: *Use of a Colorimetric Protein Phosphatase Inhibition Assay and Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the Study of Microcystins and Nodularins*, Toxicon **32** (1994) 1495-1507.
- [126] C. J. WARD, K. A. BEATTIE, E. Y. LEE, G. A. CODD: *Colorimetric Protein Phosphatase Inhibition Assay of Laboratory Strains and Natural Blooms of Cyanobacteria: Comparisons with High-Performance Liquid Chromatographic Analysis for Microcystins*, FEMS Microbiol. Lett. **153** (1997) 465-73.
- [127] C. RIVASSEAU, P. RACAUD, A. DEGUIN, M. C. HENNION: *Development of a Bioanalytical Phosphatase Inhibition Test for the Monitoring of Microcystins in Environmental Water Samples*, Anal. Chim. Acta **394** (1999) 243-257.
- [128] T. HERESZTYN, B. C. NICHOLSON: *Determination of Cyanobacterial Hepatotoxins Directly in Water Using a Protein Phosphatase Inhibition Assay*, Water Res. **35** (2001) 3049-3056.
- [129] T. HERESZTYN, B. C. NICHOLSON: *A Colorimetric Protein Phosphatase Inhibition Assay for the Determination of Cyanobacterial Peptide Hepatotoxins Based on the Dephosphorylation of Phosvitin by Recombinant Protein Phosphatase 1*, Environ. Toxicol. **16** (2001) 242-252.
- [130] O. I. FONTAL, M. R. VIEYTES, B. J. M. V. DE SOUSA, M. C. LOUZAO, L. M. BOTANA: *A Fluorescent Microplate Assay for Microcystin-LR*, Anal. Biochem. **269** (1999) 289-296.
- [131] S. YOSHIZAWA, R. MATSUSHIMA, M. F. WATANABE, K.-I. HARADA, A. ICHIHARA, W. W. CARMICHAEL, H. FUJIKI: *Inhibition of Protein Phosphatases by Microcystis and Nodularin Associated With Hepatotoxicity*, J. Cancer Res. Clin. Oncol. **116** (1990) 609-614.

- [132] R. E. HONKANEN, J. ZWILLER, R. E. MOORE, S. L. DAILY, B. S. KHATRA, M. DUKELOW, A. L. BOYNTON: *Characterization of Microcystin-LR, a Potent Inhibitor of Type 1 and Type 2A Protein Phosphatase*, J. Biol. Chem. **265** (1990) 19401-19404.
- [133] J. E. ERIKSSON, D. TOIVOLA, J. A. O. MERILUOTO, H. KARAKI, Y. G. HAN, D. HARTSHORNE: *Hepatocyte Deformation Induced by Cyanobacterial Toxins Reflects Inhibition of Protein Phosphatases*, Biochem. Biophys. Res. Commun. **173** (1990) 1347-1353.
- [134] T. W. LAMBERT, M. P. BOLAND, C. F. B. HOLMES, S. E. HRUDEY: *Quantitation of the Microcystin Hepatotoxins in Water at Environmentally Relevant Concentrations with the Protein Phosphatase Bioassay*, Environ. Sci. Technol. **28** (1994) 753-755.
- [135] C. MACKINTOSH, R. W. MACKINTOSH: *The Inhibition of Protein Phosphatases by Toxins: Implications for Health and an Extremely Sensitive and Rapid Bioassay for Toxin Detection*, in: Detection Methods for Cyanobacterial Toxins, G. A. Codd, T. M. Jefferies, C. W. Keevil, E. Potter (Hrsg.), S. 90-99, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK 1994.
- [136] Y. SUGIYAMA, K. FUJIMOTO, I. I. OHTANI, A. TAKAI, M. ISOBE: *Sensitive Analysis of Protein Phosphatase Inhibitors by the Firefly Bioluminescence System: Application to PP1-gamma*, Biosci. Biotech. Biochem. **60** (1996) 1260-1264.
- [137] J. SANVOISIN, J. R. POLLARD, P. HORMOZDIARI, W. H. J. WARD, D. GANI: *A Generic Medium Throughput Activity Assay Procedure for Serine-Threonine Protein Phosphatases Using ¹⁴C-Labelled N-Acetyl-Arg-Arg-Ala-Thr(P)-Val-Ala*, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 (2001) 1709-1715.
- [138] J. S. METCALF, K. A. BEATTIE, S. PFLUGMACHER, G. A. CODD: *Immuno-Crossreactivity and Toxicity Assessment of Conjugation Products of the Cyanobacterial Toxin, Microcystin-LR*, FEMS Microbiol. Lett. **189** (2000) 155-158.
- [139] U. K. SWOBODA, C. S. DOW, J. CHAIVIMOL, N. SMITH, B. P. POUND: *Alternatives to the Mouse Bioassay for Cyanobacterial Toxicity Assessment*, in: Detection Methods For Cyanobacterial Toxins, G. A. Codd, T. M. Jefferies, C. W. Keevil, E. Potter (Hrsg.), S. 106-110, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK 1994.
- [140] J. CHAIVIMOL, U. K. SWOBODA, C. S. DOW: *Phosphatase Assay as a Determinant of Hepatotoxin Toxicity*, in: Detection Methods for Cyanobacterial Toxins, G. A. Codd, T. M. Jefferies, C. W. Keevil, E. Potter (Hrsg.), S. 172-174, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK 1994.
- [141] M. H. SERRES, K. E. FLADMARK, S. O. DOSKELAND: *An Ultrasensitive Competitive Binding Assay for the Detection of Toxins Affecting Protein Phosphatases*, Toxicon **38** (2000) 347-360.
- [142] M. S. YANG, P. K. S. LAM, M. H. HUANG, B. S. F. WONG: *Effects of Microcystins on Phosphorylase-a Binding to Phosphatase-2A: Kinetic Analysis by Surface Plasmon Resonance Biosensor*, Biochim. Biophys. Acta **14** (1999) 62-73.

