



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie

Lehrstuhl für Analytische Chemie

**Entwicklung eines Abreicherungsverfahrens für
Microcystin-LR aus Wasserproben mit rekombinant
in Pflanzen hergestellten Antikörpern (*Plantibodies*)**

Anna-Cathrine Ruth Neumann

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Michael Groll

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner

2. apl. Prof. Dr. Dietmar Knopp

Die Dissertation wurde am 21.09.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 10.11.2016 angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Anfang Juni 2013 bis Ende Mai 2016 am Lehrstuhl für Analytische Chemie der Technischen Universität München unter der Anleitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner. Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert (KN348/16-1).

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Reinhard Nießner diese sehr interessanten und vielfältigen Projekte an seinem Lehrstuhl bearbeiten zu können. Besonders möchte ich mich für das Vertrauen und den geschätzten Freiraum der Forschung bedanken. Vielen Dank, dass ich die vielseitige Infrastruktur des Instituts nutzen durfte und meine Forschungsergebnisse regelmäßig auf Fachkonferenzen präsentieren konnte.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dietmar Knopp für seine intensive Betreuung während der gesamten Doktorarbeit. Die vielen fachlichen Diskussionen und neuen Denkanstöße trugen wesentlich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit bei. Des Weiteren danke ich für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit die Themen meiner Dissertation eigenständig bearbeiten zu können.

Mein weiterer besonderer Dank gebührt PD Dr. Christoph Haisch für die großartige Zusammenarbeit, Unterstützung bei analytischen Fragestellungen und die vielen sehr hilfreichen Gespräche.

Meinen Projektpartnern Prof. Dr. Eva Stöger, Dr. Verena Ibl und Stanislav Melnik von der Universität für Bodenkultur in Wien danke ich sehr für die Herstellung der Plantibodies und die damit verbundene viele Arbeit.

Für die MALDI-TOF-Messungen möchte ich Herrn Dr. Martin Haslbeck und Frau Gina Maria Feind von der Technischen Universität München danken. Dr. Marianne Hanzlik und Xaver Hecht von der Technischen Universität München danke ich für die TEM-Aufnahmen und die BET-Analysen.

Sehr herzlicher Dank gilt meinen lieben Arbeitskolleginnen und Arbeitskollegen Dr. Susanna Oswald, Dr. Maria Hübner, Dr. Michael Pschenitza, Dr. Xu Wang und Katharina Stutzer für die große Unterstützung im Labor und für die tolle Arbeitsatmosphäre am Arbeitsplatz. Weiterhin gilt mein Dank Carolin Hartmann, Sebastian Dirndorfer, Benjamin Rossa, Marianne Volkmar, Jessica Beyerl, Tim Kratky und Jessica Löprich für ihr großes Interesse an den Forschungsgebieten und ihre große Hilfe im Labor. Weiterhin möchte ich Susanna Mahler, Christine Sternkopf, Roland Hoppe, Sebastian Wiesemann, Birgit Apel, Joachim Langer und

Klemens M. Thaler für Analysenergebnisse, Fertigung von Messteilen und Hilfe bei apparativen Aufbauten danken.

Für das Korrigieren der Arbeit möchte ich mich besonders bei Dr. Klaus Wutz, Carolin Hartmann und Angelika Nistler bedanken.

Allen weiteren Kollegen des IWC, insbesondere Dr. Jan-Christoph Wolf, Dr. Henrike Blatt, Mark Lafogler, Melanie Kühn, Moritz Herbrich, Kathrin Schwarzmeier, Christoph Berger, Andreas Kunze, Klemens M. Thaler, A. Wunderlich und Bettina Kiwull, sowie allen hier nicht namentlich Erwähnten danke ich für das freundschaftliche Umfeld, sowie viele schöne Momente bei gemeinsamen Aktivitäten auch außerhalb des Instituts.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinem Freund und meinen Freunden, für die jahrelange und stets uneingeschränkte Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion. Danke, dass ihr mir immer den Rücken freigehalten habt und mich in den schwierigsten Situationen immer wieder aufs Neue motiviert habt. Ohne Euer Verständnis, die vielen aufbauenden Worte und die schönen gemeinsamen Stunden hätte diese Arbeit nicht entstehen können.

Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Neumann, A.-C, Wang, X., Niessner, R., Knopp, D. Determination of microcystin-LR in surface water by a magnetic-bead-based colorimetric immunoassay using antibody-conjugated gold nanoparticles, *Anal. Methods*, **2016**, 8, 57–63.

*„Eine wirklich gute Idee erkennt man daran,
dass ihre Verwirklichung von vornherein ausgeschlossen erschien.“*

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

I	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
II	THEORETISCHER HINTERGRUND.....	5
1	Cyanobakterien und Cyanotoxine	6
1.1	Cyanobakterien.....	6
1.1.1	Einteilung, Vorkommen und Bedeutung.....	6
1.1.2	Algenblüte-Relevante Faktoren.....	7
1.2	Cyanotoxine.....	9
1.2.1	Einteilung der cyanobakteriellen Toxine.....	9
1.2.2	Zyklische Hepatotoxine.....	10
1.2.3	Chemische Eigenschaften der Microcystine	12
1.2.4	Wirkungsweise und Toxizität der Microcystine	13
1.2.5	Vergiftungsfälle durch Cyanotoxine	14
1.2.6	Richtlinien und Grenzwerte.....	15
1.2.7	Eliminierung von Cyanobakterien und Cyanotoxinen	17
2	Analytik von Microcystinen.....	19
2.1	Probenahme und Probenvorbereitung	19
2.2	Physikalisch-chemische Nachweismethoden	21
2.3	Enzym-Inhibitionsassay	22
2.4	Immunoassays	23
2.4.1	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)	24
2.4.2	Kolorimetrischer Goldnanopartikel-Immunoassay	27
2.4.3	Auswertung von Immunoassays.....	29
2.5	Biosensoren.....	29
2.5.1	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie)	30
2.5.2	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC).....	31
2.5.3	Weitere Biosensoren.....	33

3	Antikörper	34
3.1	Aufbau und Struktur von Antikörpern	34
3.2	Herstellung von poly- und monoklonalen Antikörpern	37
3.3	Herstellung von rekombinanten Antikörpern in Bakterien und Hefen	39
3.4	Pflanzen als Produktionssystem für rekombinante Antikörper.....	42
3.5	Charakterisierung von Antikörpern	46
4	Immunofiltration	49
4.1	Funktionsweise der Immunoaffinitätschromatographie/Immunofiltration..	50
4.2	Immobilisierungsmethoden	51
4.2.1	Kovalente Ligandenimmobilisierung	52
4.2.2	Nichtkovalente Ligandenimmobilisierung	53
4.2.3	Immobilisierung mittels Sol-Gel-Prozess	54
III	EXPERIMENTELLER TEIL	56
1	Entwicklung immunanalytischer Methoden	57
1.1	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)	57
1.1.1	Ansetzen der MC-LR-Stammlösung	57
1.1.2	Synthese des MC-LR-BSA-Konjugats.....	57
1.1.3	Indirekt kompetitiver ELISA.....	58
1.1.4	Kreuzreaktivitätstests	59
1.1.5	Stabilitätstests	59
1.2	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie)	60
1.2.1	Immobilisierung von MC-LR-BSA.....	60
1.2.2	Immobilisierung von MC-LR.....	60
1.2.3	Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels SPR-Spektroskopie	61
1.3	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC).....	61
1.4	Kolorimetrischer Immunoassay	62
1.4.1	Herstellung magnetischer MC-LR-BSA-Partikel (MC-LR-BSA-Fe ₃ O ₄)	62
1.4.2	Herstellung und Funktionalisierung von Goldnanopartikeln	63
1.4.3	Herstellung der Goldwachstumslösung.....	63

1.4.4	Generelles Protokoll für den kolorimetrischen Immunoassay	64
2	Probenvorbereitung	65
2.1	Filtration.....	65
2.2	Festphasenextraktion für HPLC-MS-Experimente.....	65
3	HPLC-MS-Messungen von MC-LR	66
3.1	Analysenmethode für MC-LR und Leucin-Enkephalin.....	66
3.2	Auswertung der HPLC-MS-Experimente.....	67
4	Immunofiltration	68
4.1	Quantifizierung von nichtimmobilisierten Antikörpern.....	68
4.2	Stabilität und Funktionalität von MC10E7 in Elutionsmitteln.....	69
4.3	NHS-aktivierte Agarose-Träger	70
4.3.1	Durchführung der NHS-aktivierte-Agarose-Experimente	70
4.4	Herstellung von Sol-Gel-Glas	71
4.5	Charakterisierung der Sol-Gel-Glas-Matrix	72
4.5.1	Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	72
4.5.2	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	72
4.5.3	BET-Analyse	72
4.6	Durchführung der Immunofiltration-Sol-Gel-Glas-Experimente	73
4.6.1	Schrittweise MC-LR-Abreicherung	73
4.6.2	Abreicherung im kontinuierlich zyklischen Betrieb.....	74
4.6.3	Abreicherung im Schwebebettverfahren	74
4.7	Auswertung der Messdaten.....	75
IV	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	76
1	Entwicklung immunanalytischer Methoden	77
1.1	Synthese des MC-LR-BSA-Konjugats.....	77
1.2	Indirekt kompetitiver ELISA mit mAk MC10E7	78
1.3	Entwicklung eines kolorimetrischen Immunoassays.....	81

1.3.1	Optimierung der Probenvorbereitung.....	81
1.3.2	Wiederfindung in Realproben	83
2	Herstellung rekombinanter Antikörper in <i>Nicotiana</i> und <i>P. pastoris</i>...	86
2.1	Sequenzierung von MC10E7.....	86
2.2	Herstellung von <i>Plantibodies</i> in <i>Nicotiana</i>	86
2.3	Herstellung von scFvs in <i>P. pastoris</i>	89
3	Charakterisierung der rekombinanten Antikörper	91
3.1	Charakterisierung von MC10E7H aus <i>N. tabacum</i>	91
3.1.1	Affinitätsbestimmung mittels ELISA.....	91
3.1.2	Bestimmung der Kreuzreaktivitäten.....	92
3.1.3	Stabilität gegenüber Oberflächenwasserinhaltsstoffen.....	93
3.1.4	Stabilität in Realproben	95
3.1.5	Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln, pH-Wert und Temperatur.....	96
3.1.6	Affinitätsbestimmung mittels SPR-Spektroskopie.....	98
3.1.7	Affinitätsbestimmung mittels ITC.....	102
3.2	Affinitätsbestimmung von scFvs aus <i>P. pastoris</i> mittels ELISA.....	103
4	Immunofiltration: Optimierung und Charakterisierung der Matrix.	106
4.1	Auswahl des Syntheseprotokolls für die Sol-Gel-Glas-Herstellung	106
4.2	Optimierung des Sol-Gels.....	108
4.2.1	Gewichtsverlust	108
4.2.2	Unspezifische Bindung.....	109
4.2.3	Antikörper/Sol-Gel-Glas-Verhältnis	110
4.3	Charakterisierung des Sol-Gel-Glases.....	111
4.3.1	REM und TEM Messungen.....	112
4.3.2	Bestimmung der Sorptionsisotherme	113
4.4	Reproduzierbarkeit und Lagerstabilität.....	115
4.5	Elution und Wiederfindung	117
4.5.1	Vorversuche für die Elution	117
4.5.2	Elution: NHS-aktivierte Agarose	119

4.5.3	Elution: Sol-Gel-Glas	119
5	Immunofiltration: Abreicherung von MC-LR	121
5.1	Toxin- und Antikörperquantifizierung	121
5.1.1	Quantifizierung der MC-LR-Menge mittels ELISA und HPLC-MS	121
5.1.2	Quantifizierung der nicht immobilisierten Antikörpermenge	122
5.2	Abreicherung mittels sequentieller Probenaufgabe	123
5.2.1	Bestimmung der maximalen Bindungskapazität	123
5.2.2	Bestimmung der Durchbruchskurven.....	123
5.3	Abreicherung im kontinuierlich zyklischen Betrieb.....	126
5.3.1	Abreicherung mit affinitätsaufgereinigten Antikörpern.....	127
5.3.2	Abreicherung mittels MC10E7H-Zellpellet	132
5.4	Abreicherung im Schwebebettverfahren.....	133
V	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	136
VI	SUMMARY AND OUTLOOK	142
VII	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	147
VIII	LITERATURVERZEICHNIS	155
IX	ANHANG	180
	Geräte	181
	Software	183
	Antikörper und Antigene	183
	Verbrauchsmaterialien.....	184
	Chemikalien.....	186
	Pufferlösungen.....	189

I Einleitung und Zielsetzung

Die vom Menschen verursachte Eutrophierung von Binnengewässern und Flüssen im Zusammenspiel mit der Klimaerwärmung führt immer häufiger zu einer explosionsartigen Vermehrung von toxischen Cyanobakterien, die im Volksmund auch als „Blualgen“ bezeichnet werden (siehe Abbildung 1). Diese produzieren Cyanotoxine, zu denen unter anderem die Microcystine (MCs) gehören. Microcystin-Leucin-Arginin (MC-LR) stellt den weitverbreitetsten und zugleich toxischsten Vertreter dar (Wehr, 2015). Bei Vorkommen in Trinkwasserreservoirs oder Badeseen können bereits kleine Dosen sowohl bei akuter, als auch subchronischer Aufnahme zu Schädigungen von Leber, Nieren und Dünndarm führen. MC-LR führt binnen weniger Stunden zum Tod, wenn es oral in letaler Dosis aufgenommen wird. Die Internationale Agentur für Krebsforschung (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) teilte die MCs, zu denen etwa 90 Strukturvarianten gehören (Pearson, 2010), im Jahr 2006 als möglich karzinogen ein (IARC, 2010). Die Weltgesundheitsorganisation (engl. *World Health Organization*, WHO) hat basierend auf diesen Befunden einen Richtwert von 1 µg/L für die Summe an freiem und zellgebundenem MC-LR in Trinkwasser veranschlagt (WHO, 1998). Ein 100-fach höherer Wert (akut tolerierbar bei einmaliger Exposition) wird hingegen vom Umweltbundesamt als Richtwert postuliert, ab welchem ein Badeverbot ausgesprochen werden soll (Umweltbundesamt, 2015). Einer der fünf größten Seen in den USA, der amerikanisch/kanadische Erie-See, geriet in den vergangenen Jahren immer häufiger in den Fokus der Medien. Er gilt als einer der größten Trinkwasserreservoirs der Region und zuletzt 2015 war der Zugang zu sauberem Trinkwasser aufgrund einer giftigen Algenblüte nicht sichergestellt.



Abbildung 1: Satellitenbild einer Algenblüte im amerikanisch/kanadischen Erie-See (NASA Earth Observatory, 2015).

Klassische physikalische Gewässeraufreinigungsverfahren sind teuer und auch wenig effizient hinsichtlich der Abreicherung von MCs. Die Interaktion beispielsweise zwischen Aktivkohle und MC-LR ist nicht selektiv, da auch andere unpolare oder polare Substanzen (z.B. Huminsäuren) an das feinkörnige Material binden können (Cook, 2002). Weitere Möglichkeiten für die Entfernung von intakten Cyanobakterien und/oder freigesetzten Cyanotoxinen sind die Mikro-, Nano- oder Langsandsandfiltration bzw. die Ausflockung mittels Aluminiumsulfat (Hrudey, 1999; Teixeira, 2005). Neben den physikalischen werden auch chemische Verfahren verwendet, wobei durch den Einsatz von Oxidationsmitteln (z.B. Ozon, Chlor, Kaliumpermanganat) eine Strukturänderung des MC-LR erzeugt wird und es dadurch ungiftig gemacht wird (Chorus, 2010b; Shawwa, 2001). Allerdings sind diese Aufreinigungsmethoden, aufgrund der möglichen chemischen Nebenreaktionen und hohen Chemikalienkosten, limitiert. Da sowohl physikalische als auch chemische Abreicherungstechniken deutliche Selektivitätseinbußen aufweisen, besteht ein Bedarf an selektiveren Methoden.

Sogenannte molekular geprägte Polymere (engl. *molecularly imprinted polymers*, MIPs) besitzen molekulare Kavitäten, die der komplementären Form der abzureichernden Substanz entsprechen und in die der Analyt mittels nichtkovalenter Wechselwirkungen binden kann. Unter anderem konnten Chianella et al. und Krupadam et al. zeigen, dass MIPs unter Verwendung von MC-LR als Templatmoleküle genutzt werden konnten, um MC-LR aus Leitungswasser 100-fach aufzukonzentrieren (Chianella, 2003) bzw. 3,6 µg MC-LR pro Milligramm MIP selektiv aus Oberflächenwasser zu entfernen (Krupadam, 2012). Großer Nachteil dieser Methode sind allerdings die meist hohen Analytkosten, die bei der Herstellung der MIPs als Reinsubstanz vorliegen müssen. Eine kostengünstigere Alternative zeigten Mbukwa et al., die für die Herstellung der MIPs lediglich eine Teilstruktur, das L-Arginin (R), als Templatmolekül verwendeten. So gelang es, selektiv [Arginin]-MCs aus dest. H₂O zu eliminieren (Mbukwa, 2013).

Eine weitere sehr vielversprechende neuartige Abreicherungsmethode stellt die Verwendung von hochaffinen Antikörpern dar. Basierend auf der Antikörper-Analyt-Interaktion werden Toxine aus kontaminiertem Wasser eliminiert. Dieser Prozess wird auch als Immunofiltration betitelt und zeichnet sich durch eine hohe MC-Selektivität aus, wenn die Antikörper eine geringe Kreuzreaktivität zu anderen Substanzen aufweisen. Allerdings sind die klassischen Herstellungswege von hochaffinen und selektiven monoklonalen Antikörpern, wie sie derzeit am häufigsten für die Immunofiltration genutzt werden, aufgrund der hohen Kosten limitiert und werden bislang nur im kleinen Maßstab im Milligrammbereich produziert. Für die Abreicherung von Oberflächengewässern würden allerdings weit größere Mengen benötigt werden.

Die Möglichkeit der Herstellung von funktionalen Volllängenantikörpern in Tabakpflanzen wurde das erste Mal von Hiatt et al. und Düring et al. (Hiatt, 1989; Düring, 1990) beschrieben. Die entsprechenden Antikörper, bezeichnet als *Plantibodies*, sind neben ihrem Einsatz im medizinischen Bereich zunehmend auch interessant für die *ex vivo* Bioremediation durch Biofiltrertechnologie. Drake et al. konnte in einer vergleichbaren vielversprechenden Forschungsarbeit bereits zeigen, dass im Rahmen der Phytoremediation mit einem in *Nicotiana tabacum* exprimierten Antikörper ein Oberflächenprotein des *Streptococcus mutans* aus der Rhizosphäre gebunden werden kann (Drake, 2002). Einige Jahre später gelang es Drake et al. ebenfalls einen rekombinanten anti-MC-LR-Antikörper in *Nicotiana tabacum* herzustellen. Der *Plantibody* wurde dabei als Volllängenantikörper mit der konstanten Region (IgG1κ) des murinen Antikörpers Guy's 13 und dem humanen anti-MC-LR einkettigen variablen Fragment (engl. *single-chain fragment variable*, scFv) 3A8 produziert. In diesem Zusammenhang wurde allerdings auf detaillierte Bindungsstudien verzichtet und so das analytische Anwendungspotential der *Plantibodies* nicht weitergehend untersucht (Drake, 2010). Basierend auf diesen vielversprechenden Forschungsarbeiten von Drake et al. kann auch eine Produktion von *Plantibodies* und deren Nutzung für die Entwicklung von Biofiltern angedacht werden.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollten diese Grundlagen genutzt werden und in Zusammenarbeit mit der Universität für Bodenkultur in Wien chimäre *Plantibodies* in *Nicotiana* gegen MC-LR hergestellt werden. Anschließend sollten die Bindungseigenschaften hinsichtlich MC-LR zwischen *Plantibodies* und dem als Vorlage dienenden monoklonalen anti-MC-LR-Antikörper MC10E7 detailliert verglichen werden. Darüber hinaus war das Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, ob sich die *Plantibodies* aufgrund ihrer Bindungseigenschaften prinzipiell für die Abreicherung von MC-LR aus Oberflächengewässern eignen. Im Gegensatz zu den Forschungsarbeiten von Drake et al. sollte der abzureichernde Analyt allerdings nicht aus der Rhizosphäre der Pflanze entfernt werden. Nach der Isolierung der Biomolekülfraktion aus dem kompletten Pflanzenmaterial sollten die *Plantibodies* auf geeigneten Trägermaterialien immobilisiert werden. Auf diese Weise kann ein transportabler Biofilter geschaffen werden.

II Theoretischer Hintergrund

1 Cyanobakterien und Cyanotoxine

1.1 Cyanobakterien

1.1.1 Einteilung, Vorkommen und Bedeutung

Cyanobakterien gehören taxonomisch zu einer Abteilung der Domäne der *Bacteria* und sind gramnegative, autotrophe Organismen, die weder einen membranumhüllten Zellkern noch andere charakteristische Zellorganellen wie Mitochondrien besitzen (Baker, 1999). Irrtümlicherweise werden diese Bakterien, die zum einen aufgrund der ähnlichen Größe im Vergleich zu Algen, zum anderen aber aufgrund des Farbstoffes Phyocyanin (blau) bzw. Phyocerythrin (rot) eine Blaufärbung aufweisen, häufig als „Blaualgen“ bezeichnet. Aufgrund des Fehlens eines Zellkerns kann allerdings eine eindeutige Zuordnung zu den prokaryotischen Organismen gemacht werden (Carmichael, 1994). Manche Systematiker schlagen deshalb die Bezeichnung als Cyanoprokaryoten vor und somit die Zuordnung dieser Organismen in eine neue Gruppe (Chorus, 2010b).

Fossile Funde aus der Zeit vor etwa drei Milliarden Jahren belegen, dass Cyanobakterien zu den ältesten bekannten Organismen gehören. Aufgrund der Befähigung zur oxygenen und anoxygenen Photosynthese und aufgrund ihrer Anpassung an eine Vielzahl von unterschiedlichsten Umgebungen zählen sie zu den ersten phototrophen Lebewesen auf dem Planeten (Stanier, 1977). Ein weiterer wichtiger Stoffwechselprozess neben der Photosynthese ist ihre Fähigkeit, Atmosphärenstickstoff und in Wasser gelösten Stickstoff zu fixieren und in Ammoniumverbindungen umzuwandeln. Diese Eigenschaft bedingt klare Standortvorteile, weshalb Cyanobakterien auch nährstoffarme Regionen besiedeln können. Einige Gattungen wie z.B. *Nodularia* besiedeln hauptsächlich marine Gewässer, wohingegen sich *Microcystis*, *Anabaena* und *Oscillatoria* vorwiegend in Süßwasser entwickeln. Für gewöhnlich wird gemäßigt bis subtropisches Klima bevorzugt, allerdings können auch extreme Standorte wie die Antarktis, Wüsten, Thermalquellen, wechselfeuchte Felsen bis hin zu Freiwasserzonen in Seen besiedelt werden (Ward, 2012; Sanchez-Baracaldo, 2005). Die Einteilung der Cyanobakterien in Familien erfolgt auf morphologischer Grundlage in Kombination mit der Art der Vermehrung. Dabei weisen sie eine große Diversität auf und können unizellulär in Kolonien (Abbildung 2 rechts) oder als Filamente (Abbildung 2 links) auftreten. Die Vermehrung erfolgt über eine Zwei- bzw. Mehrfachteilung, kann aber auch durch wiederholte Abtrennung endständiger Zellen erfolgen. Zur filamentösen Zellvermehrung kommt es aufgrund von Filamentbrü-

chen (Hormogonien) oder der Ausbildung von länglichen, dickwandigen und unbeweglichen Einzelzellen (Akineten). Die Taxonomie nach dem Nationalen Zentrum für Biotechnologieinformation (engl. *National Center for Biotechnology Information*, NCBI) teilt nur zwei von insgesamt sieben Ordnungen (*Chroococcales*, *Gloeobacterales*, *Nostocales*, *Oscillatoriales*, *Pleurocapsales*, *Prochlorales* und *Stigonematales*) in Familien ein, *Nostocales* und *Prochlorales* (Skulberg, 1993). Bei der Ordnung *Nostocales* sind als Gattungen vor allem *Anabaena* und *Nodularia* zu erwähnen, wohingegen bei *Chroococcales* vor allem *Microcystis* wichtig sind. Aufgrund der enormen morphologischen Vielfalt basierend auf unterschiedlichen Wachstumsbedingungen ist die taxonomische Einteilung mit rein morphologischen Daten als Grundlage schwierig. Die polyphasische Betrachtung, welche sich aus einer Kombination aus morphologischen, physiologischen und genetischen Informationen zusammensetzt, würde für die Identifizierung deutliche Vorteile bringen (Colwell, 1970).

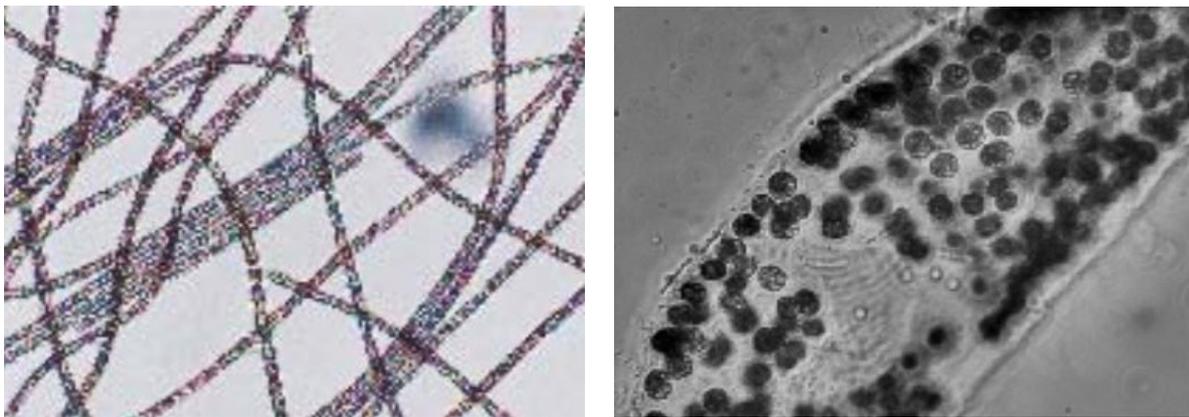


Abbildung 2: Links: Filamentöse Cyanobakterien (*Planktothrix*), Rechts: Koloniebildende Cyanobakterien (*Microcystis*)
(modifiziert nach Bayerisches Landesamt für Umwelt, 2006)

1.1.2 Algenblüte-Relevante Faktoren

Die Blütezeit und Massenentwicklung von Cyanobakterien ist in den einzelnen Regionen von unterschiedlichen Umweltfaktoren abhängig und wird durch biotische und abiotische Faktoren beeinflusst. Von ihnen werden nachfolgend einige aufgelistet (modifiziert nach Bayerisches Landesamt für Umwelt, 2006 und Chorus, 2010a):

1. Cyanobakterien weisen ihr Wachstumsoptimum im Vergleich zu anderen Phytoplanktern bei höheren Temperaturen auf. Sie vermehren sich deshalb vorwiegend im Spätsommer (Visser, 2015).
2. Cyanobakterien können im Vergleich zu anderen phototrophen Organismen anorganischen Kohlenstoff besser aufnehmen.

3. Cyanobakterien besitzen als lichtsammelnde Pigmente neben den fettlöslichen Chlorophyllen auch wasserlösliche Phycobiline (Phycocyanobilin und Phycoerythrobilin), die die Anpassung an Dämmerlicht und Schwarzlicht ermöglichen. Dieser Selektionsvorteil ist besonders günstig, wenn es zu einer Wassertrübung aufgrund von Algenwachstum kommt.
4. Viele Cyanobakterien besitzen Gasvesikel, die sie nutzen, um sich tageszeitenabhängig aktiv in optimale Gewässertiefen einzuschichten. Dies bringt auch einen Vorteil hinsichtlich der Phosphornutzung nahe des Sediments und Photosynthese an der Wasseroberfläche.
5. Einige Cyanobakterien, wie beispielsweise *Planktothrix rubescens* können bei Dämmerungslicht auf den energetisch günstigeren photoheterotrophen Metabolismus umschalten. Hierbei können auch organische Stoffe als Kohlenstoffquelle genutzt werden (Zotina, 2003).
6. Je nach vorliegender Stickstoffressource (z.B. NO_3 -Stickstoff oder NH_4 -Stickstoff) können sich die Cyanobakterien im Vergleich zu anderen Phytoplanktonern durch unterschiedliche Stickstofffixierungen anpassen.
7. Populationen von Cyanobakterien sind durch die Bildung von Aggregaten bzw. Kolonien stabiler als Einzelorganismen.
8. Die Exkretion von Cyanotoxinen und anderen organischen Komponenten hemmt das Wachstum von anderen Phytoplanktern (Luuc, 1999).

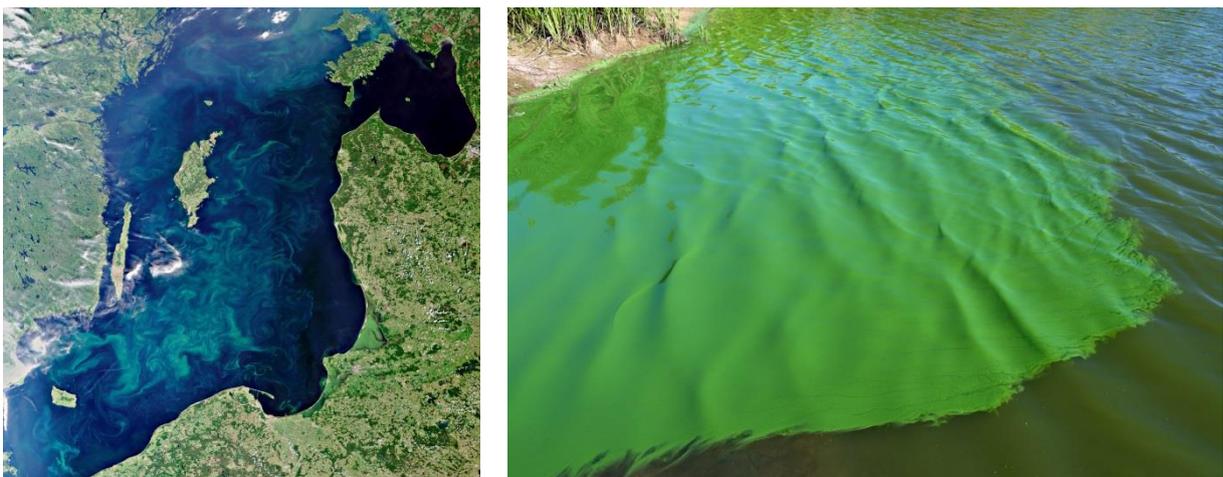


Abbildung 3: Links: Blaualgenblüte so groß wie Deutschland nahe der Küste von Stralsund im Jahr 2005 (Foto: ddp),
Rechts: Dichter Algenteppich in einem Baggerteich (Fischer, 2014).