- [143] R. KFIR, E. JOHANNSEN, D. P. BOTES: *Preparation of Anti-Cyanoginosin-LA Monoclonal Antibody*, Sixth International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Pretoria 1985.
- [144] R. KFIR, E. JOHANNSEN, D. P. BOTES: *Monoclonal Antibody Specific for Cyanoginosin LA: Preparation and Characterization*, Toxicon **24** (1986) 543-552.
- [145] F. S. CHU, X. HUANG, R. D. WEI, W. W. CARMICHAEL: *Production and Characterization of Antibodies Against Microcystins*, Appl. Environ. Microbiol. **55** (1989) 1928-1933.
- [146] F. S. CHU, X. HUANG, R. D. WEI: *ELISA for Microcystins in Blue-Green Algal Blooms*, J. Assoc. Off. Anal. Chem. **73** (1990) 451-456.
- [147] B. H. LIU, F. Y. YU, F. S. CHU: *Anti-Idiotypic and Anti-Anti-Idiotypic Antibodies Generated from Polyclonal Antibodies Against Microcystin-LR*, J. Agric. Food Chem. **44** (1996) 4037-4042.
- [148] C. M. MCDERMOTT, R. FEOLA, J. PLUDE: *Detection of Cyanobacterial Toxins (Microcystins) in Waters of Northeastern Wisconsin by a New Immunoassay Technique*, Toxicon **33** (1995) 1433-1442.
- [149] S. NAGATA, H. SOUTOME, T. TSUTSUMI, A. HASEGAWA, M. SEKIJIMA, M. SUGAMATA, K. I. HARADA, M. SUGANUMA, Y. UENO: *Novel Monoclonal Antibodies Against Microcystin and their Protective Activity for Hepatotoxicity*, Natural Toxins **3** (1995) 78-86.
- [150] Y. UENO, S. NAGATA: *ELISA Analysis of Microcystins, Algal Hepatotoxins, in Environmental Water*, Toxicon **35** (1997) 482-483.
- [151] T. TSUTSUMI, S. NAGATA, F. YOSHIDA, K. I. HARADA, Y. UENO: *Development and Application of Highly Sensitive Anti-Immune Complex ELISAs for Microcystins in Tap Water*, Food Agric. Immunol. **12** (2000) 231-241.
- [152] Strategic Diagnostics Inc. (SDI): *EnviroGard Microcystins Plate Kit*, <http://www.sdix.com>, Newark, Delaware, USA 1997.
- [153] C. RIVASSEAU, P. RACAUD, A. DEGUIN, M. C. HENNION: *Evaluation of an ELISA Kit for the Monitoring of Microcystins (Cyanobacterial Toxins) in Water and Algae Environmental Samples*, Environ. Sci. Technol. **33** (1999) 1520-1527.
- [154] J. S. METCALF, P. HYENSTRAND, K. A. BEATTIE, G. A. CODD: *Effects of Physicochemical Variables and Cyanobacterial Extracts on the Immunoassay of Microcystin-LR by Two ELISA Kits*, J. Appl. Microbiol. **89** (2000) 532-538.
- [155] I. GARTHWAITE, C. O. MILES, K. M. ROSS, N. R. TOWERS, W. FISCHER, D. DIETRICH, A. R. CHAMBERLAIN, J. B. AGGEN: *An ELISA with Broad Specificity for Cyanobacterial Hepatotoxins*, The Fifth International Conference on Agri-Food Antibodies 1999, Norwich 1999.
- [156] Envirologix Inc., Microcystin Plate Kit EP 022, Portland, Maine, USA, 1999.

- [157] W. BAIER, M. LOLEIT, B. FISCHER, G. JUNG, U. NEUMANN, M. WEISS, J. WECKESSER, P. HOFFMANN, W. G. BESSLER, K. MITTENBUHLER: *Generation of Antibodies Directed Against the Low-Immunogenic Peptide-Toxins Microcystin-LR/RR and Nodularin*, Int. J. Immunopharmacol. **22** (2000) 339-353.
- [158] J. S. METCALF, S. G. BELL, G. A. CODD: *Production of Novel Polyclonal Antibodies Against the Cyanobacterial Toxin Microcystin-LR and Their Application for the Detection and Quantification of Microcystins and Nodularin*, Water Res. **34** (2000) 2761-2769.
- [159] J. MCELHINEY, L. A. LAWTON, A. J. R. PORTER: *Detection and Quantification of Microcystins (Cyanobacterial Hepatotoxins) with Recombinant Antibody Fragments Isolated From a Naive Human Phage Display Library*, FEMS Microbiol. Lett. **193** (2000) 83-88.
- [160] A. MIKHAILOV, A. S. HARMALA-BRASKEN, J. MERILUOTO, Y. SOROKINA, D. DIETRICH, J. E. ERIKSSON: *Production and Specificity of Mono and Polyclonal Antibodies Against Microcystins Conjugated Through N-Methyldehydroalanine*, Toxicon **39** (2001) 477-483.
- [161] P. MEHTO, M. ANKELO, A. HINKKANEN, M. A. J. E. ERIKSSON, L. SPOOF, J. MERILUOTO: *A Time-Resolved Fluoroimmometric Assay for the Detection of Microcystins, Cyanobacterial Peptide Hepatotoxins*, Toxicon **39** (2001) 831-836.
- [162] M. NAMIKOSHI, F. SUN, B. W. CHOI, K. L. RINEHART: *Seven More Microcystins from Homer Lake Cells: Application of the General Method for Structure Assignment of Peptides Containing α,β -Dehydroamino Acid Unit(s)*, J. Org. Chem. **60** (1995) 3671-3679.
- [163] F. KONDO, Y. IKAI, H. OKA, N. ISHIKAWA, M. F. WATANABE, M. WATANABE, K. I. HARADA, M. SUZUKI: *Separation and Identification of Microcystins in Cyanobacteria by Frit-Fast Atom Bombardment Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*, Toxicon **30** (1992) 227-237.
- [164] F. KONDO, Y. IKAI, H. OKA, H. MATSUMOTO, S. YAMADA, N. ISHIKAWA, K. TSUJI, K. I. HARADA, T. SHIMADA, M. OSHIKATA, M. SUZUKI: *Reliable and Sensitive Method for Determination of Microcystins in Complicated Matrices by Frit-Fast Atom Bombardment Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*, Natural Toxins **3** (1995) 41-49.
- [165] C. EDWARDS, L. A. LAWTON, K. A. BEATTIE, G. A. CODD, S. PLEASANCE, G. J. DEAR: *Analysis of Microcystins from Cyanobacteria by Liquid Chromatography with Mass Spectrometry Using Atmospheric-Pressure Ionization*, Rapid Commun. Mass Spectrom. **7** (1993) 714-721.
- [166] G. K. POON, L. J. GRIGGS: *Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry of Cyanobacterial Toxins*, J. Chromatogr. **628** (1993) 215-233.