1.2 Cyanotoxine

1.2.1 Einteilung der cyanobakteriellen Toxine

Hinsichtlich ihrer chemischen Struktur können Cyanotoxine in vier unterschiedliche Stoffklassen eingeteilt werden: zyklische Peptide, Alkaloide, Polyketide und Aminosäuren. Einen Überblick über die bekannten Cyanotoxine gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Zusammenfassung von Cyanotoxinen mit ihren primären Zielorganen und exemplarische Gattungen, die diese produzieren (Sivonen, 1999; Kuiper-Goodman, 1999).

Struktur	Cyanotoxine	Primäre Zielorgane bei Säugern	Cyanobakterien (Gattung)
Zyklische Peptide	MCs	Leber	<i>Microcystis, Planktothrix</i>
	Nodularin	Leber	<i>Nodularia</i>
Alkaloide	Anatoxin-a	Synapsen, Nerven	<i>Anabaena, Planktothrix, Oscillatoria</i>
	Cylindrospermopsin	Leber	<i>Cylindrospermopsis</i>
	Lyngbyatoxin-a	Haut	<i>Lyngbya</i>
	Saxitoxin	Synapsen, Nerven	<i>Alexandrium, Pyrodinium, Anabaena</i>
	Lipopolysaccharide	Magen-Darm-Trakt	<i>Alle (gramnegative Bakterien)</i>
Polyketide	Aplysiatoxine	Haut	<i>Lyngbya, Oscillatoria</i>
Aminosäure	<i>Beta</i> -Methylamino-L-alanin	Nervensystem	alle

Neben dieser Einteilung lassen sich cyanobakterielle Toxine hinsichtlich ihrer Wirkungsweise in folgende Gruppen einteilen: Hepatotoxine (z.B. MCs), Zytotoxine (z.B. Cylindrospermopsin), Neurotoxine (z.B. Anatoxin und Saxitoxin), Dermatotoxine (z.B. Aplysiatoxin und Lyngbyatoxin) und entzündlich wirkende Substanzen (z.B. Lipopolysaccharide). Die beiden zuletzt genannten spielen dabei eine untergeordnete Rolle.

In Abbildung 4 sind einige Cyanotoxine mit ihren Strukturformeln abgebildet. Die wichtigsten Vertreter der Neurotoxine sind Anatoxin und Saxitoxin. Das zytotoxische Alkaloid Cylindrospermopsin, welches hauptsächlich in den tropischen Gewässern Australiens vorkommt, greift vorwiegend die Leber an. Der Name des dermatotoxischen Aplysiatoxin stammt von

der Meeresschnecke *Aplysia californica*, die Cyanobakterien aufnimmt, um dieses Toxin als Feindabwehr zu verwenden (Nolen, 1995).

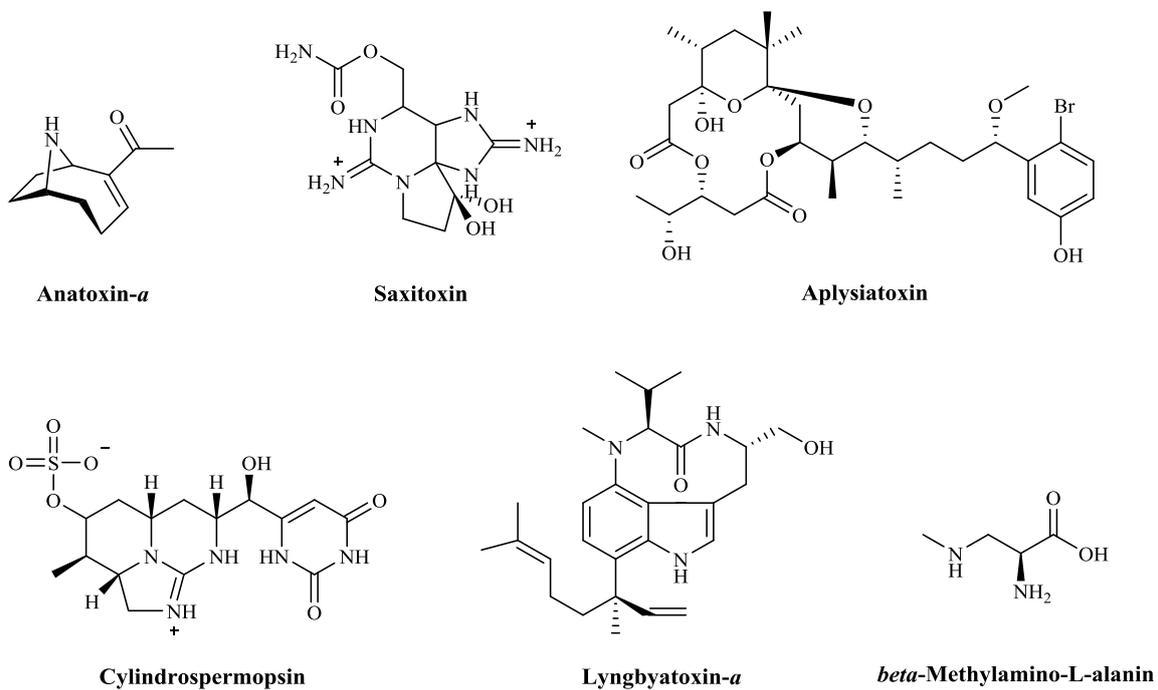


Abbildung 4: Chemische Strukturen einiger von Cyanobakterien produzierten Alkaloiden, Polyketiden und Aminosäuren.

Die jedoch weltweit am häufigsten verbreiteten Cyanotoxine stellen die zyklischen Hepatotoxine (MCs und Nodularine) dar.

1.2.2 Zyklische Hepatotoxine

Zu den bekanntesten und toxischsten Vertretern der Cyanotoxine gehören die zyklischen Hepatotoxine wie die Pentapeptide (Nodularine) und die Heptapeptide (MCs). Pentapeptide werden hauptsächlich von *Nodularia spumigena* hergestellt. Die Grundstruktur setzt sich aus cyclo-(D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdhb) zusammen. Hierbei ist D-MeAsp die Abkürzung für D-erythro- β -Methylasparaginsäure und Mdhb für 2-(Methylamino)-2-dehydrobuttersäure.

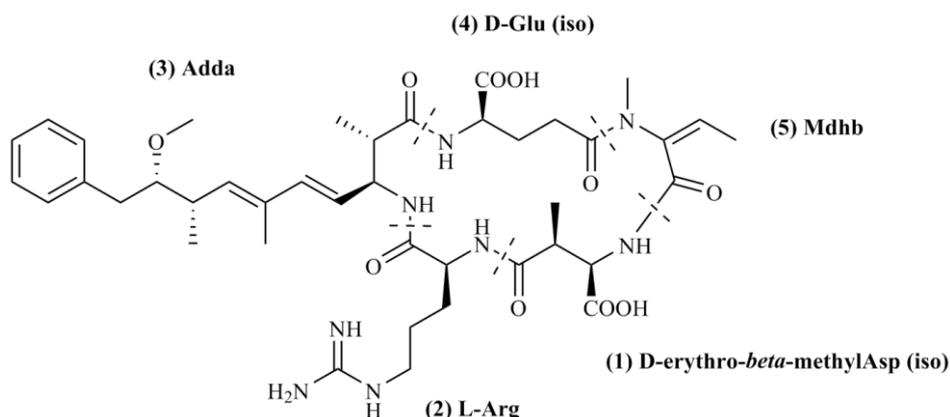


Abbildung 5: Chemische Struktur von Nodularin-R.

MCs werden hauptsächlich von den Gattungen *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc* und *Planktothrix* produziert. Von ihnen gibt es deutlich mehr Strukturvarianten im Vergleich zu den Nodularinen. Mittlerweile sind über 90 Varianten charakterisiert worden, die alle die cyclo-(D-Ala-L-X-D-Asp-L-Y-Adda-D-Glu-dehydro-Ala)-Grundstruktur gemein haben und sich meist im Grad der Methylierung, Hydroxylierung, Epimerisierung und Aminosäuresequenzen unterscheiden. Eine hohe Strukturvielfalt ist bedingt durch die große Variationsmöglichkeit an allen Positionen. Dabei ist die Position der variablen Aminosäuren (2) und (4) besonders bevorzugt (Abbildung 6). Die gängig verwendete Nomenklatur dieser Heptapeptide wurde 1988 eingeführt: der Einbuchstabencode der variablen Aminosäuren steht in Anschluss an die Abkürzung von MC (Carmichael, 1988). Microcystin-Leucin-Arginin beispielsweise besitzt Leucin in Position (2) und Arginin in Position (4) (siehe Abbildung 6) (Rinehart, 1994).

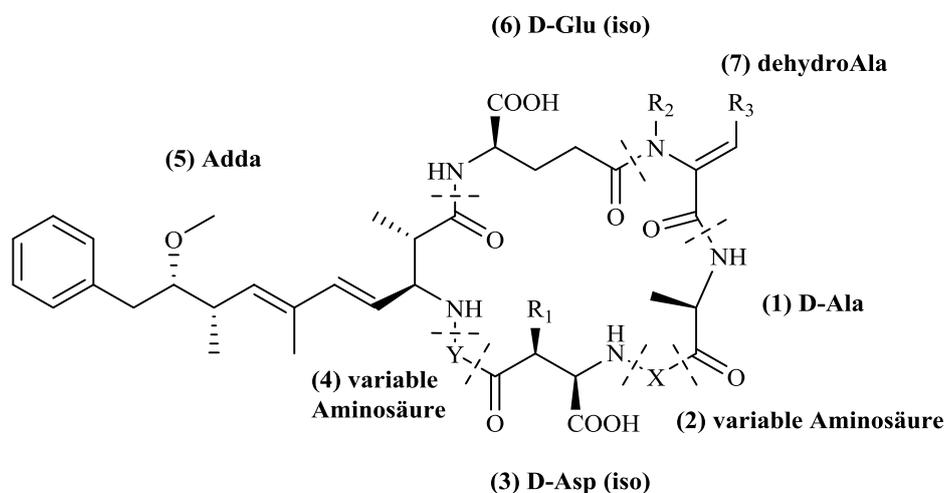


Abbildung 6: Chemische Struktur von Microcystin-XY.

Sowohl Nodularine als auch MCs besitzen die nichtpathogene C₂₀-Aminosäure 3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyldeca-10-phenyl-4,6-diensäure (Adda), die sich durch eine β -Aminogruppe, einigen Methylsubstitutionen, eine Dien-Einheit und insgesamt vier Stereozentren auszeichnet. Lokalisiert ist diese Adda-Seitenkette bei Nodularin in Position (3) und bei den MCs in Position (5).

1.2.3 Chemische Eigenschaften der Microcystine

MCs, deren Molekulargewicht je nach Aminosäuresequenz zwischen 900 und 1100 Dalton variiert, zeichnen sich durch eine relativ hohe chemische Beständigkeit aus. Bei neutralem pH-Wert, Raumtemperatur (RT) und Dunkelheit sind sie über Monate stabil. Auch gegen enzymatische Hydrolyse (z.B. durch Trypsin), mehrstündiges Erhitzen und Oxidation bei niedrigen pH-Wert sind sie inert. Erst bei drastischeren Bedingungen, etwa bei 40°C betragen die Halbwertszeiten bei einem pH-Wert von 9 etwa 10 Wochen und 3 Wochen bei einem pH-Wert von 1 (Sivonen, 1999).

Adda spielt eine große Rolle für die Eigenschaften der Hepatotoxine. Wegen des Vorhandenseins eines Chromophors, das sich durch konjugierte Doppelbindungen auszeichnet, ist eine Detektion im ultravioletten Bereich (UV) bei 238 nm möglich. Trotz der hydrophoben Adda-Seitenkette sind MCs relativ gut wasserlöslich. Allerdings gibt es große Unterschiede bei den einzelnen Strukturvertretern. Polare Reste, wie Amid-, Carboxyl- oder Guanidino-gruppen erhöhen die Wasserlöslichkeit (Zurawell, 2005). Strukturelle Veränderungen durch beispielsweise Isomerisierung in das Stereoisomer (6Z)-Adda oder *O*-Acetyl-*O*-demethyl-Adda können zu praktisch ungiftigen Substanzen führen (Rinehart, 1988). Des Weiteren spielt die Adda-Seitenkette eine entscheidende Rolle bei der Erkennung durch die Proteinphosphatasen. Eine Konformations- oder Strukturänderung führt daher in den meisten Fällen zu einer drastischen Verminderung der Toxizität (Dahlem, 1989). Dies kann mittels UV-Bestrahlung und Oxidation durch Chlor, Ozon oder Hypochlorit erreicht werden. Bei der photolytischen Zersetzung bedarf es kurzweiliger UV-Strahlung, die einerseits zur Isomerisierung der Adda-Doppelbindung führt, andererseits wird eine [2+2]-Cycloaddition zwischen dem Adda-Phenylring und der Adda-Doppelbindung eines anderen MC-Moleküls beobachtet (Tsuji, 1995; Kaya, 1998).

1.2.4 Wirkungsweise und Toxizität der Microcystine

Die Toxizität von Substanzklassen hängt von vielen Faktoren ab: Zeit (akute oder chronische Wirkung), Wirkungsort (systemisch oder lokal) und Art der Wechselwirkung zwischen Substanz und Individuum. Für die Beurteilung der akuten Toxizität einer Substanz wird der LD₅₀-Wert verwendet. Dieser entspricht der Dosis, bei der innerhalb eines bestimmten Zeitraums 50 % der Versuchstiere sterben (Aktoris, 2013).

Die am meisten erforschte Gruppe der Cyanotoxine stellt die der Hepatotoxine dar. Wie der Name „*hépar*“ aus dem Griechischen bereits verrät, ist das Zielorgan die Leber. Nach oraler Aufnahme werden MCs im Dünndarm resorbiert. Da sie allerdings im Allgemeinen nicht zellpermeabel sind, gelangen sie über carriervermittelte Membrantransporter, sogenannte Organo-Anion-Transporter, in die Leberzellen und reichern sich dort an. Die Anreicherung führt zur Schädigung der Leberepithelzellen, was letztlich in Nekrosen und Leberdystrophie enden kann. Neben der Leber können MCs allerdings auch die Nieren, den Darm und das Gehirn (Bluthirnschranke) schädigen (Fischer, 2005; La-Salette, 2008).

Mit LD₅₀-Werten im Bereich von 50–100 µg/kg (Maus, intraperitoneal, i.p.) gehören MCs damit zu den stärksten Naturtoxinen (Rinehart, 1994). Für die orale Aufnahme liegt der LD₅₀-Wert mit 5000 µg/kg (Maus, oral) deutlich höher (Sivonen, 1999). Vergiftungserscheinungen äußern sich meist zunächst durch Schleimhautreizungen und allergische Entzündungsreaktionen, gefolgt von Erbrechen, Übelkeit und Diarrhoe (Kuiper-Goodman, 1999). Als Wirkmechanismus wurde auf molekularer Ebene die Hemmung der isolierten Serin/Threonin Proteinphosphatasen 1 (PP1), 2A (PP2A) und 2B (PP2B) und möglicher weiterer Proteinphosphatasen identifiziert. Bei MCs bindet die Doppelbindung der Mdha-Region kovalent an einen Cysteinrest im aktiven Zentrum von PP1 und PP2A und induziert eine Konformationsänderung des Enzyms (Pereira, 2013). Die Abspaltung von Phosphatgruppen durch Hydrolyse von Phosphorsäureestern des Proteins wird dadurch gehemmt. Das Gleichgewicht zwischen der Phosphorylierung von Proteinen durch Kinasen und der Desphosphorylierung mittels Proteinphosphatasen wird somit auf die Seite der Hyperphosphorylierung verschoben. Dies wirkt sich auf den Abbau der Mikrofilamente des Zytoskeletts aus. Dies wiederum zeichnet sich in einer signifikanten Deformation und Verlust der mechanischen Stabilität der Zellen aus, was letzten Endes zum kompletten Zerfall der Gewebestruktur der Leber führt, oft begleitet durch Einblutung in die Leber (Fischer, 2000b; Carmichael, 1994).

Hinsichtlich einer chronischen Exposition und möglicher Langzeitwirkungen geringer Dosen zeigen aktuelle Studienergebnisse an Mäusen beispielsweise von Li et al., dass MC-LR in

Konzentrationen im Bereich von 1 µg/L bis 40 µg/L über einen Zeitraum von 12 Monaten mehrere Auswirkungen hervorruft. In der Leber führte MC-LR zu einer veränderten Expression der mitochondrialen Gene und ihrer Desoxyribonukleinsäure-Replikation (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) (Li, 2015). Neben der Veränderung der Proteinexpression war es vor allem die Lunge, die deutliche Veränderungen wie ein Anschwellen des Alveolarfortsatzes, Induktion von oxidativem Zellstress, Verschlechterung der Stabilität der mitochondrialen DNA in den Lungenzellen und die Expression veränderter Cytokine aufzeigt (Li, 2016). In einer weiteren Studie mit Mäusen zeigten Xu et al., dass MC-LR-Konzentrationen im Bereich zwischen 0,001 und 0,1 mg/kg pro Tag zwar keinen Einfluss auf das Gewicht eines Tumors hat und das Wachstum eines bereits vorhandenen Tumors nicht fördert. Allerdings erhöht eine Konzentration von 25 µg/L MC-LR die Invasivität von einigen Melanomzellen, den sogenannten MDA-MB-435-Zellen (Xu, 2013).

1.2.5 Vergiftungsfälle durch Cyanotoxine

Die ersten ausführlich dokumentierten Beschreibungen vom Auftreten von Algenblüten liegen aus dem Jahr 1878 vor, wo Weidevieh in Australien von Cyanotoxin-belastetem Wasser trank und anschließend starb (Francis, 1878). Weiter ist zu berichten, dass massive *Microcystis*-Blüten im *Ohio*- und *Potomac River* zur Erkrankung von mehreren tausend Menschen aufgrund der Aufnahme von kontaminierten Trinkwasser aus beiden Flüssen führten. Die klassischen Verfahren zur Wasseraufbereitung wie Fällung oder Chlorung führten zu keiner deutlichen Reduktion der Cyanobakterien (Tisdale, 1931). Später, im Jahr 1961 konnte erstmals ein klarer Zusammenhang zwischen den warmen Sommermonaten und dem deutlichen Anstieg an Gastroenteritisfällen bei Kindern in Salisbury, Rhodesien, verzeichnet werden, die alle das Trinkwasser aus einem Reservoir bezogen, welches mit *Microcystis* kontaminiert war (Zilberg, 1966). Neben Kindern, zählen vor allem Personen zu den Risikogruppen, bei denen die Leber oder die Nieren aufgrund von anderen akuten oder chronischen Erkrankungen bereits vorgeschädigt sind.

All diesen Beispielen lag die Exposition über das Trinkwasser zugrunde. Allerdings führt auch das Verweilen in belasteten Badegewässern zu ernstesten Symptomen, die auf das ungewollte Schlucken von Wasser und damit der Aufnahme von Cyanotoxinen zurückzuführen sind. Nachweislich sind in 27–83 % der Badeseen in Europa, Australien und in den USA, in denen Blaualgenblüten auftreten, auch jene Stämme vertreten, die die giftigsten Cyanotoxin-Vereiter, die MCs und Nodularine, produzieren (Falconer, 1998). Im Jahr 1959 klagten 13 Personen in Saskatchewan, Kanada, die in einem mit Cyanotoxinen belastetem Gewässer

badeten, über Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen (Dillenberg, 1959). Im Jahr 1989 konnte ein weiterer Vergiftungsfall an Rekruten des britischen Heeres beobachtet werden, die zu Übungszwecken mit Marschgepäck durch das Gewässer schwammen und sogenannte Eskimorollen in Kanus durchführen sollten. Aufgrund des Verschluckens einiger Milliliter an *Microcystis* kontaminiertem Wasser kam es zu den klassischen Symptomen wie Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe. Zwei Rekruten erlitten eine schwere Lungenentzündung, die auf das Einatmen des belasteten Aerosols zurückzuführen war (Turner, 1990). Das aber wohl bekannteste Beispiel ereignete sich 1996 in Caruaru, Brasilien. Hierbei löste die Hämodialyse gegen mit MC kontaminiertes Wasser bei rund 100 Patienten cholestatisches Leberversagen aus, wobei rund 70 Menschen verstarben. MC-LR konnte in den Aktivkohlefiltern der Dialyseeinheit und in Blut und Leber der verstorbenen Patienten nachgewiesen werden (Pouria, 1998; Jochimsen, 1998).

1.2.6 Richtlinien und Grenzwerte

Aufgrund der vorliegenden toxischen Wirkung der MCs, die vor allem aus einer oralen Aufnahme von kontaminiertem Wasser resultiert, ist die Entwicklung von Richtlinien zur Wasserreinigung sehr entscheidend. Grundlage für die Erstellung solcher Richtlinien liefern vor allem die toxikologischen Daten, resultierend aus Langzeitstudien mit Versuchstieren zur subchronischen Toxizität. Hierbei wird die MC-LR-Konzentration im Trinkwasser ermittelt, bei der keine oder nur sehr geringe negative Effekte auftreten. Fawell et al. zeigten an einer Langzeitstudie mit Mäusen, dass eine Konzentration von 40 µg pro Kilogramm Körpergewicht und Tag bei oraler Aufnahme von MC-LR über die Nahrung zu keinerlei negativen Wirkung führt (engl. *no observed adverse effect level*, NOAEL) (Fawell, 1994). Für die Verwendung dieses Wertes für rechtlich wirksame Wasserverordnungen müssen Sicherheitsfaktoren mit einbezogen werden. So wird die NOAEL-Konzentration durch einen Extrapolationsfaktor von zehn dividiert, um die unterschiedlichen Empfindlichkeiten zwischen Mensch und Tier und zwischen den Individuen der menschlichen Bevölkerung zu berücksichtigen. Hierzu kommt ein weiterer Faktor von zehn, um die Unsicherheiten in der Datenlage zu eliminieren. Basierend auf diesen Daten und Berechnungen hat die WHO einen vorläufigen Grenzwert für Trinkwasser vorgeschlagen, den Deutschland und die USA übernommen haben. Die Summe an freien und zellgebundenen MCs darf dabei maximal 1 µg/L betragen, unabhängig davon, ob im Trinkwasser noch Cyanobakterienzellen nachweisbar sind oder nicht (WHO, 1998). Ergebnisse einer Langzeitstudie von Ueno et al. wurden bei der Ableitung des vorläufigen Grenzwertes nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse zeigten allerdings, dass besonders weibliche

Mäuse eine etwa 100-fach niedrigere MC-LR-NOAEL-Konzentration aufwiesen (Ueno, 1999). Hinsichtlich der aktuellen Diskussion um die potentiell karzinogenen Eigenschaften von MC-LR hat die IARC MC-LR in die Gruppe 2B eingeteilt und somit als möglich karzinogen eingestuft (IARC, 2010). Somit scheint die Anpassung des aktuellen Grenzwertes für Trinkwasser aufgrund dieser Forschungsergebnisse notwendig zu sein.

In Deutschland wird der EU-Grenzwert ‘Sichttiefe von einem Meter’ von über 40 % der ausgewiesenen Badestellen zeitweilig nicht eingehalten. Die Ursache für die Trübung ist allerdings häufig bedingt durch das massenhafte Auftreten von Cyanobakterien. Dies lässt den Schluss zu, dass ein Gesundheitsrisiko häufig durch die Exposition beim Baden gegeben ist (Chorus, 2010b). Ein Richtwert im Rahmen der Badegewässernutzung wurde von der WHO bisher noch nicht veröffentlicht, allerdings werden Leitwerte zur Orientierung in einem dreistufigen Überwachungskonzept angegeben. Basierend auf aktuellen Forschungsergebnissen wurden auch vom Umweltbundesamt in Dessau Empfehlungen zum Schutz von Badenden vor Cyanotoxinen herausgegeben, da vor allem die regelmäßige orale Exposition ein Gesundheitsrisiko darstellt (Umweltbundesamt, 2015). Als Grundlage für die Risikobewertung wird von den meisten Ländern die Cyanobakterienbiomasse verwendet, d.h. die Zelldichte, das Biovolumen oder die Chlorophyll-a-Konzentration. Diese Werte korrelieren meist direkt mit der Menge an Cyanotoxinen. In Tabelle 2 sind die veröffentlichten Leitwerte der WHO zur gesundheitlichen Bewertung des Vorkommens von Cyanobakterien und der einhergehenden erwarteten MC-Konzentrationen zusammengefasst.

Tabelle 2: Leitwerte der WHO zur gesundheitlichen Bewertung des Vorkommens von Cyanobakterien (WHO 2003).

Wahrscheinlichkeit^a	Zellzahl (Biovolumen)	Chl.-a (bei Dominanz von Cyanobakterien)	MC- Konzentration
Geringe	20000/mL (~2 mm ³ /L)	10 µg/L	2–4 µg/L (maximal 10 µg/L)
Moderate	100000/mL (~10 mm ³ /L)	50 µg/L	20 µg/L (maximal 50–100 µg/L)
Hohe	Algenblüte	-	-

^a Wahrscheinlichkeit der adversen Wirkung auf die Gesundheit

Bislang gingen die Einschätzungen des Umweltbundesamtes davon aus, dass eine Konzentration von <192 µg/L MC-LR kein erhöhtes Gesundheitsrisiko darstellt, auch nicht bei häufiger saisonaler Exposition aufgrund des Schluckens von Wassers (Umweltbundesamt, 2015).

Hierbei wurde allerdings vernachlässigt, dass Kleinkinder ein deutlich geringeres Körpergewicht ausweisen. Die saisonal täglich tolerierbare Konzentration für Kleinkinder sollte einen Wert von 32 µg/L MC-LR nicht überschreiten (Roller, 2000). Als akut tolerierbar, d.h. eine einmalige Exposition pro Saison bei einer Wasseraufnahme von 0,25 L, wird ein MC-LR-Wert von 600 µg/L für Erwachsene und 100 µg/L für Kinder angegeben. Die im Vergleich zum WHO-Trinkwasser-Leitwert zwischen 100-fach und 600-fach höhere Konzentration kann damit begründet werden, dass der Extrapolationsfaktor von zehn für die vorübergehende Exposition entfallen kann. Auch werden bei der verschluckten Wassermenge lediglich 50–100 mL statt 1–2 Liter angenommen (Chorus, 2010b).

Um eine Risikoabschätzung für Badegäste zu vereinfachen und zu visualisieren, wurde ein dreistufiges Überwachungsschema entwickelt. Bei Stufe 1 (Sichttiefe <2 m, >5 µg/L Cyanobakterien-Chlorophyll a, Chl.a) herrscht eine erhöhte Aufmerksamkeit, die Überwachungshäufigkeit wird verstärkt und es erfolgt eine allgemeine Aufklärung der Badegäste. Stufe 2 (Sichttiefe <1 m, eventuell Auftreten von grünen Schlieren, >15 µg/L Cyanobakterien-Chl.a) induziert direkte Warnhinweise. Die 3. Stufe (Sichttiefe <0,5 m, Bildung von Algenteppichen, >75 µg/L Cyanobakterien-Chl.a) gilt als die Alarmstufe, welche ein Badeverbot und die Schließung der Badestelle mit sich zieht (Umweltbundesamt, 2015).

1.2.7 Eliminierung von Cyanobakterien und Cyanotoxinen

Für die Entfernung von Cyanobakterien und ihrer toxischen Sekundärmetaboliten zur Einhaltung der WHO-Grenzwerte für Trinkwasser und der Leitwerte für Badegewässer des Umweltbundesamts, stehen chemische und physikalische Methoden zur Verfügung. Grundsätzlich sollten die Zellen intakt entfernt werden, da erst eine Zerstörung der Bakterienmembran durch mechanischen oder chemischen Stress dazu führt, dass die giftigen Cyanotoxine freigesetzt werden (Pietsch, 2002).

Die chemischen Verfahren zielen auf die Oxidation der reaktiven Adda-Aminosäure der Hepatotoxine ab, da diese Struktur essenziell für die Erkennung der Proteinphosphatasen ist und eine Änderung meist eine Verringerung der Toxizität mit sich zieht (Hrudey, 1999). Beim Einsatz dieses Verfahrens werden zunächst die Zellen durch das Oxidationsmittel geschädigt und die Cyanotoxine freigesetzt, dementsprechend muss die Menge an Oxidationsmittel erhöht werden, um sicherzustellen, dass eine vollständige Oxidation der Toxine erfolgt. Bei der Trinkwasseraufbereitung kommt als Oxidationsmittel hauptsächlich Ozon zum Einsatz, aber auch Natriumhypochlorit, Kaliumpermanganat und Chlor finden Verwendung. Bei der Anwendung von Ozon reichen bereits 2 mg/L um 500 µg/L MC-LR bei einem pH-Wert von 2

vollständig zu oxidieren (Shawwa, 2001). In Deutschland findet Chlor eher weniger Anwendung, da selbst ein Gehalt von 0,5 mg/L und einer Kontaktzeit von 30 Minuten nicht ausreichend sind, um alle MCs zu oxidieren (Nicholson, 1994).

Zum anderen kann mittels UV-Bestrahlung im Bereich des Absorptionsmaximums von MCs eine Isomerisierung der Adda-Doppelbindung erzielt werden. Dieser Reaktion liegt ein dynamisches Gleichgewicht zwischen cis- und trans-Isomer zugrunde, welches eine vollständige Umwandlung in das weniger toxische cis-Isomer verhindert (Harada, 1990).