- [167] K. P. BATEMAN, P. THIBAUT, D. J. DOUGLAS, R. L. WHITE: *Mass Spectral Analyses of Microcystins From Toxic Cyanobacteria Using On-Line Chromatographic and Electrophoretic Separations*, J. Chromatogr. A **712** (1995) 253-268.
- [168] M. YUAN, M. NAMIKOSHI, A. OTSUKI, K. SIVONEN: *Effect of Amino Acid Side-Chain on Fragmentation of Cyclic Peptide Ions: Differences of Electrospray Ionization Collision-Induced Decomposition Mass Spectra of Toxic Heptapeptide Microcystins Containing ADMAdda Instead of Adda*, Europ. Mass Spectrom. **4** (1998) 287-298.
- [169] M. YUAN, M. NAMIKOSHI, A. OTSUKI, K. L. RINEHART, K. SIVONEN, M. F. WATANABE: *Low-Energy Collisionally Activated Decomposition and Structural Characterization of Cyclic Heptapeptide Microcystins by Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, J. Mass Spectrom. **34** (1999) 33-43.
- [170] M. YUAN, M. NAMIKOSHI, A. OTSUKI, M. F. WATANABE, K. L. RINEHART: *Electrospray Ionization Mass Spectrometric Analysis of Microcystins, Cyclic Heptapeptide Hepatotoxins: Modulation of Charge States and $[M+H]^+$ to $[M+Na]^+$ Ratio*, J. Am. Soc. Mass Spectrom. **10** (1999) 1138-1151.
- [171] I. R. SHERLOCK, K. J. JAMES, F. B. CAUDWELL, C. MACKINTOSH: *First Identification of Microcystins in Irish Lakes Aided by a New Derivatisation Procedure for Electrospray Mass Spectrometric Analysis*, Natural Toxins **5** (1997) 247-254.
- [172] V. HORMAZABAL, O. OSTENSVIK, B. UNDERDAL, O. M. SKULBERG: *Simultaneous Determination of the Cyanotoxins Anatoxin A, Microcystin Desmethyl-3, LR, RR, and YR in Fish Muscle Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. **23** (2000) 185-196.
- [173] N. J. LOFTUS, M. W. POWELL: Analysis of Environmental Toxins in Drinking Water by LC/MS, Application Note Nr. An 505, version 6, Finnigan, Manchester, www.finnigan.co.uk.
- [174] M. ERHARD, H. VON DÖHREN, P. JUNGBLUT: *Rapid Typing and Elucidation of New Secondary Metabolites of Intact Cyanobacteria Using MALDI-TOF Mass Spectrometry*, Nature Biotech. **15** (1997) 906-909.
- [175] C. ROBILLOT, J. VINH, S. PUISEUX-DAO, M. C. HENNION: *Hepatotoxin Production Kinetics of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, as Determined by HPLC-Mass Spectrometry and Protein Phosphatase Bioassay*, Environ. Sci. Technol. **34** (2000) 3372-3378.
- [176] M. I. ROITT: Leitfaden der Immunologie, 4. Aufl., S. 67-86, Blackwell Wissenschaft, Berlin 1993.
- [177] R. HUBER: *Structural Basis for Antigen-Antibody Recognition*, Science **233** (1986) 702-703.
- [178] R. F. KELLY, M. P. O'CONNEL: *Thermodynamic Analysis of an Antibody Functional Epitope*, Biochem. **32** (1993) 6828-6835.

- [179] D. TELLO, F. A. GOLDBAUM, R. A. MARIUZZA, X. YSERN, F. P. SCHWARZ, R. J. POLJAK: *Three-Dimensional Structure and Thermodynamics of Antigen Binding by Anti-Lysozyme Antibodies*, Biochem. Soc. Trans. **21** (1993) 943-946.
- [180] D. M. WEBSTER, A. H. HENRY, A. R. REES: *Antibody-Antigen Interactions*, Curr. Opin. Struct. Biol. **4** (1994) 123-129.
- [181] A. SKERRA: *Strukturelle Einblicke in die Affinitätsreifung eines Antikörpers*, Chemie in unserer Zeit **31** (1997) 250-251.
- [182] G. J. WEDEMAYER, P. A. PATTEN, L. H. WANG, P. G. SCHULTZ, R. C. STEVENS: *Structural Insights into the Evolution of an Antibody Combining Site*, Science **276** (1997) 1665-1669.
- [183] L. STRYER: Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1991.
- [184] J. H. PETERS, H. BAUMGARTEN: Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung, Springer, Berlin 1990.
- [185] F. SZURDOKI, H. K. M. BEKHEIT, M.-P. MARCO, M. H. GOODROW, B. D. HAMMOCK: *Important Factors in Hapted Design and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Development*, in: New Frontiers in Agrochemical Immunoassay, D. A. Kurtz, J. H. Skerritt, L. Stanker (Hrsg.), S. 39-63, AOAC International, Arlington 1995.
- [186] W. O. WEIGELE: *Immunochemical Properties of Hemocyanin*, Immunochem. **1** (1964) 295-303.
- [187] J. MARCUSSEN, C. POULSEN: *A Nondestructive Method for Peptide Bond Conjugation of Antigenic Haptens to a Diphtheria Toxoid Carrier, Exemplified by Two Antisera Specific to Acetolactate Synthase*, Anal. Biochem. **198** (1991) 318-323.
- [188] A. F. VERHEUL, J. T. POOLMAN, H. SNIPPE, J. VERHOEF: *The Influence of the Adjuvant Quil A on the Epitope Specificity of Meningococcal Lipopolysaccharide Anti-Carbohydrate Antibodies*, Mol. Immunol. **28** (1991) 1193-1200.
- [189] J. I. AZCONA OLIVERA, M. M. ABOUZIED, R. D. PLATTNER, W. P. NORRED, J. J. PESTKA: *Generation of Antibodies Reactive with Fumonisin B1, B2, and B3 by Using Cholera Toxin as the Carrier-Adjuvant*, Appl. Environ. Microbiol. **58** (1992) 169-173.
- [190] M. M. ABOUZIED, J. I. AZCONA OLIVERA, T. YOSHIZAWA, J. J. PESTKA: *Production of Polyclonal Antibodies to the Trichothecene Mycotoxin 4,15-Diacetylnivalenol with the Carrier-Adjuvant Cholera Toxin*, Appl. Environ. Microbiol. **59** (1993) 1264-1268.
- [191] K. LANDSTEINER, J. VAN DER SCHEER: *Serological Differentiation of Steric Isomers*, J. Exp. Med. **XLVIII** (1928) 315-320.
- [192] M. H. GOODROW, J. R. SANBORN, D. W. STOUTAMIRE, S. J. GEE, B. D. HAMMOCK: *Strategies for Immunoassay Hapten Design*, ACS Symp. Ser. **586** (1995) 119-139.
- [193] J. P. SHERRY: *Environmental Chemistry: The Immunoassay Option*, Crit. Rev. Anal. Chem. **23** (1992) 217-300.