Als physikalische Methoden eignen sich vor allem Filtrationstechniken und die Ausflockung mit beispielsweise Aluminiumsulfat, um intakte Cyanobakterienzellen zu eliminieren. Der Wirkungsmechanismus der Langsandsandfiltration beruht auf der Bildung einer sogenannten Schmutzdecke innerhalb der ersten 10–20 Betriebstage (Hrudey, 1999). Diese Schicht besteht hauptsächlich aus einem komplexen Biofilm, in welchen die Kontaminanten eindringen und dort adsorbiert werden (Huisman, 1974). Anschließend erfolgt die Metabolisierung durch die im Biofilm vorhandenen Bakterien. Das Filtrationsprinzip bei der Mikro- und Ultrafiltration ist der mechanische Größenausschluss: Bakterienzellen dringen in die Membranporen und werden so zurückgehalten. Jedoch können zu hohe Flüsse, zu hoher Druck oder Scherkräfte bei diesem Verfahren dazu führen, dass die Zellwand der Cyanobakterien geschädigt wird und die Toxine freigesetzt werden. Gelöste Cyanotoxine adsorbieren am effektivsten an Aktivkohle, dabei beruht das Wirkungsprinzip auf der Ausbildung von London-Dispersionskräften, einer Form der van-der-Waals-Kräfte. Mit steigendem Molekulargewicht, steigender Polarisierbarkeit und steigender Anzahl an funktionellen Gruppen steigt die Adsorbierbarkeit einer Verbindung an Aktivkohle (Cook, 2002). Der Abbau der Toxine durch den vorhandenen Biofilm auf dem Trägermaterial wird wie bei der Langsandsandfiltration ebenfalls als Wirkungsprinzip diskutiert. Nachteile dieser Methode sind die geringe Selektivität und die rasche Verschmutzung (engl. *carbon-fouling effect*). Gerade dann, wenn eine verstärkte Cyanobakterienbelastung vorherrscht, entstehen nicht nur Toxine, sondern auch gelöste organische Kohlenstoffe (engl. *dissolved organic carbon*, DOC), mit denen die Cyanotoxine um die Bindungsstellen der Aktivkohle konkurrieren. Weitere Abreicherungsmöglichkeiten von gelösten MCs aus Trinkwasser sind die Nanofiltration (Porengröße <2 nm) oder Umkehrosmose (Teixeira, 2005).

2 Analytik von Microcystinen

Da bereits, wie unter Punkt 1.2 in Kapitel II beschrieben, geringe Konzentrationen an Microcystinen toxisch sein können, müssen die analytischen Methoden zum qualitativen und quantitativen Nachweis sensitiv, robust, reproduzierbar und trotz hohem Probendurchsatz zuverlässig sein. Da eine einzelne Analysenmethode oftmals nicht alle erwähnten Kriterien erfüllt, kommen mehrere Techniken zum Einsatz.

Für die Bestimmung der MC-Konzentration haben sich vor allem Immunoassays und die chemische Analyse mittels chromatographischer Trennung und anschließender Detektion anhand von charakteristischen UV-Absorptionsspektren mittels Photodiodenzeilen-Detektor (engl. *photo diode array*, PDA) und Massenspektrometer (MS) bewährt. Vor der Wahl des richtigen Analyseverfahrens, welches sich aus der Probenahme, der Probenvorbereitung, der Messung, Auswertung, Statistik und der Verfassung eines Berichts zusammensetzt, müssen zunächst folgende Punkte bedacht werden:

- Art der Probenahme,
- Zusammensetzung der Probenmatrix,
- Probenvorbereitung,
- Wahl der Analysetechnik.

2.1 Probenahme und Probenvorbereitung

Die Probenahme aus Gewässern kann grundsätzlich diskontinuierlich oder kontinuierlich erfolgen. Bei der diskontinuierlichen Probenahme wird in regelmäßigen Abständen eine Wasserprobe von derselben Stelle und Wassertiefe entnommen. Diese Probenahme hat den Vorteil, dass man auf lokale Schwankungen flexibel reagieren kann. Wasserproben können wahlweise auch dann entnommen werden, wenn durch lokale Schwankungen zusätzlich Schlieren und/oder grünliche Trübungen im Wasser auftreten. Bei der diskontinuierlichen Probenahme kann zwischen einer einmaligen Probe aus einer definierten Wassertiefe zu einem bestimmten Zeitpunkt oder einer zusammengesetzten Wasserprobe aus mehreren Wassertiefen und -stellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten unterschieden werden. Mit der letztgenannten Probenart wird versucht, der oft inhomogen auftretenden Verteilung von Cyanobakterien und -toxinen innerhalb des Gewässers gerecht zu werden (Utkilen, 1999). Für Badegewässer mit gleichmäßig verteilten Cyanobakterien wird beispielsweise eine Schöpf-

probe von der Wasseroberfläche entnommen, bei Inhomogenität möglichst von der Stelle der größten Anhäufung (Chorus, 2010a).

Bei der kontinuierlichen Probenahme und Analyse kommen hingegen Sensoren zum Einsatz, die über einen längeren Zeitraum an einer oder mehreren ausgewählten Stellen platziert werden. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass auch bei zeitlich auftretenden Schwankungen Daten geliefert werden können.

Die Wahl der Art der Probenahme wird hauptsächlich durch die Häufigkeit der Probenahme, die Zugänglichkeit der Probenahmestelle und die Relevanz des Gewässers (Trinkwasserreservoir oder nicht genutztes Gewässer) bestimmt.

Bei der Probenvorbereitung ist zunächst zu beachten, dass bis zu 90 % der MCs meist zellgebunden vorliegen und erst nach der Zellyse freigesetzt werden. Um die Gesamtmenge an MCs zu bestimmen, müssen die Toxine zunächst extrahiert werden. Wichtig hierbei ist der Einsatz von sowohl polaren als auch unpolaren Lösungsmitteln, da die Polaritätsunterschiede einzelner MCs berücksichtigt werden müssen. Als Lösungsmittel kommen meist Methanol (MeOH)/Wassergemische mit Zusatz von Essigsäure oder Trifluoressigsäure (engl. *trifluoroacetic acid*, TFA) zum Einsatz (Harada, 1999; Meriluoto, 1997). Soll der extrazelluläre MC-Gehalt bestimmt werden, so ist eine rasche Abtrennung der noch intakten Cyanobakterien durchzuführen. Absterbende Cyanobakterien setzen die Toxine nach der Zellyse frei und würden so die Ergebnisse verfälschen.

Die Probe (etwa 1 L) wird zunächst über einen Glasfaser- oder Membranfilter filtriert und anschließend über Festphasenextraktion (engl. *solid phase extraction*, SPE) mittels C₁₈-Silikasäulen aufkonzentriert und anschließend quantifiziert (Lawton 1994). Neben der Aufkonzentrierung werden vor allem auch Matrixbestandteile, die sich störend auf die Quantifizierungsmethode auswirken, wie Zellbestandteile (Proteine, Farbpigmente) oder Wasserinhaltsstoffe (z.B. chaotrope Ionen, Huminsäuren) entfernt. Werden Immunoassays, wie der enzymgekoppelte Immunabsorptionstest (engl. *enzyme-linked immunorbent assay*, ELISA) als Quantifizierungsmethode herangezogen, genügt eine Schöpfprobe von wenigen Millilitern aufgrund der hohen Nachweisstärke dieses Verfahrens. Es kann meist auf die SPE verzichtet werden. Andere geeignete Aufreinigungs- und Konzentrierungsverfahren sind die Ionen-, Gel- und Immunoaffinitätschromatographie (IAC) (Martin, 1990, Kondo, 1996).

2.2 Physikalisch-chemische Nachweismethoden

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mittels Umkehrphase (engl. *reversed-phase high performance liquid chromatography*, RP-HPLC) ist die am weitesten verbreitetste Trennmethode von MCs. Dabei spielt die Adda-Seitenkette eine entscheidende Rolle. Der durch Adda induzierte hydrophobe Charakter führt dazu, dass die MCs an die Umkehrphase adsorbieren können.

Nach der chromatographischen Separation erfolgt die Detektion. Die traditionellste Methode ist die photometrische Detektion im UV-Bereich. Die Quantifizierung erfolgt meist beim Absorptionsmaximum der konjugierten Adda-Doppelbindung bei 238 nm, was dem Hauptchromophor entspricht (Lawton, 1994). Bei tryptophanhaltigen MCs kann ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei 222 nm beobachtet werden (Moollan, 1996). Neben der Bestimmung der Absorption bei einer eingestrahlten Wellenlänge, kann auch die Absorption über den gesamten spektralen Wellenlängenbereich von 100 nm bis 1100 nm erfasst werden. Es kommen häufig PDAs mit Halbleitermaterialien aus Silizium zum Einsatz. Die Analytik von MCs mittels HPLC-PDA ist in ISO 20179 beschrieben (ISO 20179, 2005). Großer Vorteil ist, dass die MCs anhand ihres charakteristischen Spektrums identifiziert werden können, von denen keine Referenzsubstanzen kommerziell erhältlich sind. Ein Problem der Quantifizierung von MCs besteht allerdings darin, dass derzeit nur etwa sechs der mehr als 90 bekannten Strukturvarianten als analytische Standards kommerziell erhältlich sind (McElhiney, 2005). Hierbei sollte erwähnt sein, dass es aufgrund der ähnlichen chemischen Eigenschaften zu Co-Elutionen verschiedener MCs kommen kann (Fastner, 1999).

Neben der UV-Detektion können auch die Fluoreszenz- und Chemilumineszenz-Detektion angewendet werden. Dazu muss stets eine Vorsäulenderivatisierung durchgeführt werden. Zusätzlich zu der Reaktion der Adda-Doppelbindung mit einem dienophilen Fluoreszenzfarbstoff, kommt hauptsächlich ein zweistufiger Reaktionsmechanismus an der α,β -ungesättigten Carbonylgruppe des *N*-Methyldehydroalanins zum Einsatz. Dabei wird zunächst ein Cystein eingeführt und anschließend 5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonyl addiert. Für die Chemilumineszenz-Detektion wurden Nachweisgrenzen von etwa 15 fmol erreicht (Murata, 1995). Für den Nachweis mittels Fluoreszenz-Detektor wird zunächst das Zwischenprodukt *erythro*-2-Methyl-3-methoxy-4-phenylbuttersäure (MMPB) erhalten, welches aus einer Oxidation resultierender Spaltung der Adda-Doppelbindung und anschließender Veresterung entsteht. Anschließend erfolgt die Umsetzung mit 2-(2,3-Naphthalimino)ethyl-trifluormethansulfonat (Sano, 1992). Neben der HPLC kommen zur MC-Bestimmung auch Trennmethoden wie die

Dünnschichtchromatographie (Ojanperä, 1995; Pelander, 1996) und die Kapillarelektrophorese zum Einsatz. Die Detektion erfolgt ebenfalls wie bei der HPLC durch Fluoreszenz oder Chemilumineszenz.

Zur genaueren Bestimmung der einzelnen MC-Varianten hat sich eine Kombination aus HPLC und MS bewährt, da diese Detektionsmethode eine eindeutige Identifikation über deren Masse zulässt. Die *Fast-Atom-Bombardment-Massenspektrometrie* (Kondo, 1995), die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (engl. *atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) (Ott, 2006) und die Ionisierung mittels Elektrospray (engl. *electrospray ionization*, ESI) (Edwards, 1993) zählen dabei zu den „sanften“ Ionisierungsmethoden und liefern meist einfach protonierte oder deprotonierte Moleküle. Fastner et. al demonstrierten die Identifikation von MCs in einzelnen *Microcystis* Kolonien, indem die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation gekoppelt mit einem Flugzeitmassenspektrometer (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization* gekoppelt mit *time-of-flight mass spectrometer*, MALDI-TOF) verwendet wurde (Fastner, 2001; Erhard, 1997).

Generell findet die Verwendung der Gaschromatographie (GC) zum Nachweis von MCs nur wenig Beachtung, da diese aufgrund des sehr geringen Dampfdrucks nicht flüchtig sind und daher die Bestimmung ohne eine vorherige Derivatisierung nicht möglich ist. Unter anderem zeigten Kaya et al., dass sich das MMPB-Derivat eignet, um MCs mittels GC-Analyse mit Flammenionisationsdetektion oder massenspektrometrischer Detektion bestimmen zu können (Kaya, 1999; Sano, 1992).

2.3 Enzym-Inhibitionsassay

Für die Enzym-Inhibitionsassays werden Serin/Threonin-Proteinphosphatasen verwendet, die durch die Bindung von MCs inhibiert werden. Dies erfolgt durch die Interaktion von Adda-Seitenketten, Glutamyl-Carboxylgruppen und *N*-Methyldehydroalanin der MCs mit den Bindungstaschen der Enzyme (Goldberg, 1995). Folglich wird die Enzym-Substrat-Umsetzung beeinflusst und es resultiert eine reduzierte Signalfreisetzung. Dies kann mit den Enzym-Inhibitionsassays quantifiziert werden (engl. *Protein Phosphatase Inhibition Assay*, PPIA).

Proteinphosphatasen sind eine Gruppe von Enzymen, die die Hydrolyse von Phosphorsäureestern oder Polyphosphaten katalysieren, indem sie die durch Proteinkinasen an Aminosäurereste (meist Serin und Threonin) angehefteten Phosphatreste abspalten. Je nach Substratspezifität und -sensitivität gegenüber Inhibitoren, werden Proteinphosphatasen in zwei Typen kategorisiert: Typ 1 (PP1) und Typ 2 (PP2A, PP2B, PP2C). Um den PPIA durchzuführen

werden Proteinphosphatasen, die meist aus den Skelettmuskeln von Versuchstieren isoliert werden, zunächst für 10–20 Minuten mit der MC-Probe inkubiert. Ein hypothetischer Bindungsmechanismus wurde von Craig et al. veröffentlicht (Craig, 1996). Hierbei stellt sich nach wenigen Minuten ein Gleichgewicht ein, die MCs lagern sich kompetitiv in der Bindungstasche des Enzyms an und die katalytische Untereinheit wird blockiert. Im zweiten, sehr langsamen Schritt, erfolgt die kovalente Bindung durch die nukleophile Addition eines Thiols der Proteinphosphatase an die α,β -ungesättigte Carbonylgruppe des *N*-Methyldehydroalanin der MCs. Für die Farbreaktion wird meist *p*-Nitrophenylphosphat (*p*-NPP) als Substrat verwendet, welches zu der vorinkubierten Probe-Proteinphosphatase-Lösung zugegeben wird. Dabei wird es zu *p*-Nitrophenolat hydrolysiert und weist ein Absorptionsmaximum bei 405 nm auf. Ein invers proportionales Signal entsteht: je höher die MC-Konzentration, desto mehr Proteinphosphatasen werden inhibiert und desto niedriger ist die Substratumsetzung. Mittels des Testmittelpunkts des Assays (engl. *half maximal inhibitory concentration*, IC_{50}) kann eine Aussage über die Nachweisstärke dieses Assays getroffen werden. Je nach verwendeter Proteinphosphatase (PP1 oder PP2A) liegt dieser zwischen 0,15 $\mu\text{g/L}$ und 1 $\mu\text{g/L}$ (Craig, 1996; Heresztyn, 2001; An, 1994; Eriksson, 1990).

2.4 Immunoassays

Allen relevanten immunologischen Methoden liegt das Grundprinzip der Erkennung eines Antigens durch einen spezifischen Antikörper zugrunde. Aufgrund der hohen Spezifität dieser molekularen Erkennung, können einzelne Analyte, auch in teilweise sehr komplexen Matrices, qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden. Im Falle einer hohen Kreuzreaktivität (KR) des verwendeten Antikörpers, ist es auch möglich, strukturell verwandte Substanzen zu erkennen. Grundsätzlich kann bei Immunoassays eine Einteilung in homogene und heterogene Verfahren erfolgen (siehe Abbildung 7).

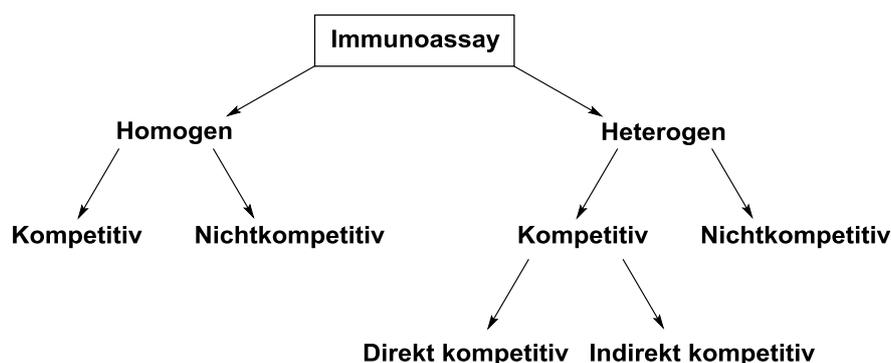


Abbildung 7: Einteilung der Immunoassays.

Bei einem homogenen Immunoassay findet die Immunreaktion in homogener Phase statt und die Aktivität eines Markerenzym wird direkt durch die Bildung des Antikörper-Antigen-Komplexes beeinflusst. Die Immunreaktion kann auch über Fluoreszenz-Polarisation oder *Enzyme-Channeling* direkt in Lösung nachgewiesen werden (Jolley, 1981; Litman, 1980). Substanzen, die nicht gebunden werden, beeinflussen die Antikörper-Antigen-Interaktion nicht. Wasch- und Trennschritte sind daher bei dieser Art des Immunoassays meist nicht erforderlich. Auf eine Immobilisierung der Antikörper oder Antigene an eine gut adsorbierende oder chemisch aktivierte Festphase kann ebenfalls verzichtet werden. Beispiele für diese Art des Immunoassays sind der Fluoreszenz-Polarisation-Immunoassay (FPIA) und der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Immunoassay (FRET-IA). Nachteile homogener Verfahren sind höhere Störanfälligkeit und geringere Nachweisstärken im Vergleich zu den heterogenen Immunoassays, weshalb man häufig auf letztere zurückgreift.

Bei den heterogenen Immunoassays wird die Enzymaktivität (z.B. Meerrettichperoxidase engl. *horseradish peroxidase*, HRP markierter Sekundärantikörper) nicht direkt durch die Anwesenheit von Immunreaktanden beeinflusst. Einzelne Wasch- und Trennschritte sind während der Durchführung notwendig, um überschüssiges Antigen bzw. Antikörper zu entfernen. Für die Immobilisierung der Antikörper oder Antigene ist eine Festphase notwendig. Die Nachweisgrenzen im heterogenen Format sind im Vergleich zu den homogenen Assays deutlich niedriger. Als Beispiele sind hier der ELISA, der Radioimmunoassay und der Fluoreszenz-Immunoassay zu erwähnen.

Sowohl heterogene als auch homogene Immunoassays lassen sich im kompetitiven oder nichtkompetitiven Format durchführen. Ist es mittels einer Methode möglich, die Bindung zwischen Analyt und Antikörper direkt zu messen, so werden diese Immunoassays als nichtkompetitiv bezeichnet. Bei kompetitiven Verfahren wird die Bindung des Antikörpers hingegen mittels Analyt-Marker-Konjugat detektiert. Der Tracer wird in einer definierten Menge zugesetzt und tritt mit dem Antigen um die limitierten Paratope in Konkurrenz.

2.4.1 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Der heterogene ELISA stellt eine kostengünstige und schnelle bioanalytische Methode dar. Weitere Vorteile liegen in der hohen Nachweisstärke und Selektivität, die die Antikörper-Antigen-Interaktion zugrunde liegt und dem geringen praktischen Aufwand hinsichtlich des apparativen Aufbaus, der Probenvorbereitung und der Durchführung. Wie bereits unter Punkt 2.4 in Kapitel II beschrieben, kann der ELISA in verschiedenen Formaten durchgeführt werden. Zum einen unterscheidet man das direkte bzw. indirekte Format, je nachdem, ob der An-

tikörper oder das Antigen adsorptiv an die Mikrotiterplatte (MTP) immobilisiert wird. Zum anderen kann zwischen nichtkompetitiven und kompetitiven Verfahren unterschieden werden. Letztgenannte zeichnen sich durch die Konkurrenzreaktion von Antigenen um die Bindestellen des im Überschuss vorliegenden Antikörpers aus. Allen heterogenen Verfahren gemein ist die finale Signalentwicklung über einen Enzymtracer (z.B. Peroxidase, POD), welcher eine chemische Reaktion katalysiert, die über eine optische Methode (Absorption, Chemilumineszenz, Fluoreszenz) quantifiziert werden kann.

Stehen größere Analyten (z.B. Bakterien) im Fokus, welche aus sterischen Gründen mehrere Epitope für Antikörper besitzen, so wird häufig der nichtkompetitive *Sandwich*-ELISA angewendet. Abbildung 8 zeigt den schematischen Ablauf dieses Formats.

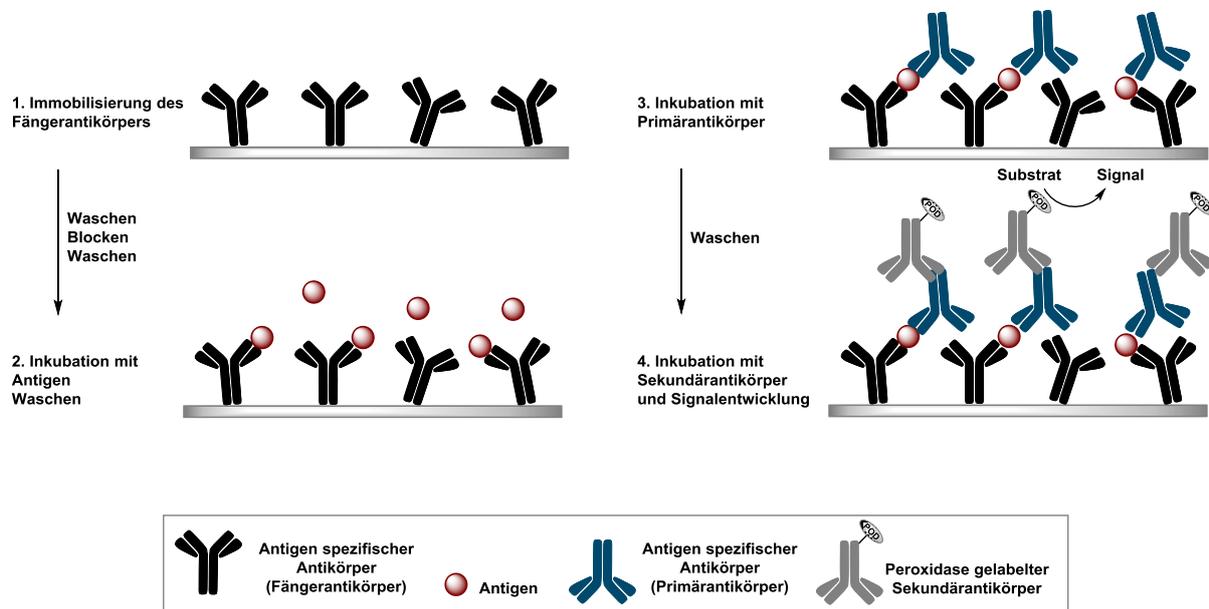


Abbildung 8: Schematischer Ablauf eines *Sandwich*-ELISAs.

Im ersten Schritt wird hierfür der Fängerantikörper an der MTP immobilisiert und über Nacht inkubiert. Nach einem Waschschrift mit einem tensidhaltigen Puffer, erfolgt die Zugabe des Antigens. Ein weiterer Antikörper (Primärantikörper) wird zugegeben, der an einem anderen Epitop des Analyten bindet. Nach einem erneuten Waschschrift wird ein enzymmarkierter Sekundärantikörper hinzugegeben, der gegen den Fc-Teil artfremder Antikörper gerichtet ist. Die Signalentwicklung erfolgt nach der Zugabe eines chromogenen Substrats. Das Verhältnis zwischen der Intensität der Farbentwicklung und der Konzentration des Antigens ist dabei gleichsinnig proportional.

Da es sich bei den meisten Analyten um Substanzen mit einem eher kleineren Molekulargewicht und nur einem Epitop handelt (z.B. Cyanotoxine), wird generell auf das kompetitive Format zurückgegriffen.

Bei dem direkt kompetitiven ELISA (Abbildung 9) wird der Primärantikörper adsorptiv an die MTP gebunden. Mittels Waschschriff werden die nichtgebundenen Antikörper entfernt und durch Zugabe einer Blocklösung weitere oder freibleibende Bindestellen blockiert. Nach Vorkinkubation mit dem Antigen wird ein mit einem Tracer markiertes Antigen-Konjugat in die Kavitäten der MTP gegeben. Nach einem erneuten Waschschriff kann der Tracer über die Enzymreaktion nachgewiesen werden.

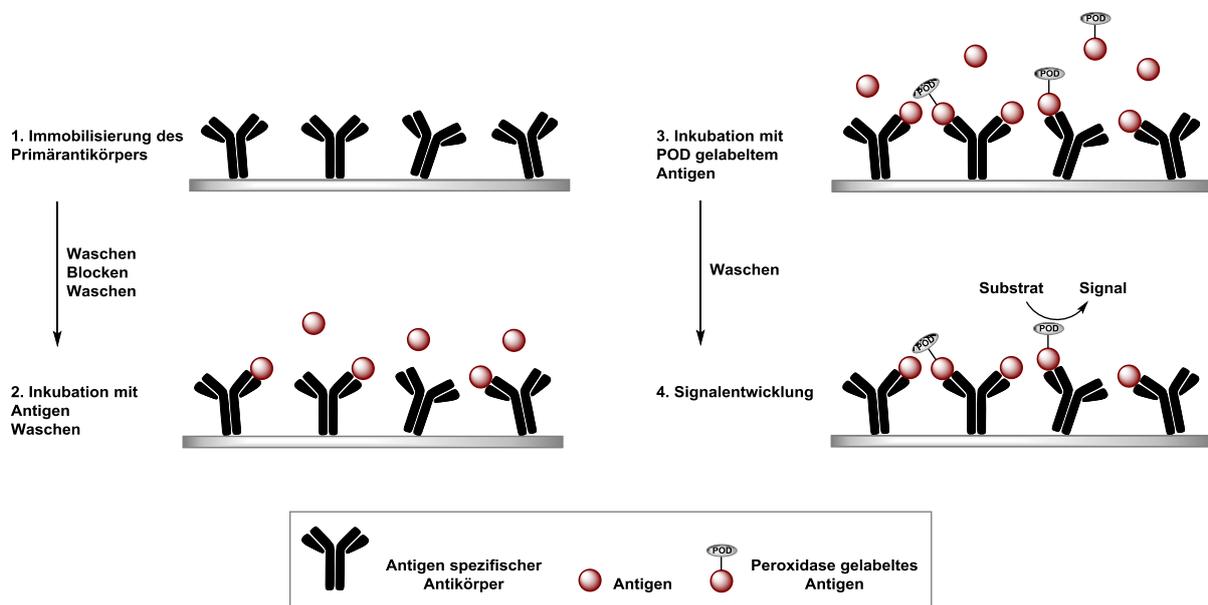


Abbildung 9: Schematischer Ablauf eines direkt kompetitiven ELISAs.

Nach der Farbentwicklung wird ein zur Analytkonzentration invers proportionales Signal erhalten: Je höher die Antigenkonzentration, desto schwächer ist das Signal. Ein großer Vorteil dieses Formates ist die Schnelligkeit und hohe Nachweisstärke. Nachteilig ist die notwendige Herstellung der Analyt-Enzym-Konjugate.

Anders als bei dem direkt kompetitiven ELISA, wird beim indirekt kompetitiven Format das Antigen an die MTP immobilisiert. Der Verlauf ist in Abbildung 10 schematisch abgebildet. Da kleine Moleküle, sogenannte Haptene, nur schwach an die Polystyrol-Oberfläche binden, ist meist zunächst die Kopplung an Trägerproteine (z.B. Rinderserumalbumin, engl. *bovine serum albumin*, BSA) notwendig.

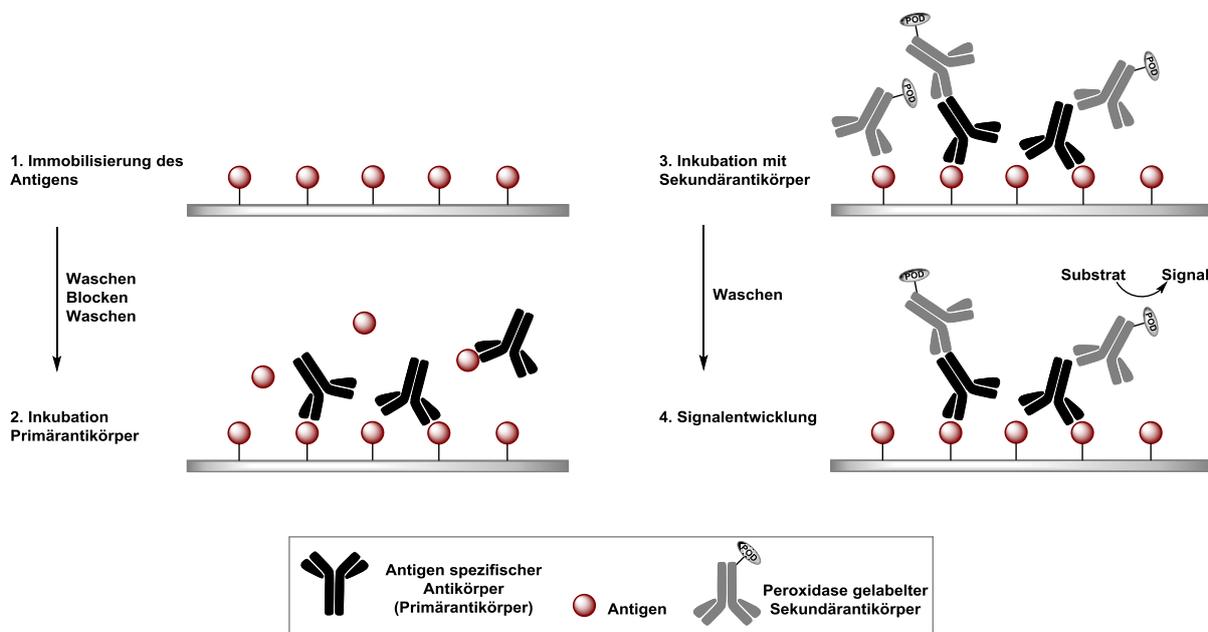


Abbildung 10: Schematischer Ablauf eines indirekt kompetitiven ELISAs.

Nach dem Blocken werden Probe und der im Überschuss vorliegende Primärantikörper zugegeben und inkubiert. Eine Konkurrenz entsteht dabei zwischen dem immobilisierten und den in Lösung befindlichen Antigenen um die Paratope des Antikörpers. Analog zum *Sandwich-ELISA*, erfolgt nach einem Waschschrift die Zugabe eines Tracer-markierten Sekundärantikörpers, der gegen den Fc-Teils des Primärantikörpers gerichtet ist. Die Signalentwicklung erfolgt durch Zugabe eines chromogenen Substrats und das erhaltene Signal verhält sich, wie beim direkten Format, invers proportional.