- [194] M. G. WELLER: *Strukturelle und kinetische Untersuchungen zur Entwicklung und Optimierung von Hapten-Enzymimmunoassays (ELISAs) am Beispiel der Bestimmung von Triazinherbiziden*, Dissertation, Technische Universität München, 1992.
- [195] M. ERHARD, J. KELLNER, R. KUHLMANN, U. LOSCH: *Influence of Various Adjuvants on the Synthesis of Specific Antibodies of Chicken, Sheep and Rabbit Following Immunization with an Hapten*, J. Vet. Med. A **1991** (1991) 21-27.
- [196] N. S. LIPMAN, L. J. TRUDEL, J. C. MURPHY, Y. SAHALI: *Comparison of Immune Response Potentiation and in Vivo Inflammatory Effects of Freund's and RIBI Adjuvants in Mice*, Lab. Anim. Sci. **42** (1992) 193-7.
- [197] B. BENNETT, I. J. CHECK, M. R. OLSEN, R. L. HUNTER: *A Comparison of Commercially Available Adjuvants for Use in Research*, J. Immunol. Meth. **153** (1992) 31-40.
- [198] GERBU Biotechnik GmbH: *GERBU Adjuvants for Laboratory Use and Antibody Production*, Produktinformation, <http://www.gerbu.de>, Gaiberg, 2001.
- [199] A. GONZALEZ-FERNANDEZ, C. MILSTEIN: *Low Antigen Dose Favours Selection of Somatic Mutants with Hallmarks of Antibody Affinity Maturation*, Immunology **93** (1998) 149-153.
- [200] C. WITTMANN, B. HOCK: *Improved Enzyme Immunoassay for the Analysis of s-Triazines in Water Samples*, Food Agric. Immunol. **1** (1989) 211-224.
- [201] P. PFORTNER: *Entwicklung von Enzymimmunoassays (ELISAs) zur Bestimmung von huminstoffgebundenen Nitroaromaten*, Dissertation, Technische Universität München 1998.
- [202] G. KÖHLER, C. MILSTEIN: *Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity*, Nature **256** (1975) 495-497.
- [203] K. C. MCCULLOUGH, R. N. BUTCHER, D. PARKINSON: *Hybridoma Cell Lines Secreting Monoclonal Antibodies Against Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV). II. Cloning Conditions.*, J. Biol. Stand. **11** (1983) 183-194.
- [204] A. E. KARU: *Monoclonal Antibodies and Their Use in Measurement of Environmental Contaminants*, in: Hazard Assesment of Chemicals, J. Saxena (Hrsg.), S. 205-321, Taylor and Francis, Washington 1993.
- [205] M. WINKLMAIR, M. G. WELLER, J. MANGLER, B. SCHLOSSHAUER, R. NIESSNER: *Development of a Highly Sensitive Enzyme-Immunoassay for the Determination of Triazine Herbicides*, Fresenius J. Anal. Chem. **358** (1997) 614-622.
- [206] S. NAGATA, Y. OKAMOTO, T. INOUE, Y. UENO, T. KURATA, J. CHIBA: *Identification of Epitopes Associated with Different Biological Activities on the Glycoprotein of Vesicular Stomatitis Virus by Use of Monoclonal Antibodies*, Arch. Virol. **127** (1992) 153-168.
- [207] Amersham Pharmacia Biotech AB: Affinity Chromatography - Principles and Methods, Uppsala 1999.

- [208] P. GAGNON: Purification Tools for Monoclonal Antibodies, Validated Biosystems Inc., Tucson 1996.
- [209] A. SCHWARZ: *Affinity Purification of Monoclonal Antibodies*, in: Affinity Chromatography, P. Bailon, G. K. Ehrlich, W.-J. Fung, W. Berthold (Hrsg.), S. 49-56, Humana Press, Totowa 2000.
- [210] A. PLÜCKTHUN: *Antibodies from Escherichia coli*, Nature **347** (1990) 497-498.
- [211] R. J. OWENS, R. J. YOUNG: *The Genetic Engineering of Monoclonal Antibodies*, J. Immunol. Meth. **168** (1994) 149-165.
- [212] J. C. HALL, G. M. O'BRIAN: *Phage-Display Technology for Environmental Analysis*, ACS Symp. Ser. **657** (1997) 22-37.
- [213] H. R. HOOGENBOOM: *Designing and Optimizing Library Selection Strategies for Generating High-Affinity Antibodies*, Trends Biotechnol. **15** (1997) 62-70.
- [214] S. SPADA, C. KREBBER, A. PLÜCKTHUN: *Selectively Infective Phages (SIP)*, Biol. Chem. **378** (1997) 445-456.
- [215] T. HOFFMANN: *Rekombinante Antikörper*, BioTec **7** (1995) 34-37.
- [216] G. VLATAKIS, L. I. ANDERSSON, R. MULLER, K. MOSBACH: *Drug Assay Using Antibody Mimics Made by Molecular Imprinting*, Nature **361** (1993) 645-647.
- [217] R. J. ANSELL, D. KRIZ, K. MOSBACH: *Molecularly Imprinted Polymers for Bioanalysis: Chromatography, Binding Assays and Biomimetic Sensors*, Curr. Opin. Biotechnol. **7** (1996) 89-94.
- [218] I. A. NICHOLLS, L. I. ANDERSSON, K. MOSBACH, B. EKBERG: *Recognition and Enantioselection of Drugs and Biochemicals Using Molecularly Imprinted Polymer Technology*, Trends Biotechnol. **13** (1995) 47-51.
- [219] M. KEMPE, K. MOSBACH: *Molecular Imprinting Used for Chiral Separations*, J. Chromatogr. A **694** (1995) 3-13.
- [220] K. ADBO, I. A. NICHOLLS: *Enantioselective Solid-Phase Extraction Using Träger's Base Molecularly Imprinted Polymers*, Anal. Chim. Acta **2001** (2001) 115-120.
- [221] E. SCHWEITZ, L. I. ANDERSSON, S. LISSON: *Rapid Electrochromatographic Enantiomer Separations on Short Molecularly Imprinted Monoliths*, Anal. Chim. Acta **435** (2001) 43-47.
- [222] S. SCHLEHUBER, G. BESTE, A. SKERRA: *A Novel Type of Receptor Protein, Based on the Lipocalin Scaffold, with Specificity for Digoxigenin*, J. Mol. Biol. **297** (2000) 1105-1120.
- [223] G. A. WEISS, H. B. LOWMAN: *Anticalins Versus Antibodies: Made-to-Order Binding Proteins for Small Molecules*, Chem. Biol. **7** (2000) R177-R184.
- [224] K. LANDSTEINER: *Die serologische Spezifität der Proteine*, in: Die Spezifität der serologischen Reaktionen, S. 28, Springer, Berlin 1933.