2.4.2 Kolorimetrischer Goldnanopartikel-Immunoassay

Goldnanopartikel (GNPs) treten in unterschiedlichsten Strukturvarianten auf (z.B. rund, stäbchen-, plättchen-, stern- und würfelförmig) und finden aufgrund ihrer vorteilhaften Eigenschaften immer mehr Anwendung in der Bioanalytik (Jain, 2006; Sapsford, 2013). Neben der einfachen Herstellung, der einfachen Modifizierung und der hohen Biokompatibilität aufgrund von beispielsweise Inertheit, sind vor allem die guten optischen Eigenschaften zu nennen. Kolloidale GNP-Lösungen zeigen in Abhängigkeit ihrer Größe und Struktur charakteristische Farben (Murphy, 2008). Erfolgt die Bestrahlung von GNPs mit einer bestimmten Wellenlänge, so induziert das oszillierende, elektromagnetische Feld der Lichtwelle eine kohärente und kollektive Schwingung der freien Elektronen im Leitungsband um die positive Partikeloberfläche. Die Frequenz dieser Schwingung ist dabei insbesondere von der Dielektrizitätskonstante des Metalls, von dem Umgebungsmedium und von der Größe und Struktur der Nanopartikel abhängig. Während dieses Bestrahlungsvorgangs kommt es zur Ladungstren-

nung, wodurch es gleichzeitig zu einer Dipoloszillation in Richtung des elektrischen Feldes des Lichtes kommt. Die Amplitude der Dipoloszillation bei einer bestimmten Frequenz wird als Oberflächenplasmonenresonanz bezeichnet (engl. *surface plasmon resonance*, SPR) (Huang, 2010a). Runde GNPs mit einer Größe von etwa 15 nm zeigen eine SPR-Frequenz im sichtbaren Bereich des Lichts. Dabei kommt es zu einer Absorption im blaugrünen Bereich bei etwa 520 nm, und rotes Licht wird reflektiert. Für das menschliche Auge erscheint daher die kolloidale Goldlösung in tieferer Farbe.

Die Absorptionsintensität korreliert direkt mit der in Lösung befindlichen GNP-Konzentration. Je mehr GNPs, desto höher ist die gemessene Absorption. Diese Eigenschaft wird sich beim kolorimetrischen, kompetitiven GNP-Immunoassay zunutze gemacht. Mit Ausnahme der finalen Abtrennung des Überstandes und Goldwachstumsreaktion finden sämtliche Reaktionen in homogener Phase statt. Ein schematischer Ablauf ist Abbildung 11 zu entnehmen.

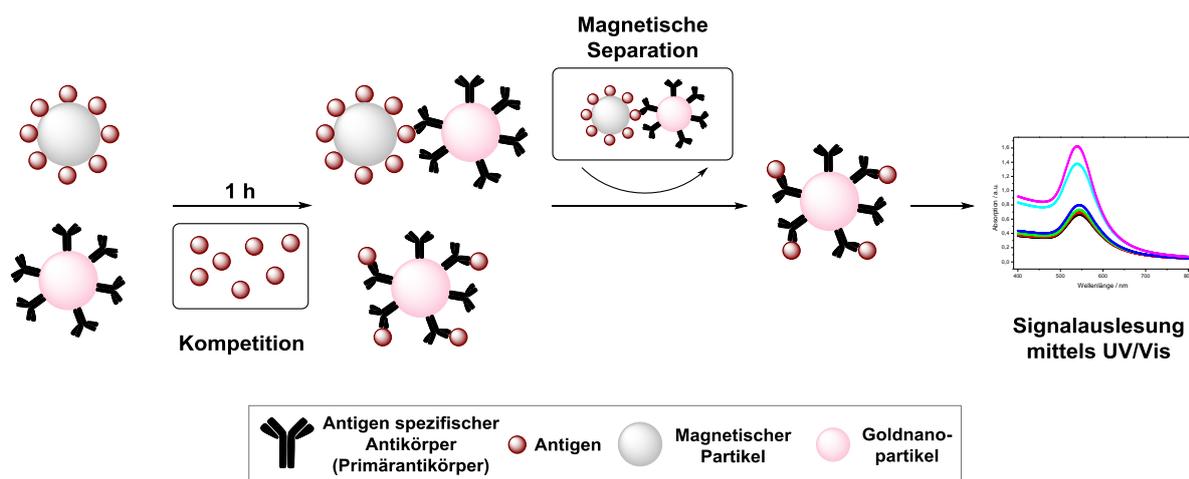


Abbildung 11: Schematischer Ablauf des kolorimetrischen, kompetitiven Partikel-Immunoassay mit Antigen-immobilisierten magnetischen Partikeln und Antikörper-gekoppelten GNPs als signalgebende Substanz.

Im ersten Schritt des GNP-Immunoassays wird die Probe (Antigen) zu der vorgelegten magnetischen Partikellösung gegeben und anschließend mit der GNP-Lösung versetzt. Daraufhin tritt eine Kompetitionreaktion zwischen den immobilisierten und freien Antigenen um die Paratope des an GNP immobilisierten Antikörpers auf. Anschließend wird der sich gebildete Immunokomplex mittels Anlegen eines externen Magnetfelds abgetrennt. Je höher die Analytkonzentration in der Probe, desto mehr GNP befinden sich im Überstand, desto höher ist die Absorption. Die Absorptionsmaxima werden halblogarithmisch gegen die Analytkonzentration aufgetragen und man erhält einen zur Analytkonzentration gleichsinnig proportionalen, sigmoidalen Kurvenverlauf.

2.4.3 Auswertung von Immunoassays

Allgemein gelten für die Auswertung von Immunoassays die gleichen statistischen Grundlagen wie für andere analytische Messverfahren. Jedoch handelt es sich aufgrund des photometrischen Detektionsprinzips bei Immunoassays um Relativmethoden, die stets einer Kalibrierung bedürfen. Die Daten sowohl für die Kalibrierpunkte als auch für die Probe werden mindestens aus einer Dreifachbestimmung erhalten, wobei eine einfache Standardabweichung angegeben wird ($\pm 1 \cdot s$). Die Mittelwerte werden anschließend halblogarithmisch gegen die Konzentration des entsprechenden Antigens aufgetragen und mittels Simplexverfahrens unter Berücksichtigung der Fehler jedes einzelnen Wertes an die vierparametrische Funktion angepasst (Findlay, 2007).

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

Mit:	y = Extinktion	A_1 = höchste Extinktion (obere Asymptote)
	x = Konzentration des Analyten	A_2 = niedrigste Extinktion (untere Asymptote)
	x_0 = Konzentration des Analyten am Testmittelpunkt (IC_{50})	p = Steigung am Testmittelpunkt

Um die Nachweisgrenze (engl. *limit of detection*, LOD) des Immunoassays zu beurteilen, wird eine Variation der Empfehlung der Internationalen Union für reine und angewandte Chemie (engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC) verwendet. Der LOD-Wert wird durch Abzug der dreifachen Standardabweichung des Blindwertes von selbigen und Extrapolation auf die Kalibrierkurve ermittelt. Die Bestimmungsgrenze (engl. *limit of quantification*, LOQ) wird in der vorliegenden Arbeit durch die Differenz auf Blindwert und der fünffachen Standardabweichung des selbigen berechnet.

2.5 Biosensoren

Biosensoren stellen eine Schnittstelle zwischen der Biologie und der Elektronik dar, mit denen es möglich ist, biochemische Interaktionen zwischen Molekülen verzögerungsfrei nachweisen zu können. Nach einer Definition der IUPAC ist ein Biosensor, im Vergleich zu Biotests oder biotischen Sensoren, ein in sich geschlossenes integriertes System, welches eine spezifische (halb)quantitative Information liefert. Der Biosensor besteht aus einem biologi-

schen Erkennungselement (z.B. Enzyme, Zell-Organellen, Gewebe, Antikörper), einem Signalwandler (engl. *transducer*) sowie einem elektronischen Detektor und Verstärker, die sich in direktem räumlichem Kontakt befinden. Die Detektion erfolgt über chemische Methoden (optische oder elektrochemische Detektion) oder über physikalische Methoden (Kalorimetrie oder gravimetrische Detektion) (IUPAC, 1997). In den vergangenen 20 Jahren wurden viele verschiedene Biosensoren entwickelt, die sich in Abhängigkeit von der analytischen Fragestellung, Anwendung in der Umweltanalytik, Medizin, Forschung, Lebensmittelindustrie und pharmazeutischen/biotechnologischen Industrie etabliert haben. Aktuell liegt der Fokus der Forschung vor allem auf der Miniaturisierung und der gleichzeitigen Erkennung mehrerer Substanzen (Multianalysesensoren) (Sagadevan, 2013; Ewald, 2015). In den nachfolgenden Abschnitten werden einige Biosensoren, die für die Erkennung von MCs hauptsächlich Anwendung finden, erläutert.

2.5.1 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie)

Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie) stellt eine markierungsfreie Methode dar, mit der es möglich ist, Schichtdicken im Nanometerbereich zu quantifizieren. Mitte der 1990er Jahre wurde diese Methode durch die Kommerzialisierung von Biosensoren der Firma GE Healthcare populär (Hodnik 2009). Die Detektion basiert hierbei auf der Generierung eines evaneszenten elektromagnetischen Felds an der Oberfläche eines dünnen Metallfilms (z.B. Gold). Dabei wird auf die dem Analyten abgewandten Seite monochromatisches Licht unter Totalreflexion eingestrahlt. Der Goldfilm absorbiert bestimmte Wellenlängen des entstehenden evaneszenten Feldes und an der Grenzfläche werden Oberflächenplasmonen (Interaktion der Elektronen mit dem evaneszenten Feld) angeregt (Guo, 2012). Diese werden dann in das Medium mit dem geringeren Brechungsindex übertragen und es kommt zu einer Abnahme der Intensität dieser Wellenlänge im reflektierten Lichtstrahl. Folglich ist bei diesem Winkel das Minimum der Lichtabsorption (SPR-Winkel). Die Belegung der Metallschicht, bedingt durch beispielsweise die Antikörper-Antigen-Interaktion, führt zu einer Änderung des Brechungsindex des Mediums, was wiederum zur Änderung in den Resonanzbedingungen und letztlich zur Änderung des SPR-Winkels führt (Abbildung 12). Dieser Prozess kann in Echtzeit verfolgt werden (Shankaran, 2007). Die Assoziation bzw. Dissoziation eines Moleküls an bzw. von der Goldoberfläche wird als *refractive units* (RU) angegeben. Diese dimensionslose physikalische Größe gibt an, um welchen Faktor die Wellenlänge und die Phasengeschwindigkeit des Lichtes kleiner sind als im Vakuum.

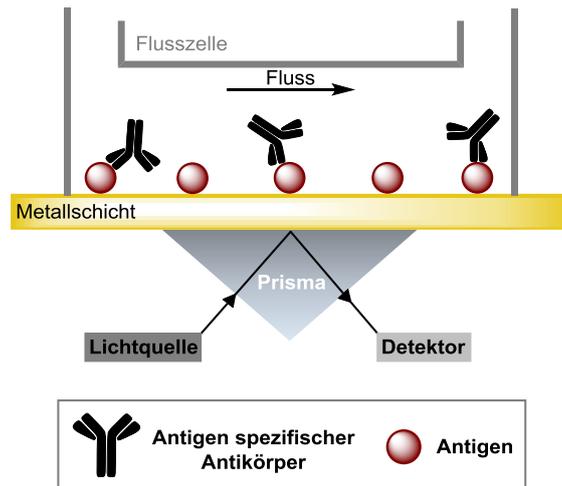


Abbildung 12: Schematische Darstellung des SPR-Biosensors am Beispiel des indirekten ELISA-Formats.

Auch eine Konzentrationsbestimmung unterschiedlicher Analyten ist mit der SPR-Spektroskopie möglich. Grundsätzlich können die gleichen Assay-Varianten wie beim ELISA verwendet werden (direkt/indirekt und kompetitiv/nichtkompetitiv). Da Haptene mit ihrem niedrigen Molekulargewicht nur zu einem geringen Signal führen, hat sich allerdings das indirekte Format, folglich die Immobilisierung von Analyt-Protein-Konjugaten, bewährt.

2.5.2 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Die isotherme Titrationskalorimetrie (engl. *isothermal titration calorimetry*, ITC) gehört zu den Biosensoren, bei denen die Detektion auf einer thermischen Änderung der Reaktionslösung basiert. Während des Experiments wird die Antigenlösung schrittweise zur vorgelegten Antikörperlösung titriert (siehe Abbildung 13). Basierend auf der Antikörper-Antigen-Interaktion kommt es zu einer Enthalpieänderung, die in Form von minimalen Temperaturunterschieden (wenige millionstel Grad, Herstellerangaben Malvern) gemessen werden kann. Diese Temperaturunterschiede ergeben sich zwischen der Messzelle (Antikörper und Antigen) und Referenzzelle (Pufferlösung) und werden von Temperatursensoren in den Zellen erkannt. Dieser Wert dient als Steuergröße für die Regelung der Heizleistung, sodass wieder isotherme Bedingungen herrschen.

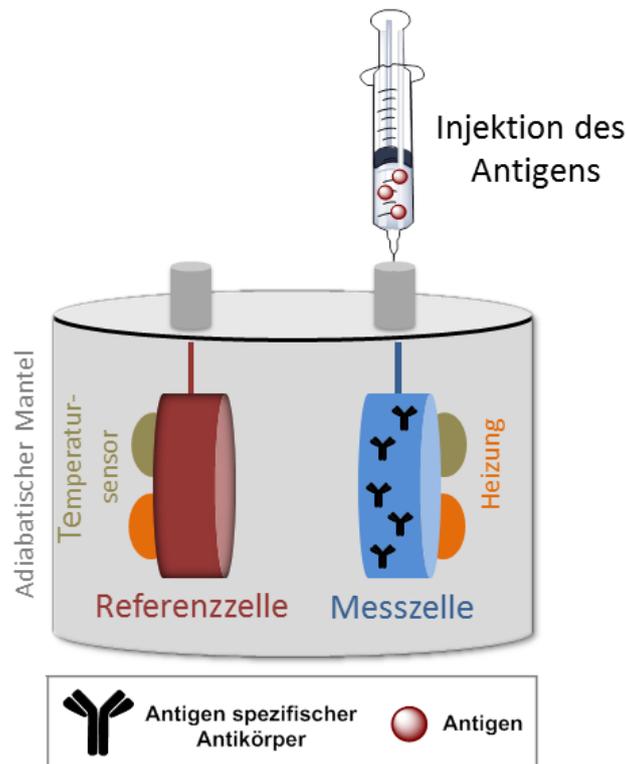


Abbildung 13: Schematischer Aufbau einer ITC-Apparatur.

Da es sich bei der Antikörper-Antigen-Interaktion um einen exothermen Prozess handelt, wird während der Titration der Antigenlösung zum vorgelegten Antikörper Wärme frei und das Microkalorimeter reagiert mit der Reduktion der elektrischen Heizleistung (Freire, 1990). Durch Integration der Spitzen der Heizleistung wird die frei gesetzte Wärmemenge erhalten, die dann gegen das steigende Verhältnis der Antigen/Antikörper-Konzentrationen aufgetragen wird. Großer Vorteil dieser Methode ist, dass weder eine Immobilisierung noch Markierung der Reaktionspartner notwendig ist (Lewis, 2005), die Bestimmung der Affinität von Bindungspartnern ist im nativen Zustand möglich.

2.5.3 Weitere Biosensoren

Neben der Anwendung der SPR-Spektroskopie, stehen eine Reihe von weiteren optischen Biosensoren für den (quantitativen) Nachweis von MCs zur Verfügung. Im Jahr 2012 berichteten Herranz et al. über die Etablierung des *Leopard Array Biosensors* (Hanson Technologies, USA) (Herranz, 2012), die kommerzielle Variante des *Naval Research Laboratory Array Biosensors* (Ligler, 2007), mit dem es möglich ist, sechs MC-Proben parallel innerhalb von 60 min zu bestimmen. Das Prinzip beruht auf einem fluoreszenzoptischen Messverfahren und der Erkennung der MCs mittels eines monoklonalen anti-MC-LR-Antikörper (MC10E7) (Zeck, 2001). Ein LOD-Wert von 0,016 µg/L wurde erreicht (Herranz, 2012). Long et al. entwickelten 2009 ein tragbares Analysegerät für die Bestimmung von organischen Spurenstoffen (engl. *portable trace organic pollutant analyzer*, TOPA). Der auf einem faseroptischen Messprinzip beruhende Biosensor zeigte Nachweisgrenzen von 0,03 µg/L für MCs bei bis zu 150 möglichen Regenerationszyklen und weniger als 5 % Aktivitätsverlust des immobilisierten MC-LR-OVA-Konjugats an der Oberfläche des Sensors (Long, 2009).

Vor etwa 15 Jahren wurden Biosensoren entwickelt, die auf einem piezoelektrischen System für die Erkennung von MCs basieren. Allerdings zeigten sich diese Biosensoren als wenig effizient hinsichtlich ihrer Nachweisgrenzen, die oberhalb des von der WHO vorgeschlagenen Grenzwertes von 1 µg/L für Trinkwasser lagen (Chianella, 2003). Des Weiteren führen der Einfluss von Matrixeffekten (Ding, 2011) und teilweise Analysezeiten von mehr als drei Stunden (Xia, 2011) dazu, dass massenabhängige Biosensoren sich in der Praxis als wenig praktikabel herausstellten.

Unter Verwendung von elektrochemischen Biosensoren konnten in den vergangenen Jahren sehr sensitive Nachweisgrenzen erreicht werden. Loyprasert et al. veröffentlichten im Jahr 2008 einen markierungsfreien Immunosensor, der auf der Erkennung mittels auf Silbernanopartikeln immobilisierten Antikörpern beruht. Eine Nachweisgrenze von 7 pg/L für MC-LR wurde gezeigt bei bis zu 43-facher Wiederverwendung des Sensors (Loyprasert, 2008). Ein auf Graphen und Peroxidase/Kohlenstoff-Nanosphären beruhender Biosensor wurde im Jahr 2013 von Zhao et al. entwickelt und wies eine Nachweisgrenze von 0,016 µg/L für MCs auf (Zhao, 2013).

Biosensoren, die beispielsweise auf der Kernspinresonanzspektroskopie (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR) (Ma, 2009) oder der Erkennung mittels komplementärer Nukleinsäuren (Yan, 2001) beruhen, sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit lediglich erwähnt, nicht aber weiter darauf eingegangen werden.

3 Antikörper

Bei Antikörpern für die analytische Anwendung handelt es sich meist um Serumproteine der γ -Globulinfraktion (Immunglobuline, Ig), die bei Wirbeltieren nach Eindringen körperfremder Substanzen, den sogenannten Antigenen, aus ausdifferenzierten B-Lymphozyten, den sogenannten Plasmazellen, gebildet werden (Kaufmann, 2014). Als Immunogen kann eine Vielzahl an makromolekularen Strukturen wie beispielsweise Polysaccharide, Proteine und Nukleinsäuren fungieren. Eine wichtige Rolle spielt dabei das Molekulargewicht, das mehr als 5 kDa betragen muss, um überhaupt eine Immunantwort auszulösen (Lottspeich, 2012). Nach dem Eindringen in den Organismus bindet das Antigen zunächst an die Oberfläche eines B-Lymphozyten. Dazu muss der jeweilige B-Zellrezeptor eine dem Antigen komplementäre Struktur aufweisen (Harwood, 2010). Diese Bindung löst eine sogenannte B-Zell-Proliferation aus, die eine sofortige Teilung und Vermehrung des antigenspezifischen B-Lymphozyten induziert. Die gezielte Vermehrung der komplementären B-Lymphozyten wird als Klonselektionstheorie bezeichnet und wurde im Jahr 1960 von Frank M. Burnet entdeckt (Burnet, 1960). Der Großteil der aktivierten B-Zellen differenziert sich zu den Antikörper-produzierenden Plasmazellen aus, ein kleiner Teil in Gedächtniszellen. Die Entstehung der Plasmazellen basiert dabei auf einer somatischen Hypermutation, die die Expression von hochaffinen Antikörpern zur Folge hat (Li, 2001; Tonegawa, 1983). Gedächtniszellen können auch in Abwesenheit des Antigens bestehen und bei erneutem Kontakt mit dem Antigen innerhalb weniger Stunden eine Immunreaktion auslösen, um das Ausbrechen einer Infektion zu verhindern. Jedes Wirbeltier besitzt eine theoretisch mögliche Anzahl von 10^8 bis 10^{12} unterschiedlichen Antikörpern. (Di Noia, 2007; Cruse, 2010)

3.1 Aufbau und Struktur von Antikörpern

Antikörper werden nach ihrer Struktur und Funktion und der daraus resultierenden spezifischen biologischen Eigenschaften im Organismus in fünf Klassen eingeteilt: IgG, IgA, IgM, IgD und IgE. Die im Blutserum vorkommende Konzentration sinkt dabei in der Reihenfolge von IgG mit 12 mg/mL zu IgE mit 0,01 mg/mL (Berg, 2010). Die Bezeichnungen mittels Buchstabencode rühren von den unterschiedlichen Arten von schweren Ketten (engl. *heavy*, H) her, nämlich γ , α , μ , δ und ϵ . Geringe Unterschiede ergeben sich aus der weiteren Unterteilung in Subklassen, die im Fall von IgG für humane Antikörper mit IgG1 bis IgG4 und für murine Antikörper mit IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 beschrieben werden (Kaufmann, 2014).

Für die leichten Ketten (engl. *light*, L) gibt es für alle Antikörperklassen zwei Variationsmöglichkeiten, κ und λ . Das Verhältnis zwischen κ und λ variiert dabei stark speziesabhängig (Cruse, 2010). In Tabelle 3 sind die unterschiedlichen Immunglobulinklassen mit charakteristischen Merkmalen zusammengefasst.

Tabelle 3: Eigenschaften der unterschiedlichen Immunglobulinklassen (modifiziert nach Berg, 2010).

Klasse	Serumkonzentration / mg/mL	Masse / kDa	L-Kette	H-Kette	Kettenkombination
IgG	12	150	κ oder λ	γ	$\kappa_2\gamma_2$ oder $\lambda_2\gamma_2$
IgA	3	180–500	κ oder λ	α	$(\kappa_2\alpha_2)_n$ oder $(\lambda_2\alpha_2)_n$
IgM	1	950	κ oder λ	μ	$(\kappa_2\mu_2)_5$ oder $(\lambda_2\mu_2)_5$
IgD	0,1	175	κ oder λ	δ	$\kappa_2\delta_2$ oder $\lambda_2\delta_2$
IgE	0,01	200	κ oder λ	ϵ	$\kappa_2\epsilon_2$ oder $\lambda_2\epsilon_2$

IgM sind die ersten Antikörper, die nach dem Kontakt mit einem Antigen im Serum eines Wirbeltiers auftauchen. Als Pentamere besitzen sie eine multivalente und somit sehr effektive Antigenbindung (Avidität). Nach ihrer Produktion von aktivierten B-Lymphozyten sind sie in der Lage während der Immunreaktion ihre μ -Kette gegen γ -, α -, δ - oder ϵ -Ketten auszutauschen (Harriman 1993). Dies hat den Wechsel der Antikörperklasse zur Folge und wird als Isotypenwechsel (engl. *class switch recombination*) bezeichnet (Chaudhuri 2004).

IgA-Antikörper treten als Monomere oder Dimere auf und sind hauptsächlich in den externen Körperflüssigkeiten wie Tränen, Speichel und im Schleim der Darmwand zu finden. Dadurch wird der erste Kontakt mit eindringenden Antigenen induziert (Brandtzaeg 2013).

IgE treten als Monomere auf und dienen vor allem der Abwehr von Endoparasiten. IgE besitzen die Fähigkeit, sich über Fc-Rezeptoren an Mastozyten (Zellen die Botenstoffe, z.B. Histamin, gespeichert haben) zu binden und dadurch lange im Körper verweilen zu können.

Über die Funktion des als Monomer vorkommenden IgD ist bis auf die Aktivierung von basophilen Granulozyten und Mastozyten wenig bekannt (Chen, 2009).

Aufgrund ihrer vielen Vorteile wie beispielsweise der erhöhten Wasserlöslichkeit, der besseren Diffusionseigenschaften und dem Vorkommen in hohen Konzentrationen, finden hauptsächlich die IgGs eine wichtige Rolle für technische Anwendungen.

In Abbildung 14 ist die Struktur eines Antikörpers des Typs IgG schematisch abgebildet. IgG sind Tetramere und bestehen aus je zwei identischen Polypeptidketten, die jeweils aus einer

L- von etwa 25 kDa und einer H-Kette von etwa 50 kDa aufgebaut sind. H- und L-Kette können in vier bzw. zwei Domänen unterteilt werden, die jeweils aus zwei antiparallelen β -Faltblättern aufgebaut sind und jeweils über mindestens eine Disulfidbrückenbindung miteinander verknüpft sind (Kindt, 2007). Die N-terminalen Teile der H- und L-Kette werden als variable Domäne bezeichnet (V_H und V_L), in der die Antigenbindung an die hypervariable Region (engl. *complementary determining region*, CDR) erfolgt. Zwischen den CDRs befinden sich vier konservierte Gerüstregionen (engl. *framework regions*). Die übrigen Teile stellen die konstanten Domänen (C_L , C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) dar (Lottspeich, 2012).

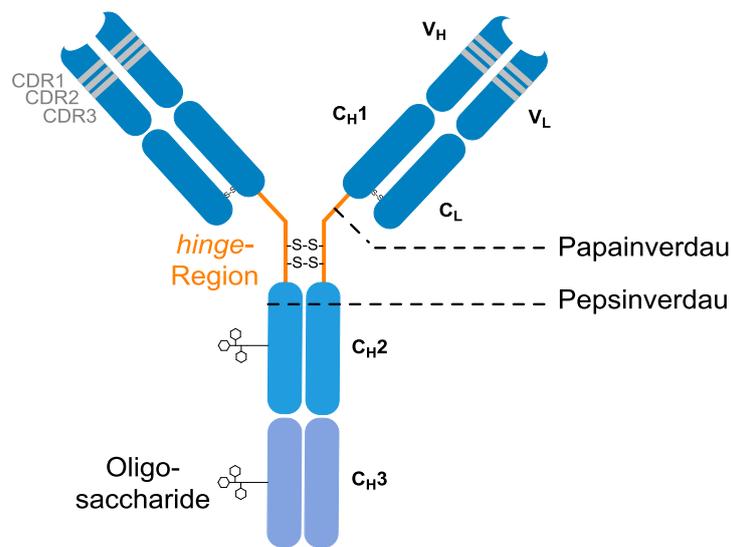


Abbildung 14: Struktur eines Immunglobulin G: Mit den konstanten Regionen (C), variablen Regionen (V), der leichten Kette (L), der schweren Kette (H) und der hypervariablen Domäne (engl. *complementarity determining region*, CDR).

IgG-Antikörper können mittels zwei proteolytischen Enzymen abgebaut werden, welche zu unterschiedlichen Fragmenten führen. Wie R. Porter 1959 nachwies, kann die Thiolprotease Papain IgG an der schweren Kette am N-terminalen Ende der *hinge*-Region spalten. Dadurch wird IgG in drei Teile verdaut: das kristallisierbare Fragment (engl. *crystallisable fragment*, Fc) und zwei identische antigenbindenden Fragmenten (engl. *antigen-binding fragment*, Fab) (Porter 1959). Die *hinge*-Region stellt den flexiblen Übergang zwischen C_{H1} und C_{H2} dar, die den Fab- mit dem Fc-Teil verbindet und für die Flexibilität der beiden variablen Domänen verantwortlich ist. Die Carboxypeptidase Pepsin spaltet im *hinge*-Bereich an der C-terminalen Seite der Disulfidbindung und beim Abbau entstehen ein $F(ab')_2$ -Fragment und ein in mehrere Stücke gespaltenes Fc-Fragment. Ein $F(ab')_2$ -Fragment besitzt zwar die gleichen Bindungseigenschaften wie der ursprüngliche IgG, allerdings können dieses und auch das Fab-Fragment keine Effektorfunktion ausüben, da hierzu der funktionelle Fc-Teil benötigt wird.

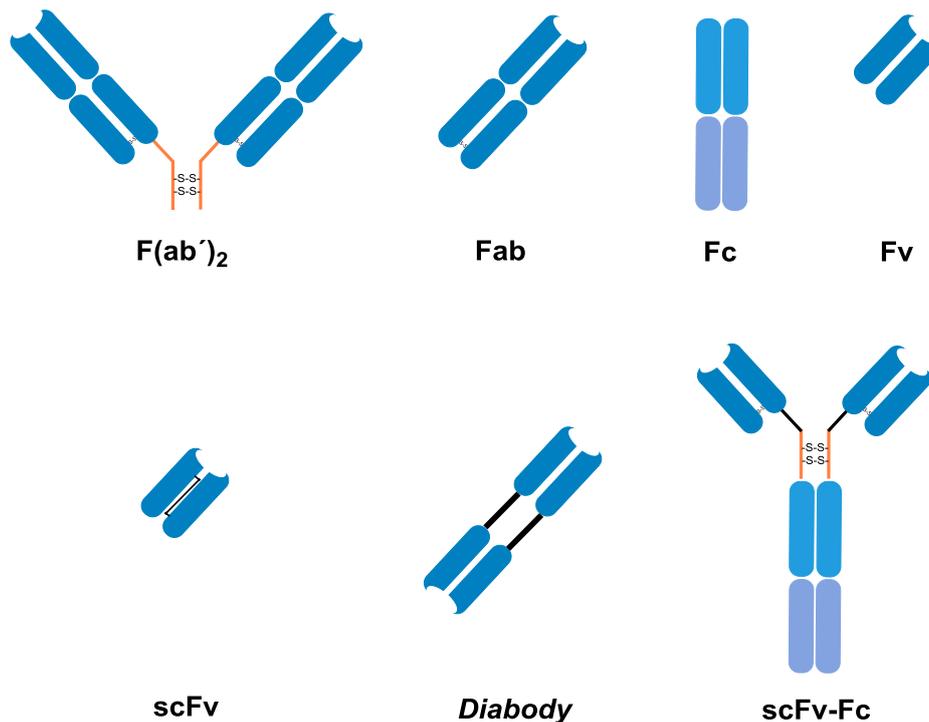


Abbildung 15: Schematische Abbildung verschiedener Fragmente von IgG-Antikörpern.

Die variablen Domänen spielen die entscheidende Rolle für die Antigenbindung, da sich an ihrem N-terminalen Ende die Antigenbindestelle (Paratop) befindet. Deshalb ist die größte Variabilität in der Aminosäuresequenz zwischen verschiedenen Antikörpern in dieser Region gegeben. Der konstante Bereich liegt in seiner Primärstruktur und vor allem seiner Sekundärstruktur stark konserviert vor. Je nach Größe des Antigens trägt in der hypervariablen Region entweder nur CDR1 (bei Haptenen) oder auch CDR2 und CDR3 (bei Proteinen) unterschiedlich stark zu der Antigenbindung bei (MacCallum, 1996).

Die Interaktion zwischen Antikörper und Antigen beruht auf nichtkovalenten Wechselwirkungen, wobei diese vor allem durch ionische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Wechselwirkungen und sterische Abstoßungen bedingt sind (Cruse, 2010).

3.2 Herstellung von poly- und monoklonalen Antikörpern

Die Herstellung von Antikörper für analytische Zwecke erfolgt im Wesentlichen durch die Immunisierung von Wirbeltieren. Zur Bildung eines polyklonalen Serums wird dem Versuchstier, meist Kaninchen, seltener Pferde, Hühner und Ziegen das Immunogen mehrmals im Abstand von wenigen Wochen injiziert (siehe Abbildung 16). Die Immunisierung ist abhängig von der Häufigkeit der Injektionen, der Verwendung von Adjuvanzen (z.B. Freund'sches

komplettes/inkomplettes Adjuvans) und dem Applikationsort (Lottspeich, 2012). Als Immunogen kommen nur Moleküle mit einem Molekulargewicht von mindestens 5 kDa zum Einsatz. Bei Haptenen ist die Kopplung der Moleküle an sogenannte Trägerproteine wie beispielsweise BSA oder humanes Serumalbumin (HSA), Ovalbumin (OVA) oder auch Schlitzschnecken-Hämocyanin (engl. *keyhole limpet hemocyanin*, KLH) notwendig, um eine Immunantwort beim Versuchstier auszulösen (Märtlbauer, 1988; Weigle, 1964). Die Bezeichnung „polyklonale Antikörper“ beruht auf der Generierung der Antikörper aus unterschiedlichen B-Zellen. Nach einigen Wochen erfolgt die Blutentnahme und die Abtrennung des Blutserums, das die Antikörper enthält. Der große Vorteil dieser Methode ist die rasche und kostengünstige Produktion, weshalb diese häufig genutzt wird, um Sekundärantikörper gegen andere Wirbeltierspezies herzustellen. Nachteilig jedoch ist die begrenzte Verfügbarkeit der polyklonalen Seren, da die Quelle mit dem Tod des Tieres versiegt. Durch die Zufallskombination der Genabschnitte entsteht eine Diversität, die dazu führt, dass das gleiche Immobilisierungsprotokoll bei gleichen Tierarten nicht zu gleichem Serum führt. Hinsichtlich der Reproduzierbarkeit, der Vergleichbarkeit und der Qualitätssicherung ergeben sich demzufolge weitere Nachteile.

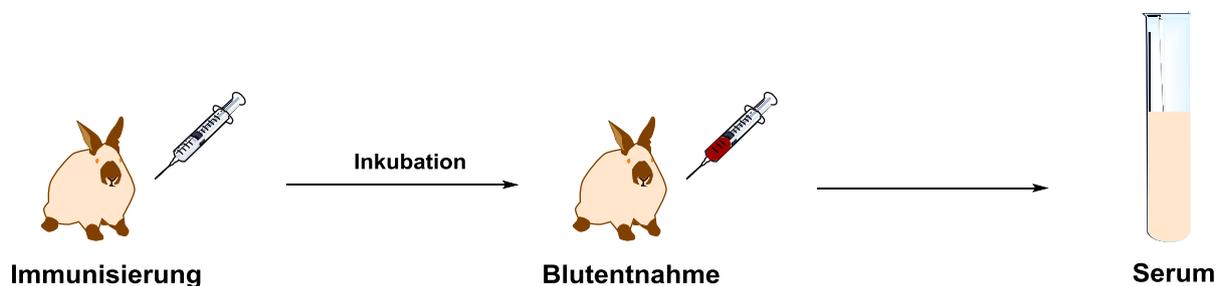


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Herstellung von polyklonalen Antikörpern.

Deshalb hat sich in den letzten 40 Jahren eine Methode basierend auf der Entdeckung von Köhler und Milstein durchgesetzt: Die sogenannte Hybridomzellen-Technik, mit welcher es möglich ist monoklonale Antikörper herzustellen (siehe Abbildung 17) (Köhler, 1975). Dabei werden durch Verschmelzung von Splenozyten der immunisierten Tiere – meist Mäuse der Mauszelllinien SP2/0-AG14 und X63AG8.653 (Kawamura, 1989; Hack, 1988) – und einer neoplastischen Krebszelllinie (Myelomzellen) „unsterbliche“ Zellen geschaffen, die die Eigenschaften beider Zellen vereinigen: Die Produktion von Antikörpern und das ungehemmte Wachstum (Immortalität). Der Name „monoklonal“ rührt von Antikörpern her, die nur von einer B-Zelllinie produziert werden, wodurch sie alle das gleiche Paratop aufweisen. Nach der Fusionierung erfolgt die Vereinzelung der Hybridomzellen in einem Medium aus Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT-Medium), um monoklonale Zellkulturen zu erhal-

ten. Nach einem aufwändigen Screening der Zellkulturüberstände (ZKÜs) mittels ELISA werden die Antikörper der positiven Klone weiter auf Affinität und Nachweisstärke hinsichtlich des Antigens untersucht. Die Hybridomzellen können schockgefroren für lange Zeit gelagert werden und stellen daher eine quasi unversiegbare Quelle dar.

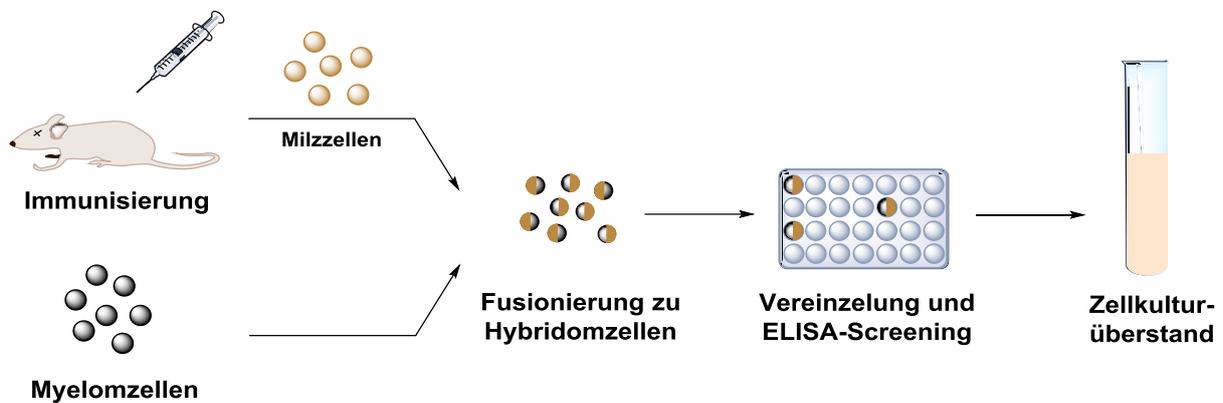


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Herstellung von monoklonalen Antikörpern.

Zwar ist die Herstellung von monoklonalen Antikörpern weitaus teurer und aufwändiger, als die von polyklonalen Antikörpern, trotzdem stellen die monoklonalen Antikörper die Mehrheit der technisch hergestellten Antikörper dar (Borrebaeck, 2007). Neben der uneingeschränkten Verfügbarkeit, sowie der gleichbleibenden Qualität sind vor allem auch Eigenschaften wie die hohe Selektivität und hohe Nachweisstärke von großem Vorteil im Vergleich zu polyklonalen Antikörperseren (Luttmann, 2014).

3.3 Herstellung von rekombinanten Antikörpern in Bakterien und Hefen

Neben der Herstellung von poly- und monoklonalen Antikörpern kommt die rekombinante Technologie zur Herstellung von beispielsweise therapeutischen oder diagnostischen Antikörpern zum Einsatz. Unter rekombinanten Antikörpern (rAk) versteht man Proteine mit immunologischer Aktivität, die auf gentechnischem Weg *in vitro* erzeugt werden und ohne Versuchstiere in großen Mengen produziert werden können. Der Durchbruch dieser Technologie gelang durch die Aufklärung der Antikörpersequenzen in Kombination mit der Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), der Isolation von Antikörpergenen (Kabat, 1991; Larrick, 1989), sowie der Möglichkeit rekombinante Antikörperfragmente in Bakterien zu exprimieren und funktionell zu falten (Skerra 1988; Better, 1988). Die Gewinnung der benötigten DNA-Sequenzen kann entweder aus komplexen DNA-Bibliotheken oder aus monoklonalen Hybridomzellkulturen erfolgen.

Bei der Produktion von rAk basierend auf der DNA-Sequenz aus dem Hybridomzellpellet, erfolgt zunächst die Extraktion und Aufreinigung der Boten-Ribonukleinsäure (engl. *messenger ribonucleic acid*, mRNA) mittels rekombinanter DNA- und RNA-Techniken aus dem Hybridomzellpellet. Die mRNA wird anschließend mittels reverser Transkriptase-PCR (engl. *reverse transcriptase PCR*, RT-PCR) amplifiziert und anschließend in die Antikörper kodierende Basensequenz, die cDNA, umgeschrieben (Ruberti, 1994; Krebber, 1997). Mit Hilfe von spezifischen Primern, die die Amplifikation der variablen Genabschnitte erlauben, werden diese mittels PCR in ausreichenden Mengen hergestellt (Larrick, 1989). Anschließend erfolgt die Klonierung in spezifische Expressionsvektoren für Bakterien (z.B. pIT2 (de Wildt, 2000)) bzw. Hefen (z.B. pAO816 (Thill, 1990), pPICZ α) und die Transformation in das entsprechende Expressionssystem wird vollzogen. Eine schematische Darstellung des Herstellungsprozesses ist Abbildung 18 zu entnehmen.

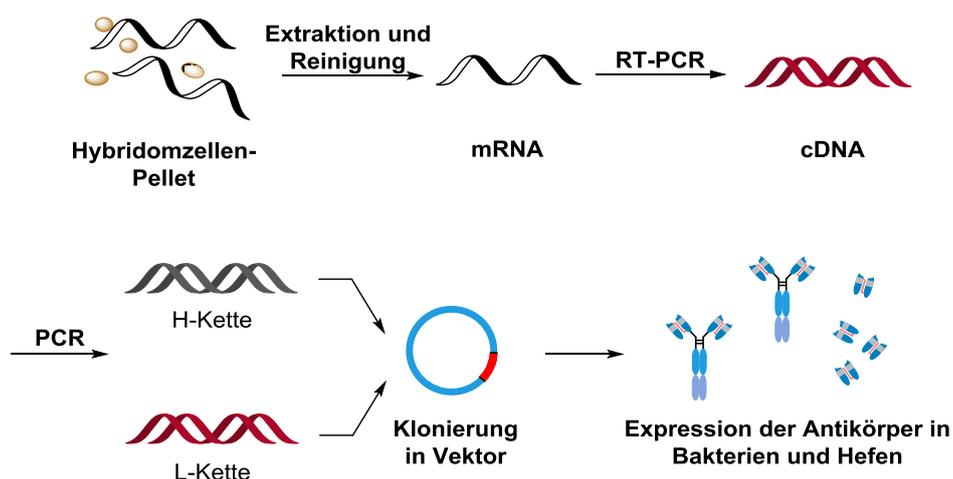


Abbildung 18: Schematische Abbildung des Herstellungsprozesses von rekombinanten Antikörpern.

Bis heute ist *Escherichia coli* (*E. coli*) das weltweit am häufigsten verwendete Expressionssystem für rAk aufgrund seiner hohen Teilungs- und Proteinproduktionsrate unter einfachen Kultivierungsbedingungen (Terpe, 2006). Die Expression von rAk in prokaryotischen Systemen weist allerdings einige Schwächen auf, wie beispielsweise die Unfähigkeit von Bakterien, posttranslationale Modifikationen (z.B. Disulfidbrücken, Glykosylierungen) durchführen zu können oder auch Problematiken bei der korrekten Faltung von vielen heterolog exprimierten und komplexen Proteinen. Grund dafür ist die Komplexität der Antikörper, die aus vier oder mehr Polypeptidketten aufgebaut sind und mit vielen intra- und intermolekularen Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Wieland, 2011). Da Fab und scFv keiner posttranslationalen Modifikation unterworfen werden müssen, um funktionell gefaltet zu werden, haben sich diese Antikörperfragmente für die Anwendung in der Immunanalytik bewährt.

Die Herstellung von rAk als funktionelle Vollantikörper ist auch in eukaryotischen Expressionssystemen wie beispielsweise Hefen möglich (Frenzel, 2013). Der am meisten verwendete Hefestamm – *Pichia pastoris* (*P. Pastoris*) (Jeong, 2011) – kann im Gegensatz zu einigen anderen Hefen, wie *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), in sehr hoher Zelldichte bei einem weiten pH-Bereich kultiviert werden. Zudem kann *P. pastoris* posttranslationale Modifikationen von Proteinen durchführen und diese anschließend sehr effizient sezernieren (Cregg, 2009). Der folgende Aufbereitungsschritt (engl. *downstream processing*) wird dadurch erfolgreich verkürzt. Ein weiterer Vorteil dieser Produktionsstätte ist, dass die methylo-trophe *P. pastoris* ein kostengünstiges Kultivierungssystem darstellt, da lediglich MeOH als Energiequelle hinzugegeben werden muss. Zwar ist die Produktion von Vollantikörpern in Hefen als Expressionssystem möglich, allerdings sind in der Literatur nur wenige Beispiele aufgeführt. Beispielsweise zeigten Horwitz et al. die erfolgreiche Herstellung eines chimären IgGs aus *S. cerevisiae*, allerdings nur in einer Konzentration von 50–80 µg/L (Horwitz, 1988). Im Gegensatz dazu gelang es Potgieter et al. 1,4 mg/L eines humanen IgG1 in *P. pastoris* zu exprimieren (Potgieter, 2010).

Die rekombinante Technologie hat im Vergleich zu den klassischen Herstellungswegen der poly- und monoklonalen Antikörper den Vorteil, dass mehrere unterschiedliche Spezifitäten in einem Antikörpermolekül vereint werden können. Bi- oder trispezifische rAk ermöglichen beispielsweise eine Quervernetzung zwischen einer Zielzelle (z.B. Tumorzelle) und einer Effektorzelle (z.B. natürliche Killerzelle) (Luttmann, 2014). Des Weiteren können die Spezifität, die Affinität und die Stabilität der Antikörper durch gezielte genetische Manipulation verändert werden oder eine definierte Fusion an beliebige Substanzen wie Radioisotope, Liganden (z.B. His-tag), Toxine oder Enzyme (z.B. HRP) durchgeführt werden (Skerra 1994; Benito 1993). Der bereits erwähnte Nachteil der rekombinanten Technologie, dass mit wenigen Ausnahmen lediglich nur kleinere Teilstücke von IgGs funktionell hergestellt werden können, brachte allerdings die Frage nach neuartigen Produktionsstätten auf, die die Vorteile der Produktion von rAk in pro- und eukaryotischen Zellen vereinen könnten.

3.4 Pflanzen als Produktionssystem für rekombinante Antikörper

Die als „Grüne Gentechnik“ bezeichnete gentechnische Modifikation von Pflanzen ermöglicht eine ganze Bandbreite an unterschiedlichen Anwendungsmöglichkeiten. Am weitverbreitetsten und wohl bekanntesten sind die Ausbildung von Schädlings- und Herbizidresistenzen (z.B. gegen Glyphosat) (Horsman, 2007; Weiss, 2006), die Toleranzsteigerung gegenüber schädlichen Umweltfaktoren (z.B. Trocken-, Kälte-, und Hitzeresistenz, Salz- und Aluminiumtoleranz), und die Aufwertung der Qualität von Lebens- und Futtermitteln (z.B. Fruchtreife, Blühverhalten, Biomasse) (Dorfmueller, 2004).

In der Biotechnologie wird die Produktion von Substanzen in gentechnisch veränderten Organismen (GVO) als *molecular farming* bezeichnet. Durch die aktive Manipulation des Pflanzengenoms ergibt sich so die Möglichkeit der Produktion von rekombinanten Proteinen beispielsweise für die therapeutische oder diagnostische Anwendung.

Die Ära der Nutzung von gentechnisch veränderten Pflanzen als Proteinproduktionsstätte begann zwischen 1986 und 1990 mit der Herstellung eines humanen Wachstumshormons (Fusionsprotein) (Barta, 1986), eines humanen Interferons (De Zoeten, 1989) und HSA (Sijmons, 1990) in Tabakpflanzen (*Nicotiana benthamiana*, *N. benthamiana*). Erste Experimente zur Expression von funktionalen Volllängenantikörpern in Tabakpflanzen gelangen Hiatt et al. und Düring et al. (Hiatt, 1989; Düring, 1990). Dies war der prinzipielle Durchbruch für die Produktion von Antikörpern im kostengünstigen Großmaßstab, die sich beispielsweise für die medizinische Anwendung eigneten. In den darauffolgenden Jahren zeigten einige Forschergruppen auch die erfolgreiche Herstellung von Fab-Fragmenten (De Neve, 1993), scFvs (Firek, 1993; Schouten, 1996) und scFv-Fusionsproteinen (Spiegel, 1999). Zur Akkumulation der rekombinanten Proteine werden meist Tabakpflanzen (*tabacum*), aber auch andere Arten wie Luzerne (*alfalfa*), Mais, Reis, Erbsen oder Weizen verwendet. Dabei können im Pflanzensystem unterschiedliche Pflanzenkompartimente wie beispielsweise das endoplasmatische Retikulum (ER), die Vakuolen, das Zytosol oder die Apoplasten für die Proteinexpression genutzt werden (Stoger, 2005; Conrad, 1998). Je nach Protein können die Kompartimente gezielt durch Signalpeptide angesteuert werden. Beispielsweise eignen sich zur zytosolischen Expression scFv-Fragmente, da diese im Vergleich zu Volllängenantikörpern keine Disulfidbrücken ausbilden müssen, um funktionell zu sein (Schillberg, 1999).

Die in Pflanzen produzierten Antikörper werden als *Plantibodies* bezeichnet und bieten neben ihrer ökonomischen Produktion mit hohen Akkumulationsraten weitere Vorzüge (Verwoerd, 1995; Ziegler, 2000b). Im Gegensatz zur Verwendung von Bakterien als Produktionssysteme

können Pflanzen aktive Volllängenantikörper exprimieren, die die notwendigen posttranslationalen Modifikationen (z.B. Glykosylierung) durchlaufen haben. Ein weiterer Vorteil ergibt sich durch die Tatsache, dass Pflanzen die aktiven Proteine in ihren Früchten, Knollen oder Samen speichern können, was sie zu langzeitstabilen (bis zu 1,5 Jahre) und transportfähigen Produkten macht (Stöger, 2000; Ramirez, 2001). Betrachtet man die pharmazeutische Anwendung der *Plantibodies*, so bietet die biologische Diskrepanz zwischen Pflanze und Verbraucher (z.B. Mensch, Tier) einen weiteren entscheidenden Vorteil. Bei der Proteinproduktion in Pflanzen ist die Gefahr der Kontamination durch mikrobielle Toxine oder humane Viren (z.B. humanes Immundefizienz-Virus (HIV) oder Hepatitis-Virus) nicht gegeben. Des Weiteren sind die von Pflanzen produzierten Pathogene für den Menschen nicht relevant (Goldstein, 2004; Dorfmueller, 2004; Liénard, 2007; Fischer, 2000a). Tabelle 4 gibt einen Überblick einiger in Pflanzen hergestellter pharmazeutischer Antikörper.

Tabelle 4: Zusammenfassung einiger in Pflanzen hergestellter Antikörper für die pharmazeutische Anwendung (modifiziert nach Frenzel, 2013).

Pflanze	Antigen	Antikörper	Produktionssystem	Ausbeute	Referenz
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CD22 ^a	Immunotoxin, Exotoxin A	Partikelbeschuss	0,2–0,4 % der Chloroplasten	(Tran, 2013)
<i>Nicotiana tabacum</i>	BoNT/A ^b	scFv	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20–40 mg/kg	(Almquist, 2006)
<i>Nicotiana benthamiana</i>	HIV	IgG	CPMV ^c	105,1 mg/kg	(Sainsbury, 2010)
<i>Nicotiana tabacum</i>	HCC ^c	scFv-RNase	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	0,75–1,99 mg/g	(Cui, 2012)
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Ebolavirus GP1 ^d	IgG	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	0,4–0,5 mg/g	(Huang, 2010b)

^a Gruppe Salinsäure bindender Lektine (engl. *sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins*, CD22), ^b Botulinum-Neurotoxin (engl. *botulinum toxin serotype A*, BoNT/A), ^c Leberzellkarzinom (engl. *hepatocellular carcinoma*, HCC), ^d Ebolavirus Glykoprotein (engl. *ebolavirus glycoprotein*, Ebolavirus GP1), ^e Kuhersben-Mosaikvirus (engl. *cowpea mosaic virus*, CPMV)

Um die freie DNA, die beispielweise über die Sequenzierung eines monoklonalen Antikörpers erhalten wird (siehe Punkt 3.3 in Kapitel II), in die Pflanzenzelle zu übertragen, können unterschiedliche Methoden herangezogen werden. Zunächst muss dabei differenziert werden, ob das Gen nur vorübergehend/transient oder dauerhaft exprimiert werden soll. Bei der tran-

sienten Expression wird die Fremd-DNA in die Pflanzenzelle eingeschleust, allerdings nicht in das Genom der Wirtszelle eingebaut. Die Proteinexpression erfolgt nur solange, bis die Fremd-DNA in der Pflanzenzelle abgebaut wird. Im Gegensatz dazu wird bei einer gewünschten dauerhaften Expression die Fremd-DNA stabil in das Pflanzengenom integriert, mit diesem autonom repliziert und an die Tochtergenerationen weitergegeben. Es entstehen transgene Pflanzen (Tschofen, 2016). Es muss allerdings betont werden, dass eine transiente und eine dauerhafte Expression zumeist nicht eindeutig separiert werden können, da beispielsweise auch bei der Zielsetzung einer transienten Expression die Fremd-DNA teilweise ungewollt in einigen Pflanzenzellen stabil in das Genom eingebaut und dauerhaft exprimiert werden kann. Für eine transiente Expression werden hauptsächlich die biolistische Transformation, die Infektion mit viralen Vektoren oder die Agroinfiltration angewendet.

Die Grundlagen der Agroinfiltration liefert das Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*), welches einen Teil seiner DNA in Pflanzenzellen zu übertragen vermag. Unter natürlichen Bedingungen kann das Bakterium nur verletzte, zweikeimblättrige Pflanzen infizieren. Es kommt zur Bildung von pflanzlichem Tumorgewebe (z.B. Wurzelhalsgallen bei Meerrettich, Maukekrankheit bei Weinreben, Wurzelkropf bei Zuckerrüben), welches von den Bakterien als Lebensraum genutzt wird. Pathogene Agrobakterien tragen stets ein Plasmid mit einer Größe von 200 bis 800 Kilobasenpaaren, das für die Induzierung des Tumors essentiell ist (Tumor induzierendes Plasmid, Ti-Plasmid). Diesen natürlichen Vorgang macht sich die Gentechnik zunutze, indem das Ti-Plasmid mit dem jeweiligen Genabschnitt (Transfer-DNA) versehen wird, der für die gewünschte Proteinexpression kodiert (Kempken, 2012). Die Vermehrung des Plasmids erfolgt über das Ansetzen einer flüssigen Agrobakteriumkultur, die das veränderte Ti-Plasmid trägt. Diese wird entweder in die Blätter vakuuminfiltriert oder mittels Spritzen eingebracht. Der schematische Ablauf der mittels Agroinfiltration produzierten *Plantibodies* in Tabakpflanzen ist in Abbildung 19 dargestellt.

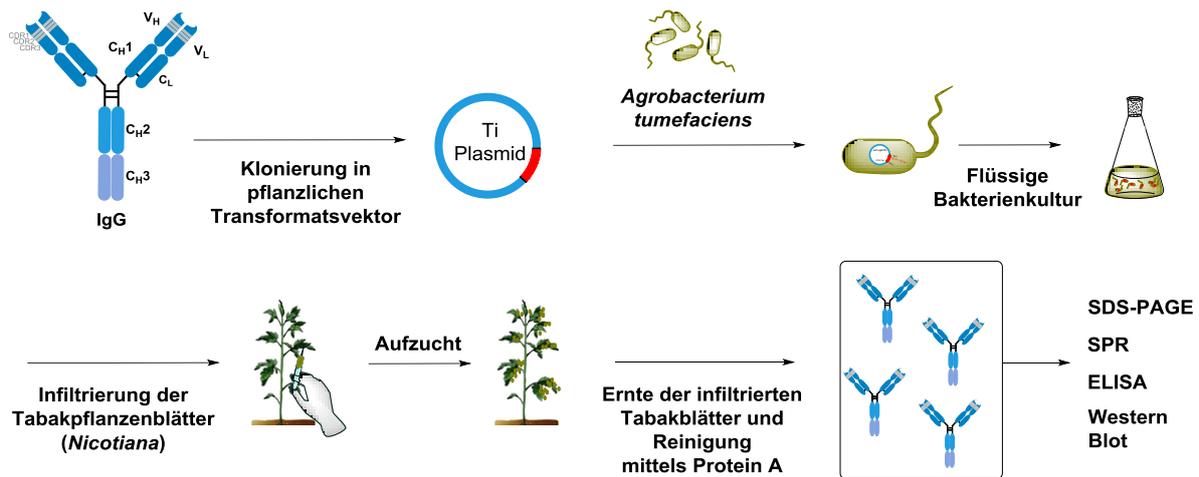


Abbildung 19: Schematische Darstellung von in Pflanzen produzierten IgG-Plantibodies am Beispiel der Agrofiltration.

Pflanzenpathogene Viren, die als Vektoren für die Übertragung von DNA-Sequenzen in die Pflanzenzelle dienen, bieten eine weitere Möglichkeit rekombinante Proteine in Pflanzen herstellen zu können. Dem Virus, beispielsweise dem helikalen Tabakmosaikvirus (TMV) (Verch, 1998) oder dem Kartoffel-X-Virus (engl. *potato virus X*, PVX) (Roggero, 2001; Ziegler, 2000a), wird der zu exprimierende Genabschnitt in sein Genom kloniert. Anschließend wird die Pflanze mit den manipulierten Viren inokuliert. Das Protein wird daraufhin in den Zellen der infizierten Pflanzen produziert. Probleme kann es bei dieser Art der DNA-Übertragung geben, wenn es zu spontanen Mutationen des viralen Genoms kommt. Sehr hohe Mutationsraten von Viren sind bekannt und könnten im schlimmsten Fall zu einer Übertragung auf humanpathogene Stämme führen (Gibbs, 1999). Die pharmazeutische Anwendung von TMV wird aus diesen Gründen nicht weiter favorisiert.

Eine weitere Möglichkeit der Übertragung freier DNA in die Pflanzenzellen von vor allem einkeimblättrigen Pflanzen ist durch die biolistische Transformation gegeben. Der Begriff „biolistisch“ leitet sich vom englischen Ausdruck *biological ballistic method* ab und beschreibt die Möglichkeit einen Genabschnitt in Zellen oder Organellen einbringen zu können. Die zu übertragende DNA wird dafür auf kleine (\varnothing 1–4 μm) Gold- oder Wolframpartikel (Cho, 2000; Klein, 1987) aufgebracht und unter Verwendung einer Genkanone mit hohem Druck in das Innere der Zelle geschossen. Diese Methode bietet eine gute Alternative im Vergleich zur *A. tumefaciens* vermittelten Transformation, auch Mitochondrien und Plastide wie beispielsweise Chloroplasten können transformieren. Chloroplasten, die hauptsächlich in den Blättern und Stämmen akkumuliert sind, besitzen im Vergleich zum Zellkern eine andere DNA. Damit ergibt sich ein weiteres Pflanzenkompartiment in dem rekombinante Proteine exprimiert werden können, das Expressionslevel kann so stark gesteigert werden (Heifetz, 2000; Bock, 2014). Nachteil des Partikelbeschusses ist allerdings eine meist nur geringe An-

zahl der stabilen Integration der Fremd-DNA in das Pflanzengenom im Vergleich zur Transformation über *A. tumefaciens*.

Falls eine langfristige Produktion der rekombinanten Proteine erwünscht ist, so hat sich die Generierung von transgenen Pflanzen bewährt, da die herzustellende Menge theoretisch nur durch die zur Verfügung stehende Anbaufläche der Pflanzen limitiert ist. Um transgene Pflanzen zu erhalten, muss die Fremd-DNA stabil in das Pflanzengenom integriert werden. Dafür eignen sich hauptsächlich binäre Vektorsysteme, bei denen sich die T-DNA mit dem gewünschten Genabschnitt auf einem zweiten kleineren Plasmid befindet und das Ti-Plasmid nur noch die für den DNA-Transfer in die Pflanzenzelle wichtige Virulenz-Region (*vir*-Gen) besitzt (Helfer-Plasmid). Das kleinere Plasmid kann aufgrund seiner Größe leicht in *E. coli* manipuliert werden und nicht benötigte Genabschnitte können entfernt werden, um die Menge an zu übertragenden fremden Genen möglichst gering zu halten. Erst durch die Kombination beider modifizierter Plasmide in *A. tumefaciens* wird eine T-DNA-Übertragung möglich gemacht (Hoekema, 1983). Die Integration des Genabschnittes erfolgt über die Infektion von beispielsweise Blattscheiben mit dem modifizierten Agrobakterium. Das Helfer-Ti-Plasmid löst die Assoziation des Bakteriums mit der Pflanzenzelle aus und anschließend kann das zweite T-DNA-Plasmid in das Pflanzengenom übertragen werden. Die Kontrolle, ob auf diesem Weg eine transgene Pflanze erhalten wurde, erfolgt meist händisch durch die Überprüfung, ob bestimmte Marker-Gene (z.B. Antibiotikaresistenzen) übertragen wurden (Brandt, 2004; Fischer, 2000a).

3.5 Charakterisierung von Antikörpern

Je nach gewünschter Information, stehen unterschiedliche Methoden zur Antikörpercharakterisierung zur Verfügung. Für eine grobe Abschätzung der Molekülmasse, gerade für kleine Antikörperfragmente, hat sich die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) bewährt, die ohne großen instrumentellen und zeitlichen Aufwand durchgeführt werden kann. Standardmäßig werden hierbei reduzierende Bedingungen gewählt, um die Disulfidbrücken zwischen den einzelnen Ketten zu spalten, sodass eine Auftrennung in leichte und schwere Ketten erfolgen kann. Eine Differenzierung von unterschiedlichen IgGs kann aufgrund der hohen Massenungenauigkeit allerdings nicht erfolgen (Laemmli, 1970). Zur Bestimmung der exakten Molekülmasse eignet sich die MS. Um ein intaktes Protein zu vermessen, werden bei der MS meist sanfte Ionisierungsmethoden wie ESI und MALDI mit anschließender TOF-MS-Kopplung verwendet. Letztere Methode hat sich zur Bestimmung von ganzen IgGs mit einem

Molekulargewicht von etwa 150 kDa bewährt, da eine Detektion auch ohne Dekonvolution möglich ist.