- [225] S. A. BERSON, R. S. YALOW, A. BAUMANN, M. A. ROTHSCHILD, K. NEWERLY: *Insulin- I^{131} Metabolism in Human Subjects: Demonstration of Insulin Binding Globulin in the Circulation of Insulin Treated Subjects*, J. Clin. Invest. **35** (1956) 170-190.
- [226] R. P. EKINS: *The Estimation of Thyroxine in Human Plasma by an Electrophoretic Technique*, Clin. Chim. Acta **5** (1960) 453-459.
- [227] E. ENGVALL, P. PERLMANN: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) - Quantitative Assay of Immunoglobulin G*, Immunochemistry **8** (1971) 871-874.
- [228] E. ENGVALL, P. PERLMANN: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA - III. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme-Labeled Anti-Immunoglobulin in Anti-gen-Coated Tubes*, J. Immunol. **109** (1972) 129-135.
- [229] B. K. VAN WEEMEN, A. H. W. M. SCHUURS: *Immunoassay Using Antigen-Enzyme Conjugates*, FEBS Lett. **15** (1971) 232-236.
- [230] B. K. VAN WEEMEN, A. H. W. M. SCHUURS: *Immunoassay Using Hapten-Enzyme Conjugates*, FEBS Lett. **24** (1972) 77-81.
- [231] R. J. SCHNEIDER, L. WEIL, R. NIESSNER: *Screening and Monitoring of Herbicides Behavior in Soils by Enzyme Immunoassays*, Intern. J. Environ. Anal. Chem. **46** (1992) 129-140.
- [232] M. G. WELLER, A. J. SCHUETZ, M. WINKLMAIR, R. NIESSNER: *Highly Parallel Affinity Sensor for the Detection of Environmental Contaminants in Water*, Anal. Chim. Acta **393** (1999) 29-41.
- [233] C. HEISS, M. G. WELLER, R. NIESSNER: *Dip-and-Read Test Strips for the Determination of Trinitrotoluene (TNT) in Drinking Water*, Anal. Chim. Acta **396** (1999) 309-316.
- [234] J. R. CROWTHER: ELISA Theory and Practice, Humana Press, Totowa 1995.
- [235] D. MONROE: *Enzyme Immunoassay*, Anal. Chem. **56** (1984) 920A-931A.
- [236] J. H. RITTENBURG: *Fundamentals of Immunoassay*, in: Development and Application of Immunoassay for Food Analysis (1990), J. H. Rittenburg (Hrsg.), S. 29-57, Elsevier, Essex 1990.
- [237] M. MAYR: *Schnelltests für die Untersuchung von Altlasten auf TNT - Entwicklung eines Apoenzym-Reaktivierungsimmoaasays (ARIS)*, Dissertation, Technische Universität München, 1998.
- [238] G. T. HERMANSON: Bioconjugates Techniques, Academic Press, San Diego 1996.
- [239] P. ULRICH, M. G. WELLER, R. NIESSNER: *Immunological Determination of Triazine Pesticides Bound to Soil Humic Acids (Bound Residues)*, Fresenius J. Anal. Chem. **354** (1996) 352-358.
- [240] P. PFORTNER, M. G. WELLER, R. NIESSNER: *Immunological Method for the Detection of Nitroaromatic Residues Covalently Bound to Humic Acids*, Fresenius J. Anal. Chem. **360** (1998) 192-198.

- [241] P. TIJSSEN: Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, Elsevier, Amsterdam 1985.
- [242] D. RODBARD: *Mathematics and Statistics of Ligand Assays: An Illustrated Guide.*, in: Ligand Assay, J. Langan, J. J. Clapp (Hrsg.), S. 45-101, Masson Publishing, New York 1981.
- [243] R. A. DUDLEY, P. EDWARDS, R. P. EKINS, D. J. FINNEY, I. G. M. MCKENZIE, G. M. RAAB, D. RODBARD, R. P. C. RODGERS: *Guidelines for Immunoassay Data Processing*, Clin. Chem. **31** (1985) 1264-1271.
- [244] J. BERKSON: *Application of the Logistic Function to Bio-Assay*, J. Americ. Statist. Assoc. **39** (1944) 357-365.
- [245] A. ZETTNER: *Principles of Competitive Binding Assays (Saturation Analyses) I. Equilibrium Techniques*, Clin. Chem. **19** (1973) 699-705.
- [246] P. VANKEERBERGHEN, C. VANDENBOSCH, J. SMEYERS-VERBEKE, D. L. MASSART: *Some Robust Statistical Procedures Applied to the Analysis of Chemical Data*, Chemomet. Intell. Lab. Sys. **12** (1991) 3-13.
- [247] R. R. WILCOX: Fundamentals of Modern Statistical Methods: Substantially Increasing Power and Accuracy, S. 330, Springer, Berlin 2001.
- [248] G. SCATCHARD: *The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions*, Ann. N. Y. Acad. Sci. **51** (1949) 660-672.
- [249] I. M. KLOTZ: *Ligand-Protein Binding Affinities*, in: Protein Function - A Practical Approach, T. E. Creighton (Hrsg.), S. 25-54, IRL, Oxford 1989.
- [250] D. E. H. LLEWELYN, S. G. HILLIER, G. F. READ: *The Use of Multivariable Standard Curves in the Radioimmunoassay of Testosterone and 5-Alpha-dihydrotestosterone*, Steroids **29** (1977) 417-426.
- [251] M. F. M. JOHNSTON, H. N. EISEN: *Cross-Reactions Between 2,4-Dinitrophenyl and Menadione (Vitamin K3) and the General Problem of Antibody Specificity*, J. Immunol. **117** (1976) 1189-1196.
- [252] J. A. BERZOFKY, A. N. SCHECHTER: *The Concepts of Crossreactivity and Specificity in Immunology*, Mol. Immunol. **18** (1981) 751-763.
- [253] J. J. MILLER, J. R. VALDES: *Methods for Calculating Crossreactivity in Immunoassays*, J. Clin. Immunoassay **15** (1992) 97-107.
- [254] G. E. ABRAHAM: *Solid-Phase Radioimmunoassay of Estradiol-17 β* , J. Clin. Endocrin. Metabol. **29** (1969) 866-870.
- [255] A. ZECK, M. G. WELLER, R. NIESSNER: *Characterization of a Monoclonal TNT-antibody by Measurement of the Cross-Reactivities of Nitroaromatic Compounds*, Fresenius J. Anal. Chem. **364** (1999) 113-120.
- [256] C. KEUCHEL: *Entwicklung von Enzymimmunoassays (ELISAs) zur Bestimmung aromatischer Nitroverbindungen (Rüstungsaltslasten) in Wasser und Boden*, Dissertation, Technische Universität München, 1994.