Die Bestimmung der Antikörperkonzentration wird hauptsächlich mit klassischen Verfahren, wie Biuret-, Lowry-, Bicinchoninsäure (BCA)- oder dem Bradford-Test durchgeführt. Die Nachweisgrenzen liegen zwischen 0,05 µg/mL und 10 µg/mL bei einem verwendeten Probenvolumen zwischen 0,1 mL und 1 mL (Lottspeich, 2012).

Für die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur wird häufig entweder die NMR-Spektroskopie (Dower, 1979) oder die Röntgenkristallographie verwendet (Phillips, 1971). Auch wenn die Strukturbestimmung mit Hilfe von NMR-Spektroskopie aufwändiger ist, liegt der große Vorteil in der Möglichkeit der Vermessung in wässrigen Lösungen, d. h. unter verhältnismäßig physiologischen Bedingungen. Für die Analyse mittels Röntgenbeugung hingegen werden gute Einkristalle benötigt, deren Herstellung in vielen Fällen aufgrund der hohen Antikörperflexibilität nicht möglich ist. In diesem Fall werden meist Antikörperfragmente hergestellt und nach Zugabe von Fällungsmitteln Einkristalle durch langsames Kristallwachstum erhalten.

Zur Untersuchung der Affinität und Selektivität haben sich vor allem der ELISA und die SPR bewährt. Auch die Verwendung der ITC rückt derzeit, aufgrund der deutlichen Reduktion der benötigten Antikörpermengen, für die Charakterisierung biomolekularer Wechselwirkungen in den Fokus der Forschung. Während früher Mengen im Milligrammbereich benötigt wurden, werden heutzutage nur noch Mikro- bis Nanogrammmengen benötigt (Praefcke, 2005).

Wie auch bei der SPR wird zur Bestimmung der Assoziations- bzw. Dissoziationskonstante ein Gleichgewicht für die Antikörper-Antigen-Interaktion angenommen. Die Affinität eines Antikörpers wird durch diese Werte ausgedrückt und beschreibt die Kraft einer einzelnen Antikörper-Antigen-Bindung (monovalente Bindung). Die Gesamtheit der Affinitäten wird hingegen durch die Avidität beschrieben unter der Annahme eines bivalenten Bindungsverhaltens. Für die Affinitätsbestimmung wird die nachfolgende Gleichgewichtsreaktion, die die Bindung an lediglich ein Paratop beschreibt, als Grundlage verwendet.



Die Ermittlung der Dissoziationskonstante K_d lässt sich durch Gleichung (3) vereinfacht ausdrücken.

$$K_d = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[Ag][Ak]}{[AkAg]} \quad (3)$$

Mit: K_d = Dissoziationskonstante / M $[Ag]$ = Analytkonzentration
 k_a = Assoziationsratenkonstante / 1/Ms $[Ak]$ = Antikörperkonzentration
 k_d = Dissoziationsratenkonstante / 1/s $[AkAg]$ = Antikörper-Antigen-Komplexkonzentration

Der K_d -Wert ist durch fundamentale Gleichungen mit der freien Reaktionsenthalpie ΔG verknüpft, die sich wiederum aus der Reaktionsenthalpie ΔH und der Reaktionsentropie ΔS zusammensetzt und kann durch die nachfolgende Gleichung (4) beschrieben werden.

$$-RT \ln K = \Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (4)$$

Mit: R = Universelle Gaskonstante / J/mol·K G = Gibbs-Enthalpie / J/mol
 T = Absolute Temperatur / K H = Enthalpie / J/mol
 K = Gleichgewichtskonstante S = Entropie / J/mol·K

Bei der ITC kann nach dieser Gleichung K_d aus der Reaktionsenthalpie des sich bildenden Komplexes berechnet werden.

Auch mittels ELISA kann eine Abschätzung über die Assoziations- bzw- Dissoziationskonstante getroffen werden. Hierzu wird im direkten oder indirekten Format die Antikörper- und Protein-Konjugat- bzw. Enzymtracerkonzentration sequentiell verringert, bis ein Minimum des IC_{50} -Wertes erreicht wird (Weller, 1992). Die Berechnung der Assoziationskonstante ergibt sich aus dem Kehrwert des IC_{50} -Wertes. Großer Nachteil bei der Verwendung des indirekt kompetitiven Formats ist allerdings die verhältnismäßig langsame Diffusion der Antikörper an die Oberfläche, was eine langsame Gleichgewichtseinstellung mit sich zieht. Auch beim direkt kompetitiven Format kann eine homogene Gleichgewichtseinstellung aufgrund des immobilisierten Antikörpers nicht sichergestellt werden (Cervino, 2008).

Eine Aussage über die Selektivität von Antikörpern hinsichtlich strukturverwandter Substanzen lässt sich mittels der KR ausdrücken. Johnston et al. definierten diesen Wert als das Verhältnis der Affinitätskonstante des Analyten relativ zur Affinitätskonstanten des Kreuzreaktanden in Prozent. Anstatt der Affinitätskonstanten wird häufig auch der IC_{50} verwendet (Johnston, 1976).

$$KR = \frac{IC_{50}(Analyt)}{IC_{50}(Kreuzreaktand)} \quad (5)$$

4 Immunofiltration

Die Isolierung von einzelnen Komponenten aus oft komplexen biologischen Gemischen stellt die klassischen Trennungsmethoden wie beispielsweise C_{18} -Materialien vor große Herausforderungen. Zum Beispiel kann die Auftrennung der IgG-Fraktion von Wirbeltieren nicht über die Molekülgröße, Ladung oder andere physikalische Eigenschaften erzielt werden (Benfer, 2003). Die Affinitätschromatographie stellt eine Methode der Adsorptionschromatographie dar, die auf der Ausbildung einer selektiven Bindung zwischen einem Liganden und dem spezifischen Analyten basiert. Damit ist es möglich Biomoleküle aus komplexen Systemen abzutrennen (Axén, 1967). Ein Pionier aus diesem Gebiet war der deutsche Wissenschaftler Emil Starkenstein. Er veröffentlichte im Jahr 1910 einen Artikel, der den Einfluss von Chlorid auf die Interaktion zwischen immobilisierter Stärke und α -Amylase beschrieb (Starkenstein, 1910). Dies öffnete den Weg für eine ganze Reihe weiterer Anwendungsmöglichkeiten. In den vergangenen 30 Jahren hat die Anwendung der Affinitätschromatographie, gerade in den „-omik“-Bereichen der modernen Biologie, das Verständnis der Interaktionen zwischen Biomolekülen vorangebracht (Waugh, 2005; Smith, 1988). Grundsätzlich können bei der Affinitätschromatographie die in Abbildung 20 aufgezeigten Ligand-Analyt-Systeme Anwendung finden, je nach zu isolierendem Zielanalyten (GE Healthcare, 2007).

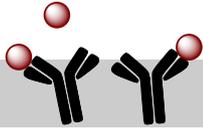
Ligand	Analyt	
Antikörper	Antigen, Virus, Zelle	
Biotin	Streptavidin	
Enzym	Substrat, Inhibitor, Kofaktor	
Glutathion	Glutathion-S-transferase, GST Fusionsprotein	
Hormon, Vitamin	Rezeptor	
Lectin	Polysaccharid, Zelle, Glykoprotein	
Metallionen	Poly-His-Proteine, native His-Proteine	
Nukleinsäure	Komplementäre Nukleinsäure, Histone	
Protein A/G	Antikörper	
Zelle	Lectin, oberflächenspezifisches Protein	

Abbildung 20: Zusammenfassung einer Reihe von Ligand-Analyt-Systemen (modifiziert nach GE Healthcare, 2007).

Die Grundlage für die in der vorliegenden Arbeit verwendete Immunofiltration stellt die IAC dar. Diese ist eine Sonderform der Affinitätschromatographie, die als Säulenflüssigkeitschromatographie auf Basis der selektiven Interaktion zwischen Antikörper und Antigen beruht. Unterschied zwischen der in der vorliegenden Arbeit angewendeten IAC und der Immunofiltration ist, dass bei der IAC die chromatographische Trennung eines Substanzgemisches im Vordergrund steht. Hingegen wird bei der Immunofiltration die effiziente Anreicherung bzw. Abreicherung einer Substanz fokussiert.

Sofern selektive und spezifische Antikörper zur Verfügung stehen, können prinzipiell alle beliebigen Biomoleküle abgetrennt werden. Erste Immunoaffinitätsversuche gelangen Campbell et al. im Jahr 1951. Sie konnten das erste Mal ein Anti-Rind-Serumalbumin mittels spezifischer Immunadsorption an *p*-Aminobenzyl-Zellulose isolieren (Campbell, 1951).

4.1 Funktionsweise der Immunoaffinitätschromatographie/Immunofiltration

Alle Schritte der IAC können generell entweder im kontinuierlichen Betrieb oder in einer sequentiellen Aufgabe der jeweiligen Medien erfolgen. Dabei wird der Ablauf in vier Teilschritte gegliedert. Die Immobilisierung der Antikörper kann mittels kovalenter und nichtkovalenter Bindung an ein geeignetes Trägermaterial bzw. durch die Einkapselung in eine Matrix erfolgen (siehe Punkt 4.2 in Kapitel II). Dabei kann die Immobilisierungsreaktion in der Säule oder vor deren Befüllung stattfinden. Anschließend erfolgt ein Waschschriff mit beispielsweise Phosphatpuffer und die Bestimmung der nicht immobilisierten Antikörpermenge, meist mittels Protein-Assays (z.B. Lowry- und Bradford-Test) oder indirektem ELISA. Die Probenaufnahme erfolgt im Wesentlichen nach einem Konditionierungsschritt des Säulenmaterials mit dem entsprechenden Probenmedium. Bei diesem Äquilibrierungsschritt wird die Oberfläche des Trägermaterials vollständig mit der wässrigen Phase benetzt, um die Effizienz der Säule zu optimieren. Die Antigen-enthaltende Probe wird auf die Säule dosiert und durchströmt das Säulenmaterial. Die Interaktion zwischen Antikörper und Antigen wird durch ein dynamisches Gleichgewicht beschrieben. Ein darauffolgender Waschschriff mit einem Fließmittel mit sehr geringer Elutionskraft führt dazu, dass ungebundene Matrixkomponenten entfernt werden. Für eine vollständige Elution des Antigens in möglichst kleinen Volumina werden Lösungen mit einer stärkeren Elutionskraft verwendet. Hierbei kommen häufig Puffer mit einer erhöhten Salzkonzentration, organische Lösungsmittel, chaotrope Reagenzien und Lösungen mit saurem oder basischem pH-Wert zum Einsatz (Zachariou, 2008). All diese Methoden induzieren eine kurzzeitige Strukturveränderung des Antikörpers, wodurch die Bindung gelöst wird und

das Antigen die Säule verlassen kann. Die Verwendung einer Lösung mit zu starker Elutionskraft kann allerdings zu einer irreversiblen Strukturänderung führen, was letzten Endes zu einer drastischen Effizienzminderung des Säulenmaterials führt. Für den Regenerierungsschritt wird die Säule mit ausreichend Phosphatpuffer gespült, um erneut optimale Bedingungen für den Antikörper zu schaffen. Auch die Lagerung der IAC-Säulen sollte bis zur Wiederverwendung in einem geeigneten Phosphatpuffer erfolgen. In Abbildung 21 sind die einzelnen Schritte einer IAC bzw. Immunofiltration schematisch dargestellt. Die Immunofiltration beschränkt sich per Definition in der vorliegenden Arbeit im Wesentlichen nur auf die ersten beiden Teilschritte der IAC; der Antikörperimmobilisierung und der Probenaufgabe.

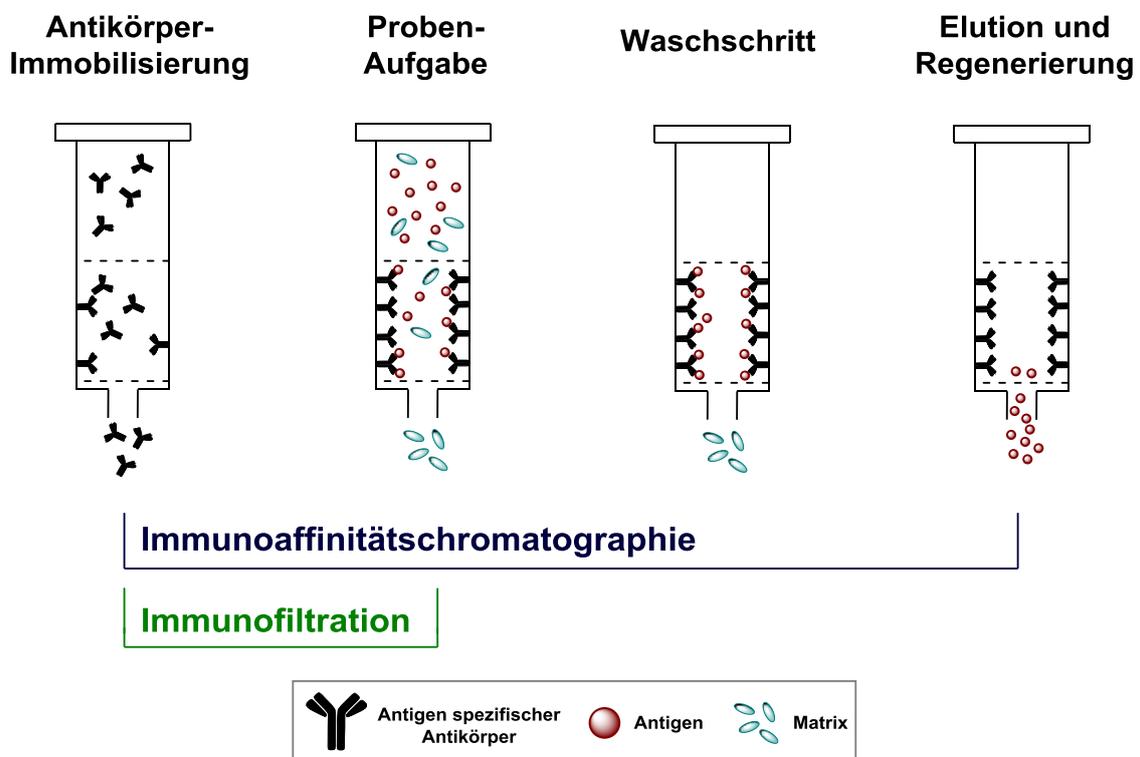


Abbildung 21: Schematischer Ablauf der IAC bzw. Immunofiltration.

4.2 Immobilisierungsmethoden

Hinsichtlich der Immobilisierungsmethode des Liganden und der weiteren Anwendung können unterschiedliche Säulenmaterialien verwendet werden. Als Matrix der stationären Phase stehen zum Beispiel vernetzte Dextrane, Polyacrylamidgele, Agarose, Cellulose und Silikagele zur Verfügung. Alle diese Substanzen sind mittlerweile kommerziell erhältlich und sind entweder bereits modifiziert (z.B. *N*-Hydroxysuccinimid-aktivierte Agarose, NHS-aktivierte Agarose) oder müssen noch aktiviert werden. Unabhängig vom gewählten Trägermaterial, sollten zum einen Faktoren wie die chemische bzw. physikalische Stabilität und Beständigkeit

beachtet werden, zum anderen sollte die unspezifische Wechselwirkung von Matrixbestandteilen bzw. dem Antigen mit dem Säulenmaterial möglichst vollständig reduziert werden. Des Weiteren sollte der Analyt den Liganden schnell und ungehindert erreichen können. Die Matrix sollte einen möglichst geringen Strömungswiderstand aufweisen, was im Wesentlichen von der Form, der Größe und der Porosität der Teilchen und der Packungsdichte abhängt. Da die Anwendung von (Immuno)affinitätsäulen meist auf wässrige Proben stattfindet, sollte auch das Säulenmaterial möglichst hydrophil sein, um die Annäherung des Analyten an den Liganden zu optimieren.

Ein wichtiger Schlüsselschritt bei der Herstellung von Säulenmaterialien für die (Immuno)affinitätschromatographie ist die Art der Ligandenimmobilisierung. Idealerweise sollte der Ligand während dieses Prozesses seine Funktionalität und Bindungseigenschaften vollständig beibehalten und für den Bindungspartner zugänglich sein. In den Abschnitten 4.2.1 bis 4.2.3 in Kapitel II werden einige Strategien zur Immobilisierung erläutert. Dabei handelt es sich lediglich um einen Auszug an möglichen Techniken, die im Zuge der vorliegenden Arbeit als wichtig erachtet wurden.

4.2.1 Kovalente Ligandenimmobilisierung

Die kovalente Immobilisierung ist eine der meist verwendeten Art, den Liganden an einen Träger zu immobilisieren. Die Kopplungsreaktionen können hierbei über Sulfhydryl-, Hydroxyl-, Amino-, Aldehyd-, oder Carboxylgruppen erfolgen. Um auszuschließen, dass es zu keiner unspezifischen Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial kommt, wird häufig ein Abstandhalter oder *spacer* zwischen die Matrix und den Liganden eingeführt. In der nachfolgenden Abbildung 22 ist beispielhaft die kovalente Kopplung eines Antikörpers an die Agarosematrix über eine freie Aminogruppe des Proteins abgebildet.

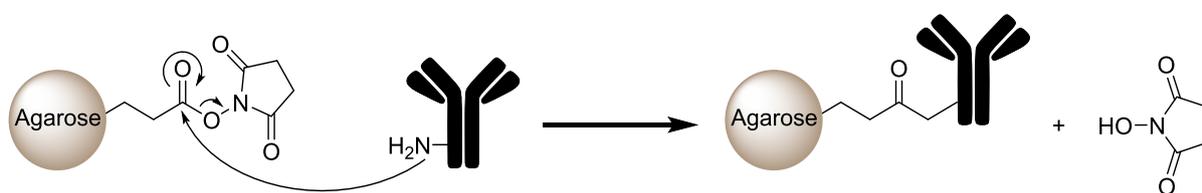


Abbildung 22: Kovalente Kopplungsreaktion eines Antikörpers an NHS-aktivierte Agarose.

Die primäre Aminogruppe greift die Estergruppe der aktivierten Agarose an und addiert an diese. Über ein tetraedrisches Intermediat wird NHS als Abgangsgruppe eliminiert, sodass eine stabile Amidbindung gebildet wird (Additions-Eliminierungs-Prozess). Überschüssige Estergruppen der Agarose müssen nach der Kopplungsreaktion durch Zugabe anderer primä-

rer Amine (z.B. Ethanolamin) blockiert werden, sodass eine unspezifische kovalente Bindung des Antigens an das Säulenmaterial verhindert wird.

Die teilweise harschen Reaktionsbedingungen während der Immobilisierungsprozedur führen häufig zu Konformationsänderungen und damit verbundenen Aktivitätsverlusten der immobilisierten Liganden.

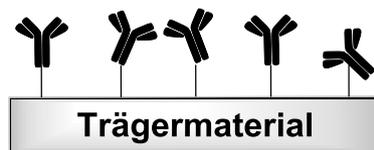


Abbildung 23: Schematische Darstellung der kovalenten Antikörperimmobilisierung.

4.2.2 Nichtkovalente Ligandenimmobilisierung

Physikalische Adsorption

Grundlage für die physikalische Adsorption stellt die Immobilisierung an einen nicht spezifisch funktionalisierten Träger dar (Abbildung 23). Die Interaktion basiert dabei zumeist auf Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und Coulomb-Wechselwirkungen. Als Trägermaterialien werden häufig Polysaccharide wie z.B. Dextran, Proteine wie Gelatine und anorganische Substanzen, wie Aluminiumoxid und Siliciumdioxid verwendet (Hofstee, 1973; Solomon, 1975; Hyndman, 1992; Thust, 1999). Ein Nachteil dieser Methode ist der häufig zu verzeichnende Aktivitätsverlust des Liganden aufgrund seiner zufälligen Orientierung während des Immobilisierungsprozesses.



Abbildung 24: Schematische Darstellung der physikalischen Antikörperadsorption.

Biospezifische Adsorption

Bei der biospezifischen Adsorption bindet der eigentliche Trägeranalyt spezifisch an einen bereits kovalent immobilisierten zweiten Trägeranalyten. Eine der wichtigsten Anwendungen ist die Bindung von Biotinverbindungen an immobilisiertes Avidin oder Streptavidin.

Die Bindung von Antikörpern unterschiedlicher Gattungen an immobilisiertes Protein A und Protein G stellt eine weitere weit verbreitete biospezifische Ligandenimmobilisierungsmethode dar. Da beide Zellwandproteine der Bakteriengattungen *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus* selektiv an dem Fc-Teil von Antikörper binden, findet zum einen eine gerichtete

Bindung statt, zum anderen wird der Antigen-bindende Teil des Antikörpers nicht beeinflusst. Die Immobilisierung von Protein A/G am Trägermaterial (Abbildung 25) erfolgt meist durch reduktive Aminierung von Aminogruppen, die sogenannte Bromcyan-Reaktion oder die Glutaraldehydmethode (Denizli, 2000; Terman, 1988). Nachteilig an der Immobilisierung eines Antikörpers über ein Protein ist, dass diese Methode nicht kovalent ist, weshalb bei der Elution neben dem Antigen unter Umständen auch der Antikörper von der Säule entfernt wird und eine Wiederverwendung ohne erneute Antikörperimmobilisierung teilweise erschwert wird.

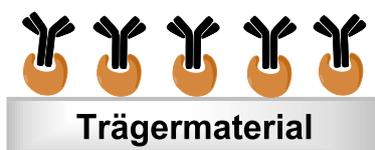


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Antikörperimmobilisierung über Protein A/G.

4.2.3 Immobilisierung mittels Sol-Gel-Prozess

Bei der Wahl des Einschlusses in eine Matrix wird der Ligand nicht an ein Trägermaterial immobilisiert, so wie bei den vorangegangenen Beispielen, sondern in die Matrix eingekapselt. Der Ligandeneinschluss mittels des sogenannten Sol-Gel-Prozesses bietet eine Möglichkeit, Proteine in ihrem weitgehend nativen Zustand zu immobilisieren, ohne dass dabei nachteilige Strukturveränderungen aufgrund von kovalenten Bindungen an das Säulenmaterial hervorgerufen werden. Bei diesem Prozess werden nichtmetallische, glasartige Materialien aus einer kolloidalen Dispersion, dem sogenannten Sol, hergestellt. Sol-Gel-Glas-Materialien werden meistens durch saure (z.B. HCl) oder basische (z.B. NH₃) Katalyse von niedermolekularen, monomeren tetrafunktionellen Alkoxiden (z.B. Tetramethylorthosilikat TMOS, Tetraethylorthosilikat TEOS) hergestellt (Iller, 1979). Die ablaufenden Reaktionen teilen sich dabei in unterschiedliche Teilreaktionen ein:



Während der Hydrolyse (Gleichung (6)) entstehen zunächst reaktive Spezies aus den Präkursor-Molekülen, die dann im nächsten Schritt kondensieren (Gleichung (7) und (8)). Während dieses Prozesses entstehen neben polymeren Si-Ketten und -Ringen auch einzelne Verzwei-

gungen oder bereits ganze Netzwerke. Dieser Schritt geht mit einem Viskositätsanstieg einher, es kommt zur Bildung eines Gels.

Nach Iller et al. teilt sich die wässrige Polymerisation in drei Teile ein: a) Die Polymerisation von Monomeren zu Partikeln, b) das Partikelwachstum, und c) die Vernetzung und Verzweigung, was dann letztlich die Gelbildung ausmacht (Iller, 1979). Während des darauffolgenden Alterungsprozesses werden Lösungsmittelmoleküle kontinuierlich freigesetzt (MeOH bei TMOS, Ethanol (EtOH) bei TEOS), was sich durch einen Gewichtsverlust bemerkbar macht. Das Endprodukt ist glasartig und die unterschiedlichen Porositäten und Morphologien können durch die Art und Konzentration des eingesetzten Präkursors, dem molaren Verhältnis zwischen Silan und Wasser, der Zugabe von Additiven (z.B. MeOH, Glycerol), Art des Katalysators (sauer oder basisch) oder unterschiedliche Trocknungsbedingungen (z.B. bei RT oder 4 °C, bei Normaldruck oder unter Druck) variiert werden (Coradin, 2003).

Die Einkapselung von Biomolekülen in das Polymernetzwerk startet direkt nach Zugabe des Sols und schreitet während des Kondensationsprozesses weiter fort. In Abbildung 26 ist die Entstehung des Polymernetzwerkes mit Einkapselung von Antikörpern schematisch am Beispiel von TMOS dargestellt.

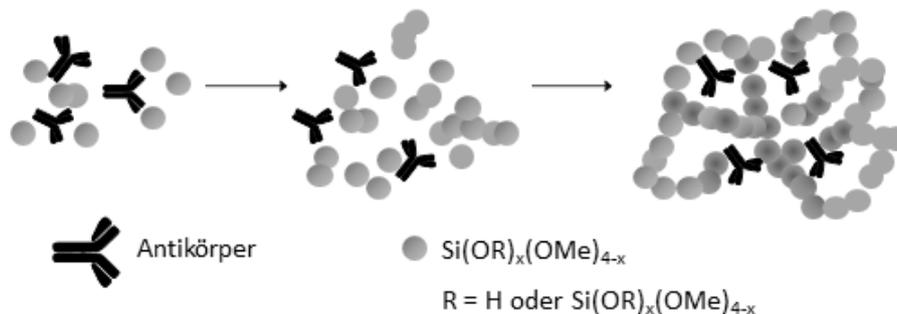


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Bildung der Netzwerkstruktur und Einkapselung von Antikörpern, während dem Sol-Gel-Prozess am Beispiel von TMOS unter saurer Katalyse.

Die großen Vorteile dieser Technologie für die funktionelle Immobilisierung von Proteinen liegen zum einen vor allem in den schonenden Reaktionsbedingungen (Hydrogel, 4 °C und milde chemische Bedingungen) (Livage, 2001). Zum anderen resultiert durch die Einkapselung eine hohe Antikörperstabilität die die Möglichkeit bietet, Analyten selbst aus einer komplexen Matrix quantitativ zu entfernen. In diesem Zusammenhang konnte bereits in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass Analyten, wie beispielsweise 1-Nitropyren (Zühlke, 2005), Sulfonylharnstoffe (Degelmann, 2006) und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (Cichna, 1997a; Cichna, 1997b) mittels immobilisierter mono- oder polyklonaler Antikörper aus einer wässrigen Matrix entfernt werden konnten.

III Experimenteller Teil

1 Entwicklung immunanalytischer Methoden

Falls nicht explizit erwähnt, bezieht sich die Bezeichnung MC10E7H jeweils auf den mittels Protein G gereinigten *Plantibody*. Bei Verwendung des murinen Antikörpers wurde entweder der mittels Ziege-anti-Maus-Antikörper (engl. *goat anti mouse*, GAM) bzw. mittels Protein G gereinigte MC10E7 verwendet.

1.1 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

1.1.1 Ansetzen der MC-LR-Stammlösung

Zur Herstellung einer 1,0 mg/mL (1,0 mM) MC-LR-Stammlösung wurde 1,0 mg des MC-LR-Lyophilisats zunächst in 90 μ L trockenem Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und anschließend mit 910 μ L Acetonitril (ACN) versetzt. Nach zehnmütigem Durchmischen wurde die Stammlösung in kleine Glasfläschchen aliquotiert (je 200 μ L) und die einzelnen Aliquote bei 20 °C gelagert. Erst direkt vor der Verwendung wurde die Stammlösung in der entsprechenden Konzentration im benötigten Medium verdünnt und falls erforderlich die nachfolgenden Verdünnungen aus diesem MC-LR-Standard hergestellt.

1.1.2 Synthese des MC-LR-BSA-Konjugats

In einem 1-mL-Glasreaktionsgefäß wurden 3,19 mg BSA (47,3 nmol, 1,0 Äquivalent, Äq.) in 168 μ L NaHCO₃-Puffer (0,1 M, pH 8,0) gelöst und anschließend 18 μ L einer *N*-Succinimidyl-*S*-acetylthiopropionat-Lösung (77,7 mM in DMSO_(trocken), 1395 nmol, 29,5 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde bei RT für 1,5 Stunden gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1,74 μ L einer frisch hergestellten 0,1 M NH₂OH·HCl-Lösung (0,1 M in 0,1 M NaHCO₃-Puffer) und 5 μ L einer wässrigen NaOH-Lösung (5 M), um die Acetylschutzgruppen zu entfernen. Eine PD MiniTrap G-25-Säule wurde dreimal mit je 2,5 mL Phosphatpuffer (PBS) äquilibriert und das Reaktionsgemisch (etwa 100 μ L) auf die Säule aufgegeben und mit 2,5 mL PBS eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden tropfenweise in einer MTP mit niedriger Bindungskapazität gesammelt. Je 3 μ L jeder Fraktion wurden auf einen MTP-Verschlussfilm pipettiert und je 3 μ L einer 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)-Lösung (10 mM in PBS, Ellman's Reagenz) hinzugegeben. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, mit N₂ überschichtet und 400 μ L der MC-LR-Stammlösung (1 mM, 9% DMSO/ACN, v/v, 402 nmol, 8,5 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit 22 μ L einer

wässrigen NaOH-Lösung (5 M) versetzt und unter Lichtausschluss bei RT und 200 rpm über Nacht gerührt. Freie Thiol-Gruppen wurden am nächsten Tag durch Zugabe von 800 µg Iodacetat (3,85 µmol, 81,4 Äq.) und 15-minütigem Rühren geblockt. Danach wurde das Reaktionsprodukt in Dialyse-Caps (je 100 µL pro Cap) gefüllt und insgesamt für vier Tage gegen dest. H₂O ausgetauscht. Nach der Gefriertrocknung wurden 2,06 mg (28,5 nmol, 60 % Ausbeute) des MC-LR-BSA-Konjugats (*coating*) erhalten. Das Lyophilisat wurde in PBS (0,05 % NaN₃, w/v) in einer finalen Konzentration von 1 mg/mL gelöst. Die Lösung wurde bis zur Verwendung unter Lichtausschluss bei 4 °C gelagert und zeigte über einen Zeitraum von einem Jahr eine gleichbleibende Stabilität in den ELISA-Tests.

Die Kopplungsdichte des *coatings* wurde mittels MALDI-TOF-MS am Lehrstuhl für Biochemie der Technischen Universität München bestimmt. Für die Entsalzung wurden 25 µL des *coatings* zehnmal mit C₄-Säulen (ZipTip) aufgezogen, zweimal mit Wasser (0,1 % TFA) gewaschen und mit 1,5 µL gesättigter Zimtsäure (0,1 % TFA) eluiert. Die Trocknung erfolgte anschließend auf einem Aluminium-Target bei RT. Als Referenz diente eine BSA-Lösung (1 mg/mL).