- [257] P. KEBARLE, L. TANG: *From Solution to Ions in the Gas Phase - The Mechanism of Electrospray Mass Spectrometry*, Anal. Chem. **65** (1993) 972A-985A.
- [258] W. D. LEHMANN: *Massenspektrometrie in der Biochemie*, Spektrum, Heidelberg 1996.
- [259] M. DOLE, L. L. MACK, R. L. HINES, R. C. MOBLEY, L. D. FERGUSON, M. B. ALICE: *Molecular Beams of Macroions*, J. Chem. Phys. **49** (1968) 2240-2249.
- [260] J. V. IRIBARNE, B. A. THOMPSON: *On the Evaporation of Small Ions from Charged Droplets*, J. Chem. Phys. **64** (1976) 2287-2294.
- [261] B. A. THOMPSON, J. V. A. IRIBARNE: *Field Induced Ion Evaporation from Liquid Surfaces at Atmospheric Pressure*, J. Chem. Phys. **71** (1979) 4451-4463.
- [262] S. K. CHOWDHURY, V. KATTA, B. T. CHAIT: *Probing Conformational Changes in Proteins by Mass Spectrometry*, J. Americ. Chem. Soc. **12** (1990) 9012-9013.
- [263] J. B. FENN: *Ion Formation from Charged Droplets: Roles of Geometry, Energy, and Time*, J. Americ. Soc. Mass Spectrom. **4** (1993) 524-535.
- [264] W. J. H. VAN BERKEL, R. H. H. VAN DEN HEUVEL, C. VERSLUIS, A. J. R. HECK: *Detection of Intact Megadalton Protein Assemblies of Vanillyl-Alcohol Oxidase by Mass Spectrometry*, Protein Sci. **9** (2000) 435-439.
- [265] U. BAHR, M. KARAS, F. HILLENKAMP: *Analysis of Biopolymers by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) Mass Spectrometry*, Fresenius J. Anal. Chem. **348** (1994) 783-791.
- [266] H. S. CREEL: *Prospects for the Analysis of High Molar Mass Polymers Using MALDI Mass Spectrometry*, Trends Polymer Sci. **1** (1993) 336-342.
- [267] C. FENSELAU: *MALDI MS and Strategies for Protein Analysis*, Anal. Chem. **69** (1997) A661-A665.
- [268] D. NOBLE: *MALDI-TOFMS Pulses Ahead*, Anal. Chem. **67** (1995) A497-A501.
- [269] J. QIN, B. T. CHAIT: *Identification and Characterization of Posttranslational Modifications of Proteins by MALDI Ion Trap Mass Spectrometry*, Anal. Chem. **69** (1997) 4002-4009.
- [270] O. VORM, P. ROEPSTORFF, M. MANN: *Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces by Fast Evaporation*, Anal. Chem. **66** (1994) 3281-3287.
- [271] S. JESPERSEN, W. M. A. NIESSEN, U. R. TJADEN, J. VAN DER GREEF, E. LITBORN, U. LINDBERG, J. ROERAADE: *Attomole Detection of Proteins by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry with the Use of Picolitre Vials*, Rapid Commun. Mass Spectrom. **8** (1994) 581-584.
- [272] R. J. COTTER: *The New Time-of-Flight Mass Spectrometry*, Anal. Chem. **71** (1999) 445A-451A.
- [273] M. GUILHAUS, V. MLYNSKI, D. SELBI: *Perfect Timing: Time-of-Flight Mass Spectrometry*, Rapid Commun. Mass Spectrom. **11** (1997) 951-962.