1.1.3 Indirekt kompetitiver ELISA

ELISA-Tests wurden grundsätzlich in 96-Well-MTPs mit flachem Boden und hoher Bindungskapazität durchgeführt. Während den einzelnen Inkubationsschritten waren die MTPs stets mit einem Verschlussfilm verschlossen.

Wenn der ELISA zur Quantifizierung von MC-LR in den einzelnen Fraktionen der Immunofiltrations-Experimente verwendet wurde, erfolgte die Kalibrierung immer auf derselben MTP und die Proben wurden je nach Experiment in Verdünnungen im Bereich von 1 (unverdünnt) bis 1:10000 (in 10 % MeOH/dest. H₂O) aufgegeben, um mit der resultierten Konzentration im Arbeitsbereich des Immunoassays zu liegen. Dabei erfolgte mindestens eine Dreifachbestimmung sowohl für die Kalibrierpunkte als auch die einzelnen Verdünnungen der Probe. Die nachfolgenden *coating*- und Antikörperkonzentrationen beziehen sich auf den jeweils optimierten ELISA.

Beschichtung: Die Kavitäten der MTP wurden mit je 200 µL des *coatings* mit einer finalen Konzentration von 50 ng/mL in *coating*-Puffer über Nacht bei 4 °C beschichtet. Anschließend wurde mit 300 µL pro Kavität dreimal automatisch mit Waschpuffer gewaschen.

Blocken: Die MTP wurde pro Kavität mit 300 µL einer 1 %igen Caseinlösung eine Stunde lang bei RT und 200 rpm geblockt. Anschließend wurde erneut automatisch gewaschen.

Kompetitionsschritt: In jede Kavität wurden entweder 100 μL der Toxin-Standards (0, 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 $\mu\text{g/L}$) in 10 % MeOH/dest. H_2O oder 100 μL der zu quantifizierenden MC-LR-Probe (Verdünnungen variierten je nach Experiment) gegeben. Anschließend erfolgte zeitnah die Zugabe von 100 μL des Primärantikörpers (MC10E7 (Protein G), MC10E7 (GAM), MC10E7H bzw. scFv) in unterschiedlichen Konzentrationen (1 $\mu\text{g/mL}$, 5 ng/mL , 5 ng/mL bzw. 20 ng/mL , verdünnt in PBS). Die einstündige Inkubation erfolgte bei RT und 100 rpm, gefolgt von einem automatischen Waschschrift.

Sekundärantikörper: Je Kavität wurden 200 μL einer 200 ng/mL -Sekundärantikörperlösung für MC10E7 bzw. MC10E7H (anti-Maus-HRP bzw. anti-human-HRP, in PBS verdünnt) bzw. 1,82 $\mu\text{g/mL}$ für die scFvs (anti-polyHistidin-HRP bzw. anti-c-Myc-HRP, in PBS verdünnt) hinzugegeben. Auch hierbei erfolgte die einstündige Inkubation bei RT und 100 rpm. Anschließend wurde erneut automatisch gewaschen.

Farbreaktion: Jede Kavität der MTP wurde mit 200 μL der Substrat-Lösung bei 100 rpm und RT inkubiert. Die Dauer variierte je nach Experiment zwischen 7 min und 35 min. Bei ausreichender Blaufärbung wurde die Reaktion mit 100 μL der Stopp-Lösung beendet und die Absorption bei 450 nm photometrisch bestimmt.

1.1.4 Kreuzreaktivitätstests

Zur Bestimmung der KR des murinen Antikörpers MC10E7 und des rekombinanten Antikörpers MC10E7H wurden drei weitere MCs (MC-Arginin-Arginin, MC-RR; MC-Leucin-Phenylalanin, MC-LF; MC-Leucin-Tryptophan, MC-LW) herangezogen. Die ELISA-Tests erfolgten dabei im indirekt kompetitiven Format (siehe Punkt 1.1.3 in Kapitel III). Die MTPs wurden mit dem *coating* (50 ng/mL in *coating*-Puffer) beschichtet. Für die Kompetition wurde jeweils eines der drei MCs verwendet. Das Toxin wurde ebenfalls in 10 % MeOH/dest. H_2O verdünnt und in äquimolarer Menge bezüglich MC-LR hinzugegeben. Die Konzentration der Antikörper (je 5 ng/mL in PBS) wurde konstant gehalten. Die Berechnung der prozentualen KR erfolgte über den Quotienten der erhaltenen IC_{50} -Werte von MC-LR und MC-XY.

1.1.5 Stabilitätstests

Zur Bestimmung der Stabilität von MC10E7 und MC10E7H im ELISA wurden jeweils MC-LR-Verdünnungsreihen mit der entsprechende Konzentration an Ca^{2+} , Huminsäuren oder organischen Lösungsmitteln (MeOH oder ACN) in dest. H_2O hergestellt. Die pH-Werte wurden mit verdünnter HCl-Lösung oder verdünnter NaOH-Lösung eingestellt. Für die Stabilitätstests

in Realproben wurden die Wasserproben (Leistungswasser des Instituts für Wasserchemie (IWC), entnommen 02.12.2015, Kastensee, entnommen 06.07.2015 und Weßlinger See, entnommen 06.07.2015), jeweils vor der Anwendung filtriert (siehe Punkt 2.1 in Kapitel III) und anschließend eine Verdünnungsreihe erstellt. Hinsichtlich der Temperaturstabilität wurde die entsprechende MTP während des einstündigen Competitionsschritts bei konstant gehaltenen 37 °C inkubiert.

1.2 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie)

Alle SPR-Spektroskopie-Messungen wurden im indirekten ELISA-Format mit einem CM5 Sensorchip an einem Biacore X100 durchgeführt. Es wurde stets bei 25 °C bzw. 37 °C und, wenn nicht anders erwähnt, bei einer konstanten Flussrate von 10 µL/min gemessen. Als Laufpuffer diente HBS EP+ (pH 7,4, Laufpuffer).

1.2.1 Immobilisierung von MC-LR-BSA

Zur Aktivierung der Chipoberfläche wurde eine frisch hergestellte 1:1-Mischung (v/v) aus 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (400 mM in dest. H₂O, EDC) und NHS (100 mM in dest. H₂O) für 7 min über den Chip geleitet (Messzelle sowie Referenzzelle). Anschließend wurde eine Lösung von 30 µg/mL des *coatings* in Natriumacetatpuffer (10 mM, pH 5,0) dreimal für je 5,8 min über die Messzelle geleitet. Die gesamte Immobilisierungsdauer betrug 17,5 min. Zum Absättigen noch freier Bindungsstellen wurde eine wässrige Ethanolaminlösung (1 M) für 7 min über den Goldchip geleitet. Die Lagerung des Chips erfolgte bei 4 °C in Laufpuffer.

1.2.2 Immobilisierung von MC-LR

Für die Kopplung von MC-LR an die Oberfläche des CM5-Chips wurde ein geringfügig modifiziertes Protokoll von Vinogradova et al. verwendet (Vinogradova, 2011). Zur Aktivierung des Chips wurden 50 µL einer frisch hergestellten wässrigen 1:1-Mischung (v/v) aus EDC (400 mM) und NHS (100 mM) auf die Oberfläche gegeben und diese bei 100 rpm für 20 min inkubiert. Anschließend wurde die Goldoberfläche mit 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (10 mM in dest. H₂O, HEPES) gewaschen und 50 µL einer 0,1 mg/mL-MC-LR-Lösung (1 mg/mL verdünnt in 600 nM Cetyltrimethylammoniumbromid in 10 mM HEPES, CTAB) hinzugegeben, für mindestens 10 Stunden inkubiert und anschließend mit HEPES (10 mM in dest. H₂O) gewaschen. Zur Deaktivierung wurden 50 µL einer wässrigen

Ethanolamin-Lösung (1 M) auf die Goldoberfläche gegeben und der Chip für 20 min bei 100 rpm inkubiert. Nach einem Waschschrift mit dest. H₂O und Trocknen im N₂-Strom wurde der Chip in das Biacore X100 eingelegt.

1.2.3 Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels SPR-Spektroskopie

Zur Bestimmung von K_d wurden für beide Antikörper (MC10E7 (GAM) und MC10E7H) fünf Verdünnungen in Laufpuffer hergestellt und anschließend Assoziations- und Dissoziationskurven für die verschiedenen Konzentrationen von jeweils 0,13, 0,26, 0,52, 1,04, 2,03 nM aufgenommen.

Zur Aufnahme der Assoziationsratenkonstanten wurden die einzelnen Konzentrationen jeweils für 2 min mit einer Fließgeschwindigkeit von 30 μ L/min über den Chip geleitet. Die Dissoziationsphase von 15–25 min erfolgte jeweils direkt im Anschluss, indem Laufpuffer über den Chip geleitet wurde. Für die Regenerierung am Ende des Messzyklus wurde eine NaOH-Lösung (50 mM, 0,05 % Tensid P20, v/v) für insgesamt 4 min über den Chip geleitet.

1.3 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

ITC-Messungen wurden mittels eines MICROCALTMPEAQ-ITC-Kalorimeters durchgeführt. Hierzu wurde zuvor ein Teil der MC-LR-Stammlösung (1 mg/mL, 9 % DMSO/ACN) unter einem N₂-Strom bis zur Trockene eingedampft und anschließend mit einer Mischung aus 10 % MeOH/PBS (v/v) in den entsprechenden Konzentrationen aufgenommen. Zu Beginn der Messung befanden sich in der Messzelle 300 μ L der Antikörper-Lösung (2,5 μ M für den GAM gereinigten MC10E7 und 50 μ M für MC10E7H in 10 % MeOH/PBS) und in der Spritze 70 μ L der MC-LR-Lösung (50 μ M bei MC10E7 und 2,5 μ M bei MC10E7H). In die Referenzzelle wurden zu Beginn der Messung 300 μ L 10% MeOH/PBS gegeben. Bei jedem Experiment wurde nach einminütiger Äquilibrationszeit die MC-LR-Lösung in 1 μ L-Schritten automatisch zu der Antikörper-Lösung titriert. Die Wartezeit zwischen den einzelnen Injektionen betrug jeweils 2,5 min. Die Messzelle wurde während des gesamten Vorgangs bei 750 rpm gerührt und thermostatisiert bei 25 °C betrieben.

1.4 Kolorimetrischer Immunoassay

1.4.1 Herstellung magnetischer MC-LR-BSA-Partikel (MC-LR-BSA-Fe₃O₄)

Magnetische Fe₃O₄-Partikel wurden nach einer Vorschrift von Hu et al. hergestellt (Hu, 2008). Hierfür wurden 1,35 g FeCl₃·6 H₂O (2 Äq, 5,00 mmol) und 0,695 g FeSO₄·7 H₂O (1 Äq, 2,50 mmol) in 25 mL dest. H₂O gelöst und für 10 min bei 80 °C erhitzt. Anschließend wurden 2 mL einer NH₃-Lösung (28 % in Wasser) hinzugegeben und für 30 min bei 80 °C erhitzt. Die entstandenen schwarzen Partikel (Fe₃O₄) wurden mittels Anlegen eines externen magnetischen Felds separiert und die überstehende Lösung verworfen. Nach dreimaligem Waschen der Partikel mit dest. H₂O und EtOH wurden sie für 30 min bei 120 °C getrocknet. Anschließend wurden 60 mg der Fe₃O₄-Partikel in 10 mL EtOH unter Behandlung im Ultraschallbad für 15 min suspendiert. Nach der Zugabe von 100 µL dest. H₂O und 200 µL 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) wurde die Suspension für 5 Stunden bei RT und 200 rpm inkubiert. Die resultierten APTES-modifizierten NH₂-Fe₃O₄-Partikel wurden mittels externen Magnetfeldes separiert und anschließend fünfmal mit je 1 mL dest. H₂O gewaschen. Die Dispersion erfolgte in 4 mL Wasser.

Zur Funktionalisierung der magnetischen Partikel wurde 1 mL der NH₂-Fe₃O₄-Partikel-Lösung (~15 mg/mL) zweimal mit je 1 mL PBS (50 mM, pH 8,0) gewaschen und anschließend in 1 mL PBS resuspendiert. Es wurden 0,5 mL einer Glutardialdehyd-Lösung (25 % in Wasser) hinzugegeben und die Suspension für 1 h bei 100 rpm und RT inkubiert. Die aktivierten Partikel wurden durch ein externes Magnetfeld separiert, viermal mit je 1 mL dest. H₂O gewaschen und anschließend 1 mL PBS (50 mM, pH 8,0) auf die Partikel gegeben. Die Zugabe von 50 µL des *coatings* (1 mg/mL in PBS, 0,05 % NaN₃) erfolgte unter Schütteln bei 200 rpm. Nach Inkubation über Nacht bei RT wurden die freien Bindestellen der magnetischen Partikel mittels Zugabe von 100 µL einer BSA-Lösung (50 mg/mL in 20 mM PBS, pH 8,0) und einstündiger Inkubation bei 200 rpm blockiert. Die erhaltenen MC-LR-BSA-Fe₃O₄-Partikel (Ø ~3 µm) wurden fünf Mal mit dest. H₂O gewaschen, in 5 mL dest. H₂O dispergiert (~3 mg/mL) und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Partikel waren etwa über drei Monate stabil.

1.4.2 Herstellung und Funktionalisierung von Goldnanopartikeln

Die Synthese der GNPs wurde mit geringfügiger Modifikation nach der Methode von Frens et al. durchgeführt (Frens, 1973). Vor Beginn der Synthese wurden alle verwendeten Gefäße und Rührfische mit Königswasser (HNO_3/HCl , 1:3, v/v) und dest. H_2O gewaschen, um eine eventuell auftretende Nukleation zu verringern. Um GNPs mit einer Größe von 35 nm herzustellen, wurden 50 mL einer wässrigen 0,25 mM HAuCl_4 unter starkem Rühren (750 rpm) bis zum Siedepunkt erhitzt und anschließend 1,8 mL einer Natriumcitrat-Lösung (1 % in dest. H_2O , w/v) hinzugefügt. Nach einem Farbwechsel von schwarz über pink zu einem hellen Rot wurde die Lösung für 15 min weiter erhitzt. Die anschließende Abkühlung auf RT erfolgte unter weiterem Rühren (200 rpm). Die Citrat-stabilisierten GNPs wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Für die Funktionalisierung der GNPs mit MC10E7 (GAM) (Ab-GNPs) wurden 5 mL der GNP-Lösung mit 100 μL einer K_2CO_3 -Lösung (100 mM in dest. H_2O) auf pH 8–9 eingestellt, 50 μL einer MC10E7-Lösung (1,1 mg/mL in PBS, 0,05 % NaN_3) zugegeben und die Lösung anschließend für eine Stunde bei 200 rpm und RT inkubiert. Zur Absättigung von freien Bindungsstellen wurden 570 μL einer BSA-Lösung (5 % in 50 mM PBS, pH 7,4, w/v) zugegeben. Nach einstündiger Inkubationszeit bei 200 rpm und RT wurden 635 μL einer Tween-20-Lösung hinzugegeben (1 % in dest. H_2O , w/v) und erneut für eine Stunde inkubiert. Um überschüssige Chemikalien zu entfernen, wurde das Reaktionsgemisch auf sechs Eppendorfgefäße aufgeteilt und für 12 min bei 9500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils entfernt und die Ab-GNPs in Waschpuffer resuspendiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurden die Ab-GNPs in 4 mL Waschpuffer dispergiert und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Nach Kopplung von MC10E7 (GAM) reduzierte sich die Haltbarkeit der Ab-GNPs aufgrund einer rascheren Agglomeration auf etwa einen Monat.

1.4.3 Herstellung der Goldwachstumslösung

Zu 10 mL einer wässrigen CTAB-Lösung (100 mM) wurden 25 μL einer wässrigen HAuCl_4 -Lösung (100 mM) gegeben und in einem Wasserbad bei 50 °C erwärmt. Nachdem sich der entstandene gelbe Niederschlag wieder gelöst hatte, wurden 100 μL einer wässrigen Ascorbinsäure-Lösung (100 mM) zugegeben. Nachdem die Lösung RT erreicht hatte, erfolgte die Verwendung stets zeitnah.

1.4.4 Generelles Protokoll für den kolorimetrischen Immunoassay

Protokoll für eine Probe: Die benötigte Menge an MC-LR-BSA-Fe₃O₄ (40 µL) wurde dreimal mit dest. H₂O gewaschen und anschließend in 40 µL dest. H₂O dispergiert. Die MC-LR-BSA-Fe₃O₄-Suspension wurde zu 100 µL der in ein Eppendorfgefäß vorgelegten MC-LR-Probe oder MC-LR-Standard (jeweils in 50 mM PBS, pH 7,4) pipettiert und anschließend je 100 µL der Ab-GNPs-Lösung zugegeben. Der einstündige Kompetitionschritt erfolgte stets bei 20°C und 500 rpm. Der leicht bis stark pinke Überstand wurde mittels externen Magneten vom Reaktionsgemisch getrennt und die Ab-GNPs-Wachstumsreaktion zeitnah durchgeführt. Hierfür wurde 1 mL der frisch hergestellten Goldwachstumslösung in eine Küvette (Polystyrol) vorgelegt und anschließend je 100 µL des Überstands hinzugegeben. Die Reaktion wurde nach exakt 10 min durch Zugabe von 100 µL einer wässrigen Na₂S₂O₃-Lösung (10 mM) gestoppt. Die Absorptionsmessung erfolgte an einem UV/Vis-Spektrophotometer gegen dest. H₂O als Referenz. Für die Kalibrierung wurden MC-LR-Konzentrationen von 0, 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 µg/L (50 mM PBS, pH 7,4) mindestens dreifach bestimmt.

2 Probenvorbereitung

2.1 Filtration

Alle verwendeten Oberflächenwasserproben wurden zunächst über einen Glasmikrofaserfilter filtriert, um störende Partikel $>1,2 \mu\text{m}$ zu entfernen und anschließend bis zur Verwendung bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Dabei wurde stets darauf geachtet, dass zwischen Probenahme und Probenverwendung maximal zwei Wochen lagen.

2.2 Festphasenextraktion für HPLC-MS-Experimente

Für die Anreicherung von MC-LR und gleichzeitige Entfernung von Matrixbestandteilen wurde eine SPE der filtrierten (siehe Punkt 2.1 in Kapitel III) und mit MC-LR aufgestockten bzw. der einzelnen Fraktionen der Immunfiltrations-Experimente (Durchfluss, Waschfraktion, Elution) mit OASIS-HLB-SPE-Kartuschen durchgeführt. Um mögliche Analytverluste während des SPE-Experiments zu verifizieren, wurde ein interner Standard zugegeben. Hierfür wurde eine Stammlösung von Leucin-Enkephalin mit einer Konzentration von 1 mg/mL in MeOH hergestellt und in einer finalen Konzentration von $1 \mu\text{g/L}$ zu den Proben addiert.

Die auf einer Vakuumapparatur platzierte C_{18} -Säule wurde zunächst mit 5 mL MeOH und $10 \text{ mL dest. H}_2\text{O}$ konditioniert. Anschließend erfolgte die Aufgabe der mit MC-LR und Leucin-Enkephalin versetzten Wasserprobe bzw. der einzelnen Fraktionen der Immunfiltrations-Experimente ohne Anlegen des Vakuums mit einer Tropfgeschwindigkeit von etwa 1 Tropfen/2 min . Um Matrixbestandteile zu entfernen, wurde ein Waschschriff mit 7 mL eines $5 \text{ \%igen MeOH/dest. H}_2\text{O}$ -Gemisches durchgeführt und die Säule anschließend unter zwei-minütigem Anlegen des Vakuums evakuiert. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 5 mL MeOH . Das Eluat wurde unter einem N_2 -Strom bei RT bis zur Trockene eingengt, anschließend mit $1 \text{ mL } 50 \text{ \% MeOH/dest. H}_2\text{O}$ aufgenommen und bis zur Verwendung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

3 HPLC-MS-Messungen von MC-LR

Die massenspektrometrischen Messungen von MC-LR wurden mittels HPLC-ESI-MS durchgeführt. Für die chromatographische Auftrennung wurde eine RP-Säule verwendet (Hypersil Gold), die vor Beginn der Messungen mit der mobilen Phase 75 % Wasser/MeOH mit 0,1 % NH₄OH konditioniert wurde. Als Detektor kam ein ESI-Orbitrap-Massenspektrometer zum Einsatz, welches im negativen Ionisierungsmodus betrieben wurde. Die Auflösung betrug dabei 50000 (2 Hz) und als maximale Injektionszeit wurden 50 ms festgelegt. Während den Messungen wurde das Vernebelungsgas auf 40 L/h und das Hilfsgas auf 2 L/h eingestellt. Die angelegte Spannung betrug 2,6 kV, die Kapillartemperatur 375 °C, die Kapillarspannung -60,00 V, die Tubuslinsenspannung -190,00 V und die Skimmerspannung -22,00 V. Leucin-Enkephalin und MC-LR wurden durch ihre Retentionszeit von 5,2 min ± 0,3 min bzw. 9,2 min ± 0,3 min und ihre exakten Massen von [M-H]⁻ = 554,26202 bzw. [M-H]⁻ = 993,54149 identifiziert. Eine Genauigkeit von ±5 ppm wurde dabei akzeptiert. Die Kalibrierung wurde mittels jeweiliger Dreifachbestimmung der Kalibrierstandards für MC-LR und Leucin-Enkephalin im Bereich von 2 µg/L bis 400 µg/L (in 50 % MeOH/dest. H₂O) erhalten. Die Standardabweichungen lagen dabei zwischen 0,14 % und 6,8 %.

3.1 Analysenmethode für MC-LR und Leucin-Enkephalin

Für die Trennung von Leucin-Enkephalin und MC-LR wurde eine Gradientenelution verwendet. Als Laufmittel kam ein Wasser/MeOH-Gemisch mit 0,1 % NH₄OH zum Einsatz, welches kontinuierlich hin zu höheren MeOH-Konzentration verändert wurde. Das entsprechende Gradientenprogramm ist Tabelle 5 zu entnehmen. Ein konstanter Fluss von 200 µL/min wurde bei einem Injektionsvolumen von 10 µL der jeweiligen Probe standardmäßig verwendet.

Tabelle 5: Zusammenfassung des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gradienten für die Bestimmung von MC-LR und Leucin-Enkephalin.

Zeit / min	H₂O / 0,1% NH₄OH in %	MeOH / 0,1% NH₄OH in %
0	75	25
1	75	25
12	30	70
13	75	25
14	75	25

3.2 Auswertung der HPLC-MS-Experimente

Die Konzentrationsbestimmungen der unbekannt Proben wurden für MC-LR und Leucin-Enkephalin mittels der durchgeführten Kalibrierung ($m = 6$, $n = 3$) ermittelt und anhand der Probenvolumina die Menge an Substanz bestimmt. Das Verhältnis zwischen aufgebener, bekannter Leucin-Enkephalin-Menge und der wiedergefundenen Menge, ergibt den Wert, der während des SPE-Schritts verloren gegangen ist und/oder nicht vollständig eluiert wurde. Der erhaltene Faktor wurde mit der bestimmten Menge an MC-LR multipliziert, um die Menge in der Ausgangslösung zu erhalten.

4 Immunofiltration

Falls nicht explizit erwähnt, bezieht sich die Bezeichnung MC10E7H jeweils auf den mittels Protein G gereinigten *Plantibody*. Bei Verwendung des murinen Antikörpers wurde entweder der mittels GAM bzw. mittels Protein G gereinigte MC10E7 verwendet.

4.1 Quantifizierung von nichtimmobilisierten Antikörpern

Die Quantifizierung der nichteingekapselten bzw. nichtgebundenen Menge an Antikörper wurde für beide Antikörperimmobilisierungsmethoden, aufgrund der erforderlichen hohen Nachweisstärke, mit dem indirekten nichtkompetitiven ELISA durchgeführt.

Beschichtung: Die Kavitäten der MTP wurden mit je 200 µL des *coatings* mit einer finalen Konzentration von 50 ng/mL in *coating*-Puffer über Nacht bei 4 °C beschichtet. Anschließend wurde mit 300 µL pro Kavität dreimal automatisch mit Waschpuffer gewaschen.

Blocken: Die MTP wurde mit 300 µL einer 1 %igen Caseinlösung pro Kavität eine Stunde lang bei RT und 200 rpm geblockt. Anschließend wurde erneut automatisch gewaschen.

Primärantikörper: Für die Kalibrierung wurden je 200 µL der Antikörper-Standards (1,39 ng/mL bis 1109 ng/mL in PBS) in die Kavitäten pipettiert. Die Antikörper enthaltenden Fraktionen wurden in Bereichen zwischen 1 (unverdünnt) und 1:500 in PBS verdünnt, ebenfalls in die Kavitäten gegeben und nach einstündiger Inkubation bei RT und 100 rpm wieder automatisch gewaschen.

Sekundärantikörper: Je Kavität wurden 200 µL einer 200 ng/mL Sekundärantikörperlösung für MC10E7 bzw. MC10E7H (anti-Maus-HRP bzw. anti-human-HRP, in PBS verdünnt) zugegeben. Auch hierbei erfolgte die einstündige Inkubation bei RT und 100 rpm. Anschließend wurde erneut automatisch gewaschen.

Farbreaktion: Jede Kavität der MTP wurde mit 200 µL der Substrat-Lösung bei 100 rpm und RT inkubiert. Die Dauer variierte je Experiment zwischen 3 min und 7 min. Bei ausreichender Blaufärbung wurde die Reaktion mit 100 µL der Stopp-Lösung beendet und die Absorption bei 450 nm photometrisch bestimmt.

4.2 Stabilität und Funktionalität von MC10E7 in Elutionsmitteln

Mittels indirekt kompetitiven ELISA wurde die Stabilität und Funktionalität von MC10E7 (Protein G) in unterschiedlichen potentiellen Elutionsreagenzien (siehe Tabelle 6) getestet.

Tabelle 6: Zusammenfassung der im ELISA getesteten Eluenten mit den entsprechenden Abkürzungen.

Abkürzung	Elutionsreagenz
80% ACN	80 % ACN/dest. H ₂ O
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid, 95 %
Gly-HCl	100 mM Glycin-HCl, pH 3,0
MgCl ₂	3 M Magnesiumchlorid, 75 mM HEPES
NaOH	2 mM Natriumhydroxid, pH 11
SDS	0,1 % SDS/dest. H ₂ O (w/v)
Reg.-P. (Regenerationspuffer)	100 mM Glycin-HCl, 100 mM Natriumchlorid, 0,1 % SDS, pH 3,0 (H ₂ SO ₄)

Das Protokoll für den ELISA folgt Abschnitt 1.1.3 in Kapitel III, wobei lediglich der Kompetitionsschritt modifiziert wurde. Es wurden Kalibrierkurven mit MC-LR-Standards im Bereich zwischen 0 µg/L und 100 µg/L in 10 % MeOH/dest. H₂O generiert, wobei sich die zugegebenen MC10E7-Lösungen (Protein G) bezüglich der Vorgehensweise bei der Herstellung unterscheiden (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Zusammensetzung der Antikörperlösungen für die Überprüfung der Stabilität und Funktionalität von MC10E7 in den verschiedenen Elutionsmitteln.

Lösung	MC10E7^a / µL	Eluent / µL	PBS / mL
1	8	-	4
2	8	40	3,96
3	8	40	3,96 nach 10 min

^a MC10E7 (Protein G) mit einer Konzentration von 1 µg/mL in PBS

Lösung 1 enthielt MC10E7 (Protein G) in einer Konzentration von 1 µg/mL in PBS. Lösung 2 beinhaltet den Eluenten in einer Verdünnung von 1:100 und MC10E7 (Protein G) in einer

Konzentration von 1 µg/mL in PBS. Lösung 3 entsprach Lösung 2, allerdings wurde das PBS erst nach zehnmütiger Inkubation von MC10E7 (Protein G) mit dem Eluenten hinzugegeben. Alle Lösungen wurden zeitgleich vor Beginn des Wettbewerbsschritts hergestellt.

4.3 NHS-aktivierte Agarose-Träger

Um optimale Elutionsbedingungen für die Säulenversuche zu finden, wurden Experimente durchgeführt, bei denen MC10E7 (GAM) kovalent an das Säulenmaterial gebunden wurde. Dies wurde über freie Aminogruppen des Antikörpers an NHS-aktivierte Agarosekügelchen erreicht.

Immobilisierung: Die kovalente Immobilisierung von MC10E7 an NHS-aktivierte Agarose-Kügelchen erfolgte stets in 1,5-mL-Eppendorf-Reaktionsgefäßen. Hierfür wurde zunächst die entsprechende Menge (500 µL) an Säulenmaterial entnommen (Verhältnis AK-Lösung/Säulenmaterial (v/v): ~1:3) und bei 1000 rpm für 20 Sekunden zentrifugiert, die Lagerlösung (Aceton) verworfen und der Rückstand in 1 mL dest. H₂O resuspendiert. Der Waschschritt mit dest. H₂O wurde ein weiteres Mal wiederholt, gefolgt von einmaligem Waschen mit PBS. Die Resuspension erfolgte in PBS in dem entsprechenden Ausgangsvolumen des Säulenmaterials, gefolgt von der Zugabe von 150 µL MC10E7 (GAM, 1,109 mg/mL). 350 µL PBS wurden zum Nachspülen der Gefäße verwendet, sodass am Ende ein Gesamtvolumen von 1 mL resultierte. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 7 °C mittels Überkopfschüttler inkubiert.

Blocken: Die über Nacht invertierte Suspension wurde für etwa 30 Sekunden zentrifugiert und anschließend der Überstand abgenommen und das Agarose-Bett mit 1 mL PBS gewaschen. Beide Fraktionen wurden auf die Anwesenheit von nicht gebundenem MC10E7 mittels dem unter Punkt 4.1 in Kapitel III beschriebenen indirekten nichtkompetitiven ELISA untersucht. Der Rückstand wurde mit 1 mL einer wässrigen Ethanolamin-Lösung (1 M) versetzt und für 20 Minuten bei RT invertiert. Die Suspension wurde quantitativ in eine Zentrifugensäule überführt und der Überstand durch Überdruck aus der Säule entfernt. Nach dreimaligem Waschen mit je 1 mL PBS wurde die Säule direkt verwendet.

4.3.1 Durchführung der NHS-aktivierte-Agarose-Experimente

Die Aufgabe von 8 mL einer 2,76 µg/L MC-LR-Lösung in dest. H₂O erfolgte schrittweise in Volumina von je 1 mL und die Fraktionen wurden bei einer Tropfgeschwindigkeit von ei-

nem Tropfen/Sekunde gesammelt. Anschließend wurden dreimal je 1 mL dest. H₂O auf die Säule aufgegeben, um eventuell vorhandenes adsorptiv gebundenes MC-LR zu entfernen. Auch dabei wurde fraktioniert, wie beschrieben, gesammelt. Für die Elution wurden je 12 mL der in Tabelle 8 aufgelisteten Elutionsmittel in je 2-mL-Schritten aufgegeben und in sechs Fraktionen gesammelt. Die Eluatfraktionen wurden im Bereich zwischen 1:250 und 1:12500 in 10 % MeOH/dest. H₂O verdünnt und auf ihren MC-LR-Gehalt mittels ELISA geprüft (siehe Punkt 1.1.3 in Kapitel III).