- [274] A. N. VERENTCHIKOV, W. ENS, K. G. STANDING: *Reflecting Time-of-Flight Mass Spectrometer with an Electrospray Ion Source and Orthogonal Extraction*, Anal. Chem. **66** (1994) 126-133.
- [275] I. V. CHERNUSHEVICH, W. ENS, K. G. STANDING: *Orthogonal-Injection TOFMS for Analyzing Biomolecules*, Anal. Chem. **71** (1999) 452A-461A.
- [276] C. M. HENRY: *Electrospray in Flight - Orthogonal Acceleration Brings the Advantages of Time of Flight to Electrospray*, Anal. Chem. (1999) 197A-201A.
- [277] Commission on Atomic Weights and Isotopic Abundancies IUPAC: *Atomic Weights of the Elements 1989*, Pure Appl. Chem. **63** (1991) 975-990.
- [278] M. MORRIS: Why Micromass Use Proteins to Calibrate the Mass Scale when Measuring Proteins, Knowledge Base 1.1, Micromass, Manchester 1996.
- [279] C. G. ENKE: *A Predictive Model for Matrix and Analyte Effects in Electrospray Ionization of Singly-Charged Ionic Analytes*, Anal. Chem. **69** (1997) 4885-4893.
- [280] T. L. CONSTANTOPOULOS, G. S. JACKSON, C. G. ENKE: *Effects of Salt Concentration on Analyte Response Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, J. Americ. Soc. Mass Spectrom. **10** (1999) 625-634.
- [281] B. K. CHOI, D. M. HERCULES, A. I. GUSEV: *LC-MS/MS Signal Suppression Effects in the Analysis of Pesticides in Complex Environmental Matrices*, Fresenius J. Anal. Chem. **369** (2001) 370-377.
- [282] P. ROEPSTORFF, J. FOHLMAN: *Proposal for a Common Nomenclature for Sequence Ions in Mass Spectra of Peptides*, Biomed. Mass Spectrom. **11** (1984) 601.
- [283] K. ECKART: *Mass Spectrometry of Cyclic Peptides*, Mass Spec. Rev. **13** (1994) 23-55.
- [284] K. FUJII, Y. IKAI, H. OKA, M. SUZUKI, K. HARADA: *A Nonempirical Method Using LC/MS for Determination of the Absolute Configuration of Constituent Amino Acids in a Peptide: Combination of Marfey's Method with Mass Spectrometry and its Practical Application*, Anal. Chem. **69** (1997) 5146-5151.
- [285] M. G. WELLER: *Immunochemical Techniques - A Critical Review*, Fresenius J. Anal. Chem. **366** (2000) 635-645.
- [286] N. DELAUNAY-BERTONCINI, V. PICHON, M.-C. HENNION: *Immunoextraction: A Highly Selective Method for Sample Preparation*, LC/GC Europe **14** (2001) 162-172.
- [287] H. A. NELSON, S. V. LUCAS, T. P. GIBSON: *Isolation by High-Performance Liquid Chromatography and Quantification by Radioimmunoassay of Therapeutic Concentrations of Digoxin and Metabolites*, J. Chromatogr. **163** (1979) 169-177.
- [288] J. A. STONE, S. J. SOLDIN: *Improved Liquid Chromatographic/Immunoassay of Digoxin in Serum*, Clin. Chem. **34** (1988) 2547-2551.
- [289] H. H. D. MEYER, F. X. HARTMANN, M. RAPP: *Distinction Between Oral and Parenteral Application of 19-Nortestosterone by Residue Analysis in Kidney Fat from Veal Calves Using High-Performance Liquid Chromatography and Enzyme Immunoassay*, J. Chromatogr. **489** (1989) 173-180.

- [290] M. RAPP, H. H. D. MEYER: *Determination of Hormone Contaminants in Milk Replacers by High-Performance Liquid Chromatography and Immunoassay*, J. Chromatogr. **489** (1989) 181-189.
- [291] E. GELPI, I. RAMIS, G. HOTTER, G. BIOQUE, O. BULBENA, J. ROSELLO: *Modern High-Performance Liquid Chromatographic-Radioimmunoassay Strategies for the Study of Eicosanoids in Biological Samples*, J. Chromatogr. **492** (1989) 223-250.
- [292] J. YU, F. S. CHU: *Immunochemical Methods for the Analysis of Trichothecene Mycotoxins in Naturally Occurring Moldy Corn*, J. AOAC Int. **79** (1996) 465-471.
- [293] J. J. PARK, F. S. CHU: *Assessment of Immunochemical Methods for the Analysis of Trichothecene Mycotoxins in Naturally Occurring Moldy Corn*, J. AOAC Int. **79** (1996) 465-471.
- [294] P. M. KRAEMER, Q. X. LI, B. D. HAMMOCK: *Integration of Liquid Chromatography with Immunoassay: An Approach Combining the Strengths of Both Methods*, J. AOAC Int. **77** (1994) 1275-1287.
- [295] H. IRTH, A. J. OOSTERKAMP, W. VAN DER WELLE, U. R. TJADEN, J. VAN DER GREEF: *On-Line Immunochemical Detection in Liquid Chromatography Using Fluorescein-labelled Antibodies*, J. Chromatogr. **633** (1993) 65-72.
- [296] H. IRTH, A. J. OOSTERKAMP, U. R. TJADEN, J. VAN DER GREEF: *Strategies for On-Line Coupling of Immunoassays to High-Performance Liquid-Chromatography*, Trends Anal. Chem. **14** (1995) 355-361.
- [297] E. S. LUTZ, H. IRTH, U. R. TJADEN, J. VAN DER GREEF: *Applying Hollow Fibres for Separating Free and Bound Label in Continuous-Flow Immunochemical Detection*, J. Chromatogr. A **755** (1996) 179-187.
- [298] A. J. OOSTERKAMP, M. T. V. HERRAIZ, H. IRTH, U. R. TJADEN, J. VAN DER GREEF: *Reversed-Phase Liquid-Chromatography Coupled Online to Receptor Affinity Detection Based on the Human Estrogen-Receptor*, Anal. Chem. **68** (1996) 1201-1206.
- [299] A. J. OOSTERKAMP, H. IRTH, L. HEINTZ, G. MARKO VARGA, U. R. TJADEN, J. VAN DER GREEF: *Simultaneous Determination of Cross-Reactive Leukotrienes in Biological Matrices Using On-Line Liquid Chromatography Immunochemical Detection*, Anal. Chem. **68** (1996) 4101-4106.
- [300] K. J. MILLER, A. C. HERMAN: *Affinity Chromatography with Immunochemical Detection Applied to the Analysis of Human Methionyl Granulocyte Colony Stimulating Factor in Serum*, Anal. Chem. **68** (1996) 3077-3082.
- [301] K. A. GRAEFE, Z. TANG, H. T. KARNES: *High-Performance Liquid Chromatography with On-Line Post-Column Immunoreaction Detection of Digoxin and its Metabolites Based on Fluorescence Energy Transfer in the Far-Red Spectral Region*, J. Chromatogr. B **745** (2000) 305-314.
- [302] H. A. FISHMAN, D. R. GREENWALD, R. N. ZARE: *Biosensors in Chemical Separations*, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. **27** (1998) 165-198.

- [303] K. SHAHDEO, H. T. KARNES: *Combining Immunoassays with Chromatographic and Electrophoretic Separation Techniques - A Review*, Mikrochim. Acta **129** (1998) 19-27.
- [304] D. S. HAGE: *Survey of Recent Advances in Analytical Applications of Immunoaffinity Chromatography*, J. Chromatogr. B **715** (1998) 3-28.
- [305] D. S. HAGE, M. A. NELSON: *Chromatographic Immunoassays*, Anal. Chem. (2001) 199A-205A.
- [306] G. D. FASMAN (Hrsg.) Proteins, in Serie: Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, CRC Press, Cleveland 1976.
- [307] L. SPOOF, K. KARLSSON, J. MERILUOTO: *High-Performance Liquid Chromatographic Separation of Microcystins and Nodularin, Cyanobacterial Peptide Toxins, on C18 and Amide C16 Sorbents*, J. Chromatogr. A **909** (2001) 225-236.
- [308] A. V. FLANNERY, R. J. BEYNON, J. S. BOND: *Proteolysis of Proteins for Sequence Analysis and Peptide Mapping*, in: Proteolytic Enzymes - A Practical Approach, R. J. Beynon, J. S. Bond (Hrsg.), S. 145-162, IRL Press, Oxford 1989.
- [309] J. S. BOND: *Appendix II - Commercially Available Proteases*, in: Proteolytic Enzymes - A Practical Approach, R. J. Beynon, J. S. Bond (Hrsg.), S. 232-240, IRL Press, Oxford 1989.
- [310] S. TAKENAKA: *Formation of 3-Amino-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4E,6E-dienoic Acid from Microcystin LR by the Treatment with Various Proteases, and its Detection in Mouse Liver*, Chemosphere **36** (1998) 2277-2282.
- [311] S. TAKENAKA, Y. TANAKA: *Decomposition of Cyanobacterial Microcystins by Iron(III) Chloride*, Chemosphere **30** (1995) 1-8.
- [312] M. REICHEL, C. HUMMERT, B. LUCKAS: *Hydrolysis of Microcystins and Nodularin by Microwave Radiation*, Chromatographia **49** (1999) 671-677.
- [313] V. HAVLICEK, A. JEGOROV, P. SEDMERA, M. RYSKA: *BF₃-Catalysed Methanolysis Combined with Fast Atom Bombardment Tandem Mass Spectrometry as a New Tool for the Preparation and Analysis of Linear Secocyclosporins*, J. Mass Spectrom. Suppl. S (1995) S158-S164.
- [314] S. TAKENAKA, M. F. WATANABE: *Microcystin LR Degradation by Pseudomonas aeruginosa Alkaline Protease*, Chemosphere **34** (1997) 749-757.
- [315] J. MORRALL: *Samples from Australian Water Quality Centre Culture Collection*, Persönliche Mitteilung, Australian Water Quality Centre, Salisbury 1997.
- [316] Wako BioProducts: *Microcystin-ELISA-Kit*, Produktinformation, Richmond, USA 1998.
- [317] F. M. DA SILVA, A. K. GOMES, J. JONES: *Organic Reaction in Water. Part 2: Michael Addition in Water Without Phase Transfer Agents*, Can. J. Chem. Rev. Can. Chim. **77** (1999) 624-627.

- [318] A. ZECK, A. EIKENBERG, M. G. WELLER, R. NIESSNER: *Highly Sensitive Immunoassay Based on a Monoclonal Antibody Specific for [4-Arginine]Microcystins*, Anal. Chim. Acta **441** (2001) 1-12.
- [319] M. G. WELLER: *Chemische und physikalische Einflüsse auf die Triazinbestimmung im Wasser mittels Immunoassay*, Diplomarbeit, Technische Universität München, 1989.
- [320] A. J. SCHÜTZ, M. WINKLMAIR, M. G. WELLER, R. NIESSNER: *Stabilization of Horseradish peroxidase (HRP) for the Use in Immunochemical Sensors*, SPIE Proc. **3105** (1997) 332-340.
- [321] M. G. WELLER, A. ZECK, A. EIKENBERG, S. NAGATA, Y. UENO, R. NIESSNER: *Development of a Microcystin Immunoassay of Broad Specificity Based on Monoclonal Antibody M8H5*, Anal. Sci., im Druck.
- [322] T. PETERS: *Serum Albumin*, in: Advances in Protein Chemistry, C. B. Anfinsen, J. T. Edsall F. M. Richards (Hrsg.), S. 161-245, Academic Press, Orlando 1985.
- [323] W. HAASNOOT, J. DU PRE, G. CAZEMIER, A. KEMMERS-VONCKEN, R. VERHEIJEN, B. J. M. JANSEN: *Monoclonal Antibodies Against a Sulfathiazole Derivative for the Immunochemical Detection of Sulfonamides*, Food Agric. Immunol. **12** (2000) 127-138.
- [324] E. SIMON, D. KNOPP, P. BOU CARRASCO, R. NIESSNER: *Development of an Immunoassay for Methylsulfonyl-Methyl*, Food Agric. Immunol. **10** (1998) 105-120.
- [325] W. G. WOOD: *Luminescence Immunoassays: Problems and Possibilities*, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **22** (1984) 905-918.
- [326] M. WINKLMAIR, A. J. SCHUETZ, M. G. WELLER, R. NIESSNER: *Immunochemical Array for the Identification of Cross-Reacting Analytes*, Fresenius J. Anal. Chem. **363** (1999) 731-737.
- [327] A. J. SCHÜTZ: *Entwicklung und Automatisierung eines indirekten Immunosensorarrays zu parallelen Bestimmung von Umweltschadstoffen in Wasser*, Dissertation, Technische Universität München, 1999.
- [328] M. NAMIKOSHI, M. YUAN, K. SIVONEN, W. W. CARMICHAEL, K. L. RINEHART, L. ROUHAINEN, F. SUN, S. BRITTAIN, A. OTSUKI: *Seven New Microcystins Possessing Two L-Glutamic Acid Units, Isolated from Anabaena sp. Strain 186*, Chem. Res. Toxicol. **11** (1998) 143-149.
- [329] A. E. ROMERO-HERRERA, H. LEHMANN: *Residue 122 of Sperm Whale and Horse Myoglobin*, Biochim. Biophys. Acta **336** (1974) 318-323.
- [330] R. FENG, Y. KONISHI, A. W. BELL: *High Accuracy Molecular Weight Determination and Variation Characterization of Proteins up to 80 ku by Ionspray Mass Spectrometry*, J. Americ. Soc. Mass Spectrom. **2** (1991) 387-401.
- [331] A. ZECK, M. G. WELLER, D. BURSILL, R. NIESSNER: *Generic Microcystin Immunoassay Based on Monoclonal Antibodies Against Adda*, Analyst im Druck (2001).

-
- [332] M. Winklmaier: *Entwicklung eines direkten, multianalytischen Immunosensorarrays zur parallelen Bestimmung kreuzreagierender Triazinherbizide*, Dissertation, Technische Universität München 1999.