Tabelle 8: Übersicht der in NHS-aktivierte-Agarose-Experimenten getesteten Elutionsreagenzien.

Abkürzung	Elutionsreagenz
80% ACN	80% ACN/dest. H ₂ O
Gly-HCl	100 mM Glycin-HCl, pH 3,0
MgCl ₂	3 M Magnesiumchlorid, 75 mM HEPES
Reg.-P. (Regenerationspuffer)	100 mM Glycin, 100 mM Natriumchlorid, 0,1 % SDS, pH 3,0 (H ₂ SO ₄)

4.4 Herstellung von Sol-Gel-Glas

Für den nichtkovalenten Ligandeneinschluss kam in der vorliegenden Arbeit der sogenannte Sol-Gel-Prozess zum Einsatz. Hierbei wurde eine Methode von Degelmann et al. mit kleinen Modifikationen verwendet (Degelmann, 2006). Die Synthese verläuft in einem zweistufigen Prozess, wobei zunächst die Hydrolyse von TMOS stattfindet und anschließend die Polymerisation unter Anwesenheit des Biomoleküls. Unter Eiskühlung und Rühren (100 rpm) wurden 100 µL MeOH, 100 µL einer wässrigen HCl-Lösung (40 mM), 250 µL dest. H₂O und 300 µL 50 % Glycerol/dest. H₂O (v/v) vereint und anschließend 1,7 mL TMOS hinzugegeben. Die Hydrolyse des Präkursors erfolgte für 15 min. Eine Menge von 0,5 mg des Antikörpers (MC10E7 (GAM) bzw. MC10E7H) wurde in einer Konzentration von 1 mg/mL in 500 µL PBS gelöst, in einem Reaktionsgefäß aus Glas (Ø 2,5 cm oder Ø 3,5 cm) vorgelegt und mit der äquivalenten Menge (v/v) des Silikasols vermischt. Die Trocknung des Gels erfolgte für etwa 48 Stunden bei 4 °C bis ein Gewichtsverlust von 46–50 % zu verzeichnen war. Anschließend wurde der Monolith im Mörser zerkleinert, gesiebt (Maschenweite: 250 µm) und in 3-mL- bzw. 6-mL-Glassäulen zwischen zwei PTFE-Fritten (Porosität: 10 µm) eingebettet. Nach einem Waschschrift mit zweimal je 3 mL PBS wurden die Säulen bei 4 °C in PBS gela-

gert. Die beiden Waschfraktionen wurden auf die Anwesenheit von nicht eingekapseltem Antikörper untersucht. Wurde die einzukapselnde Menge an Antikörper erhöht (bei gleichbleibender Antikörper-Konzentration), so wurde die Menge an Silikasol und das für den Waschschritt mit PBS benötigte Volumen entsprechend linear hochskaliert. In Abbildung 27 ist schematisch der Prozess der Sol-Gel-Glas-Matrix-Herstellung dargestellt.

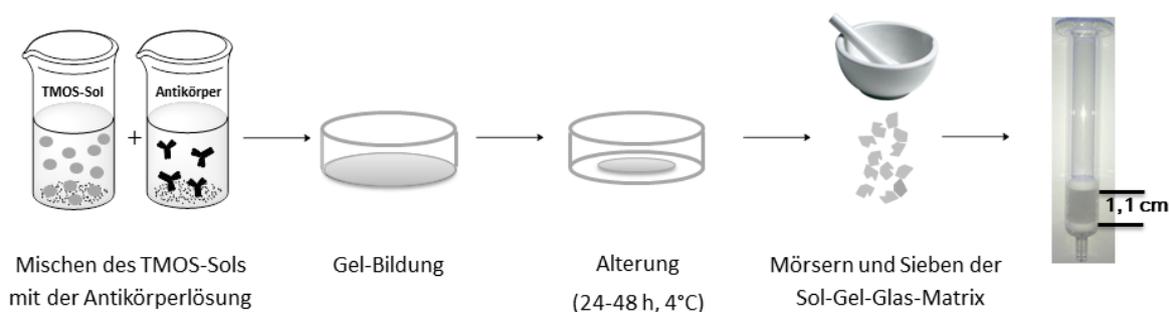


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Herstellung der Sol-Gel-Glas-Matrix mit eingekapselten Antikörpern. Die Füllhöhe des Säulenbetts betrug im Schnitt 1,1 cm pro Gramm Sol-Gel-Glas-Matrix.

4.5 Charakterisierung der Sol-Gel-Glas-Matrix

4.5.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Das gemörserte und gesiebte Sol-Gel-Glas (Gewichtsverlust von 50 %) wurde mit einem Kohleleitstab auf einem Stiftprobenteller befestigt und die Bilder anschließend mittels InLens Detektor aufgenommen. Die Parameter wurden dabei wie folgt gewählt: Hochspannung 5 kV, Aperturblende 30 μm , Arbeitsabstand (WX) 5,3 mm. Während der Aufnahme des Bildes wurden eine Pixelabtastrate von 7 und eine Verweilzeit von 10 ns gewählt.

4.5.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Das gemörserte und gesiebte Sol-Gel-Glas (Gewichtsverlust von 50 %) wurde trocken auf einem mit Kohlenstoff befilmten Kupfernetzchen präpariert. Die Messung erfolgte bei einer Beschleunigungsspannung von 100 kV.

4.5.3 BET-Analyse

Die Oberflächenbestimmung und Porengrößenverteilung der Sol-Gel-Glas-Proben wurde mittels Stickstoffadsorption/-desorption bei $-261\text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Die Probenvorbereitung wurde mittels Trocknung des entsprechenden Sol-Gel-Glases (*blank* oder mit eingekapselten γ -Globulin, Gewichtsverlust vor der Evakuierung 50 %) für 2 Stunden bei $25\text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt.

4.6 Durchführung der Immunfiltration-Sol-Gel-Glas-Experimente

Unabhängig von der Art des durchgeführten Immunfiltration-Sol-Gel-Glas-Experiments wurde die Säule zunächst in einer inhausgefertigten Halterung fixiert, auf RT equilibriert und das überschüssige PBS aus der Säule entfernt. Anschließend erfolgte die Konditionierung mit je zweimal 3 mL Probemedium ohne MC-LR pro 0,5 g Sol-Gel-Glas. Nach der Aufgabe des Toxins erfolgte der Waschschrift mit je zweimal 3 mL PBS pro 0,5 g Sol-Gel-Glas und ein Elutionsschritt (unterschiedlichen Volumina und ACN-Konzentrationen). Nach Beendigung des Experiments wurde die Säule mit mindestens 10 mL PBS pro 0,5 g Sol-Gel-Glas gewaschen und bis zur Wiederverwendung bei 4 °C in PBS gelagert.

4.6.1 Schrittweise MC-LR-Abreicherung

Für die Bestimmung der Durchbruchkurven wurden je 0,5 mg der Antikörper γ -Globulin aus Rinderserum (γ -Globulin), MC10E7 (GAM) und MC10E7H in jeweils 0,5 g Sol-Gel-Glas eingekapselt (Gewichtsverlust 50 %). Die *blank*-Säule enthielt lediglich 0,5 g Sol-Gel-Glas (Gewichtsverlust 50 %). MC-LR-Lösungen wurden jeweils in 10 % MeOH/dest. H₂O hergestellt (100 μ g/L für die *blank*-, γ -Globulin- und MC10E7-Säule, 50 μ g/L jeweils für die MC10E7H-Säulen), in 1 mL Schritten manuell auf die Säulen aufgegeben und anschließend die Pumpe mit einem Fluss von 0,5 mL/min gestartet. Die einzelnen Durchflüsse wurden fraktioniert in Glasgefäßen gesammelt und bis zur Bestimmung des Toxingehalts mittels ELISA bei 4 °C gelagert.

Tabelle 9: Zusammenfassung der Versuchsbedingungen für die Durchbruchbestimmung unterschiedlicher Säulentypen.

Versuch	Säulentyp	Anzahl an Fraktionen	Menge MC-LR pro Fraktion	Ergebnis in Abbildung
1	<i>Blank</i>	22	100 ng	55
1	γ -Globulin	22	100 ng	55
1	MC10E7	22	100 ng	55
1	MC10E7H	49	50 ng	55
2	MC10E7H	30	1. Fraktion 25 ng, 2.–30. Fraktion 50 ng	56

4.6.2 Abreicherung im kontinuierlich zyklischen Betrieb

Für die Abreicherung im kontinuierlich zyklischen Betrieb wurde der Auslass der Säule mit einem Verbindungsstück und Tygonschlauch versehen, welches die Rückführung des Säulendurchflusses in das Vorlagegefäß ermöglichte. Der schematische Versuchsaufbau ist Abbildung 28 zu entnehmen.

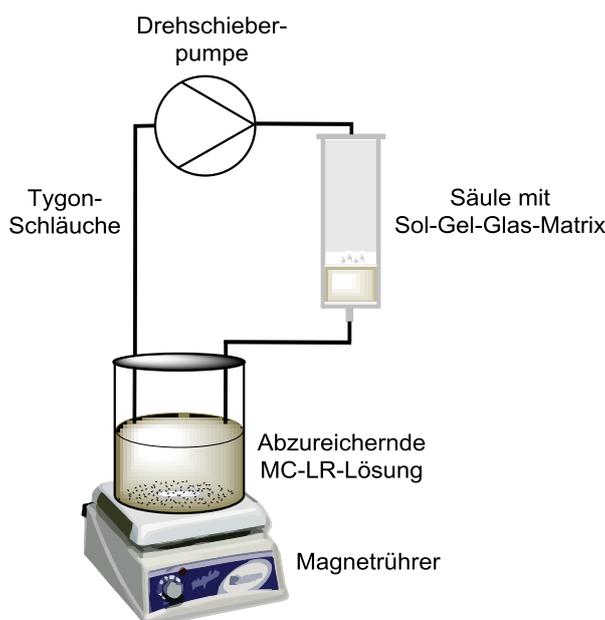


Abbildung 28: Schematischer Aufbau der Abreicherung im kontinuierlich zyklischen Betrieb.

Ein kontinuierlicher Fluss wurde durch den Einsatz einer Drehschieberpumpe mit einer Flussrate von 0,5 mL/min gewährleistet. Während des gesamten Abreicherungsprozesses über 18 bis 25 Stunden wurde die abzureichernde MC-LR-Lösung (in 10 % MeOH/dest. H₂O oder Oberflächenwasser) jeweils bei RT und 100 rpm gerührt, um die Homogenität zu gewährleisten. Das Vorlagegefäß war während des gesamten Abreicherungsprozesses verschlossen und wurde jeweils nur stündlich für die Entnahme eines 100- μ L-Aliquots geöffnet.

4.6.3 Abreicherung im Schwebebettverfahren

Für die Untersuchung der Abreicherungseffizienz im Schwebebettverfahren wurden je 2,5 mg des Antikörpers (MC10E7 (GAM), MC10E7H) in 2,5 g Sol-Gel-Glas (50 % Gewichtsverlust) eingekapselt, gemörsert, gesiebt und anschließend in einen Messkolben überführt. Die Abreicherung über 25 Stunden erfolgte aus 1 L eines filtrierten Oberflächenwassers (Windach), welches mit MC-LR (25 μ g/L) versetzt wurde. Die Probenahme von je 100- μ L-Aliquots erfolgte stündlich und die Lagerung anschließend bis zur Toxinquantifizierung bei 4 °C. Während des gesamten Abreicherungsprozesses wurde die Lösung bei RT und 100 rpm gerührt.

4.7 Auswertung der Messdaten

Die Menge an MC-LR, die an das Säulenmaterial gebunden hat ($m(MC - LR gebunden)$) wurde nach der Subtraktion der Mengen an MC-LR im Durchfluss ($m(Durchfluss)$) und Waschfraktionen ($m(Waschfraktion)$) von der Ausgangsmenge an MC-LR, die anfangs aufgegeben wurde ($m(aufgegeben)$), berechnet.

$$m(MC - LR gebunden) = m(aufgegeben) - m(Durchfluss) - m(Waschfraktion) \quad (9)$$

Die *Wiederfindung* bezog sich auf die Menge an MC-LR, die mittels Elutionsreagenz wieder von der Säule eluiert werden konnte ($m(MC - LR eluiert)$).

$$Wiederfindung = \frac{m(MC - LR eluiert)}{m(MC - LR gebunden)} \cdot 100 \% \quad (10)$$

Für die Bestimmung der *Abreicherungs-effizienz* wurde jeweils die Menge MC-LR im Ausgangsgefäß zum Zeitpunkt t ($m(MC - LR gebunden)$) mit der Menge zum Zeitpunkt t_0 ($m(MC - LR aufgegeben)$) ins prozentuale Verhältnis gesetzt.

$$Abreicherungs-effizienz = \frac{m(MC - LR gebunden)}{m(MC - LR aufgegeben)} \cdot 100 \% \quad (11)$$

Die *Bindungskapazität* einer Säule wurde prozentual berechnet, indem der Quotient aus der gebundene Menge an MC-LR ($m(MC - LR gebunden)$) und der theoretisch maximal mögliche Menge an gebundenem MC-LR ($m(MC - LR theoretisch)$) gebildet wurde.

$$Bindungskapazität = \frac{m(MC - LR gebunden)}{m(MC - LR theoretisch)} \cdot 100 \% \quad (12)$$

Die Grundlage für $m(MC - LR theoretisch)$ bildete die Annahme einer 100 %igen Zugänglichkeit und Funktionalität aller Paratope, unter Annahme eines bivalenten Bindungsverhaltens. Daraus ergab sich die nachfolgende Gleichung (13).

$$m(MC - LR theoretisch) = \frac{2 \cdot m(Ak)}{M(Ak)} \cdot M(MC - LR) \quad (13)$$

Exemplarisch könnten 0,5 mg des Antikörpers (Annahme: $M(Ak) = 150$ kDa) 6,63 µg MC-LR ($M(MC - LR) = 995$ Da) binden.

IV Ergebnisse und Diskussion

1 Entwicklung immunanalytischer Methoden

Die Entwicklung von immunanalytischen Methoden ist zum einen für die Charakterisierung der Antikörper-Antigen-Interaktion entscheidend, zum anderen bieten diese Verfahren die Möglichkeit, einer schnellen und kostengünstigen Quantifizierung von MC-LR ohne aufwändige Probenvorbereitung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden der indirekte ELISA und ein auf Goldnanopartikeln basierender kolorimetrischer Immunoassay etabliert.

1.1 Synthese des MC-LR-BSA-Konjugats

Für die Durchführung eines indirekten ELISAs und eines kolorimetrischen Immunoassays sind Hapten-Konjugate notwendig, um die Immobilisierung an die Oberfläche der MTP oder an Partikel zu gewährleisten. Proteine wie beispielsweise BSA oder OVA haben sich dafür bewährt. Wichtig hierbei ist, dass sich das Protein des Immunogens von dem des Konjugats unterscheidet, um mögliche Kreuzreaktivitäten zu vermeiden.

Für die Herstellung des hochaffinen mAk MC10E7 gegen MC-LR wurde für die Immunisierung der Versuchstiere (Mäuse) ein OVA-Immunogen verwendet (Zeck, 2001). Für die Immunoassays sollte daher ein anderes Trägerprotein verwendet werden. Die Kopplung von MC-LR an BSA wurde in einer dreistufigen Synthese nach einer modifizierten Vorschrift von Zeck et al. durchgeführt (siehe Abbildung 29) (Zeck, 2001). Zunächst wurde ein *linker* eingeführt, anschließend die Schutzgruppe abgespalten, um abschließend die entstandene freie Thiolgruppe bei basischem pH-Wert an den Michaelakzeptor von MC-LR zu binden.

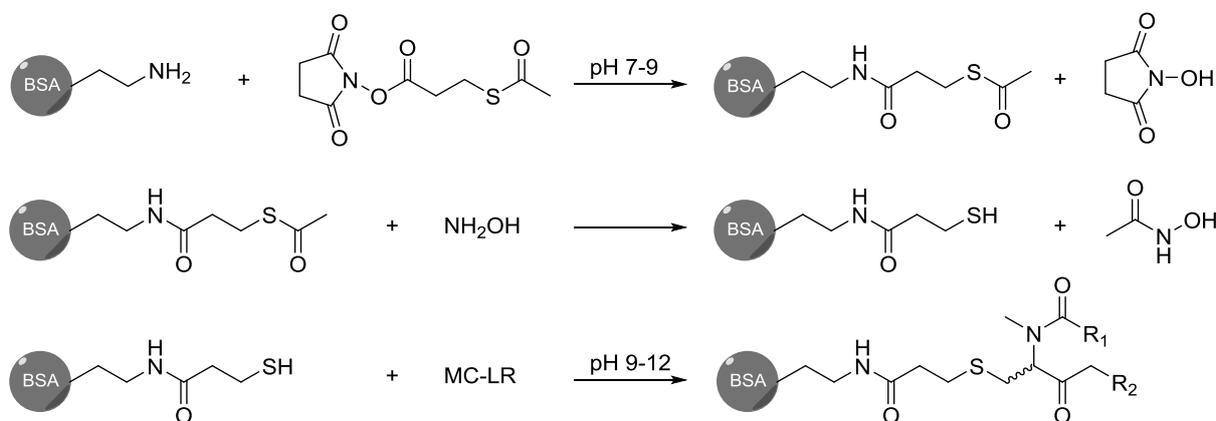


Abbildung 29: Dreistufige Synthese von MC-LR und BSA zu MC-LR-BSA.

Das Konjugat wurde mittels Dialyse gegen dest. H₂O gereinigt und anschließend lyophilisiert. Die Lagerung erfolgte in gefriergetrockneter Form bei -20°C . Für die Bestimmung der durch-

schnittlichen Kopplungsdichte des Haptens pro BSA-Molekül wurde die MALDI-MS herangezogen. Die erhaltenen Spektren sind in Abbildung 30 zusammengefasst.

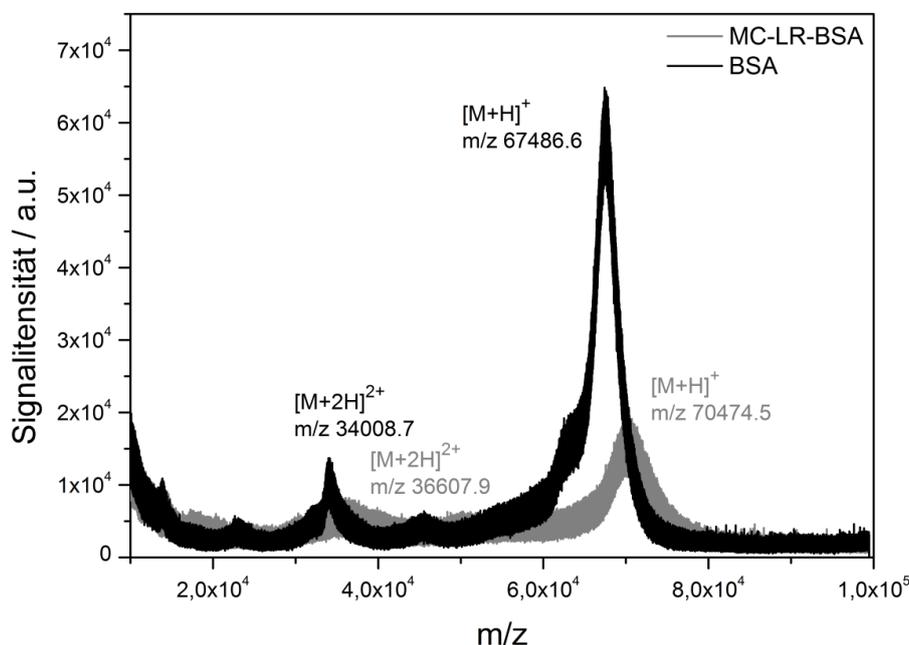


Abbildung 30: MALDI-MS-Spektren von BSA (schwarz) und MC-LR-BSA (grau) mit einer durchschnittlichen Kopplungsdichte von drei MC-LR-Molekülen pro BSA-Molekül.

Aus der Differenz der Massen von MC-LR-BSA (*coating*) und BSA von etwa 2988 m/z ergab sich eine durchschnittliche Kopplungsdichte von drei Molekülen MC-LR pro BSA-Molekül. Obwohl die Kopplungsdichte der Haptenmoleküle gering war, wurde auf eine Optimierung hinsichtlich des Syntheseprotokolls verzichtet, da die Funktionalität im ELISA ausreichend war. Bei einer Ansatzgröße von 3,19 mg BSA (47,3 nmol) konnten 2,06 mg (29,2 nmol) des *coatings* erhalten werden. Bezogen auf die Unterschusskomponente BSA entsprach dies einer Ausbeute von etwa 62 %.

1.2 Indirekt kompetitiver ELISA mit mAk MC10E7

Die Affinität eines Antikörpers kann anhand des IC_{50} -Wertes abgeschätzt werden. Um das Minimum dieses Wertes bei ausreichender Farbintensität (maximale Absorption etwa eins bei einer Färbezeit von 15 Minuten) und möglichst großem linearen Arbeitsbereich (20 % und 80 % der maximalen Absorption, LAB) zu generieren, wurden die *coating*-Konzentration und die jeweilige Antikörperkonzentration im indirekt kompetitiven ELISA sukzessive verdünnt (engl. *checkerboard titration*). Die Beschichtung der MTP erfolgte über Nacht bei 4 °C, um eine maximale Adsorption der *coating*-Moleküle an die Oberfläche zu gewährleisten. Für die

Blockierung freier Bindungsstellen wurde eine 1 %ige Casein-Lösung verwendet. Der anschließende einstündige Wettbewerbsschritt wurde vollzogen, indem MC-LR-Standards (je 100 μL) in 10 % MeOH/dest. H_2O in einem Konzentrationsbereich von 0,0001 $\mu\text{g/L}$ bis 100 $\mu\text{g/L}$ zugegeben wurden, gefolgt von der zügigen Addition der Antikörperlösung (je 100 μL). Die anschließende Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte durch einen mit HRP markierten anti-Maus-Antikörper (Konzentration in der Kavität: 200 ng/mL), der spezifisch den Fc-Teil des Antikörpers erkennt. Nach der Zugabe von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) erfolgte die Farbreaktion, die nach 15 minütiger Inkubation mit Schwefelsäure gestoppt wurde. Nach erfolgtem Farbumschlag von blau nach gelb erfolgte die Auslesung der Absorption bei 450 nm.

Die jeweils gereinigten MC10E7-Antikörperlösungen (GAM bzw. Protein G) wurden in Konzentrationsbereichen zwischen 100 ng/mL und 2,5 ng/mL für den GAM-gereinigten MC10E7 und zwischen 2 $\mu\text{g/mL}$ und 400 ng/mL für den mit Protein G gereinigten MC10E7, eingestellt. Die *coating*-Konzentration wurde im Bereich von 2 $\mu\text{g/mL}$ bis 14 ng/mL eingestellt. Für alle gewählten *coating*- und Antikörperkonzentrationen konnte jeweils ein zur Analytkonzentration invers proportionales Signal erhalten werden. Die Fehler wurden mittels einfachem Simplexverfahrens ermittelt ($\pm 1 \cdot s$). Ein Auszug daraus ist in Abbildung 31 dargestellt.

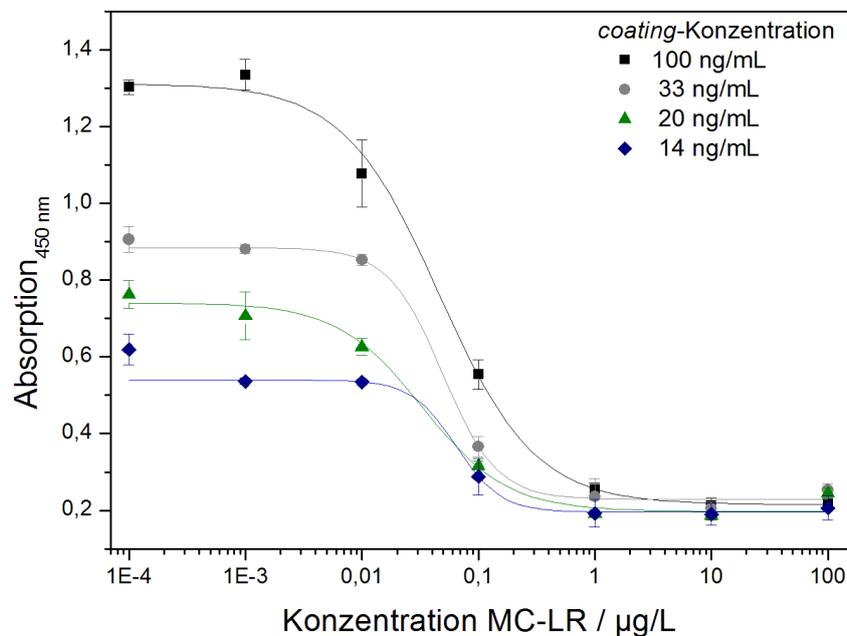


Abbildung 31: Optimierung der *coating*-Konzentration hinsichtlich der Erhöhung der Nachweisstärke und des LAB mit einer konstanten MC10E7-Konzentration (Protein G) von 1 $\mu\text{g/mL}$ (*Intraassay*, $n=7$, $m=3$).

Die auf einer MTP (*Intraassay*) bestimmten Kurvenparameter zeigten deutliche Unterschiede, vor allem in der maximalen Absorption, die mit zunehmender *coating*-Konzentration stieg.

Dies ist darin begründet, dass mit zunehmender *coating*-Konzentration mehr von dem in Lösung vorliegenden Antikörper, bei niedrigen MC-LR-Konzentrationen, an das immobilisierte *coating* bindet. Für den mittels Protein G gereinigten MC10E7 ergab sich der niedrigste IC₅₀-Wert von 33±6 ng/L bei einer *coating*-Konzentration von 20 ng/mL und einer Antikörperkonzentration von 1 µg/mL. Der LAB lag zwischen 10 ng/L und 106 ng/L. Nach weiteren Experimenten mit anderen *coating*-Konzentrationen konnte ein Kompromiss aus ausreichender Nachweisstärke und möglichst großem LAB bei einer *coating*-Konzentration von 50 ng/mL ermittelt werden (IC₅₀-Wert von 43±11 ng/L und LAB von 18–159 ng/L).

Im Vergleich zu den ELISA-Ergebnissen mit MC10E7 (Protein G) wurde bei Verwendung von MC10E7 (GAM) nur eine Antikörperkonzentration von 5 ng/mL benötigt, um einen IC₅₀-Wert von 46±3 ng/L zu erhalten (*coating*-Konzentration: 50 ng/mL). Der Arbeitsbereich lag zwischen 14 ng/L und 155 ng/L mit einem LOD-Wert von 2,7 ng/L.

Diese große Diskrepanz zwischen den für den ELISA benötigten Antikörperkonzentrationen (GAM bzw. Protein G) lässt sich durch den Herstellungsprozess und die anschließende Antikörper-Aufreinigung erklären. Bei der Produktion von mAk mittels Hybridomazellen wird meist fötales Kälberserum zum Nährmedium zugesetzt, wobei die Menge für den Erhalt optimaler Wachstumsbedingungen variieren kann. Die optimalen Wachstumsbedingungen müssen für das entsprechende Hybridom optimiert werden, damit dieses mit genügend Nährstoffen versorgt wird. Nur dann ist eine hohe Produktionsrate an Antikörpern möglich. Bei der Produktion von MC10E7 musste ein hoher Zusatz dieses Mediums erfolgen, um eine nachweisbare Menge an spezifischen Antikörper zu gewinnen. Die anschließende Aufreinigung erfolgte mittels Protein G. Für das Bindungsverhalten ergibt sich sowohl für den spezifischen Maus-IgG, als auch für die im fötalen Kälberserum vorkommenden unspezifischen Rinder-IgGs eine hohe Affinität. Eine mögliche Erklärung für die relativ hohen benötigten Konzentration des mittels Protein G aufgereinigten MC10E7 im ELISA könnte somit eine nach dem Aufreinigungsprozess niedrige Konzentration des murinen Antikörpers in der Antikörperfraktion sein. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden 10 mg des Protein G gereinigten MC10E7 von der Firma Squarix mittels GAM aufgereinigt. Die selektive Bindung an den Ziege-anti-Maus-Antikörper lässt nur die Bindung des murinen Antikörpers an das Säulenmaterial zu. In der Elutionsfraktion entsprachen nur etwa 0,7 % von anfangs aufgegebenen 10 mg dem spezifischen Maus-Antikörper, der Rest war eine Rinder-IgG Fraktion (Daten von Squarix Biotechnology, 2014). Dies bestätigt die Vermutung der nur in geringen Mengen vorhandenen murinen Antikörper in den Elutionsfraktionen, und erklärt zudem die benötigten höheren Konzentrationen des Protein G aufgereinigten MC10E7 im ELISA.

1.3 Entwicklung eines kolorimetrischen Immunoassays

Neben dem heterogenen Immunoassay, dem ELISA, wurde alternativ ein weiterer Immunoassay entwickelt, um ein noch schnelleres und kostengünstiges Nachweisverfahren für MC-LR zu etablieren. Dieser Immunoassay beruht auf der Konkurrenz zwischen freiem MC-LR und dem an magnetische Partikel als *coating* immobilisierten Toxin um die limitierten Paratope von MC10E7 (GAM). Die Antikörper sind bei diesem Immunoassayformat an GNPs immobilisiert. Nach der magnetischen Separierung des Immunkomplexes wird der Überstand, in dem sich Ak-GNPs-MC-LR befinden, direkt zu der vorgelegten Goldwachstumslösung gegeben. Der Mechanismus der Vergrößerung der GNPs wurde kürzlich durch Wang et al. postuliert. In dieser Veröffentlichung konnte so die Nachweisgrenze von Aflatoxin B1 nach Anwendung des Goldwachstumsprozesses von 12 ng/L (linearer Arbeitsbereich: 20 ng/L bis 800 ng/L) auf 7 ng/L (linearer Arbeitsbereich: 10 ng/L bis 1000 ng/L) verbessert werden (Wang, 2014; Wang, 2015).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Absorption direkt nach dem Goldwachstumsprozess ausgelesen. Diese korreliert direkt mit der Menge an in Lösung befindlichen GNPs, die wiederum direkt mit der Menge in Lösung befindlichen MC-LR skaliert.

1.3.1 Optimierung der Probenvorbereitung

Für die ersten Experimente wurden MC-LR-Kalibrierstandards in dest. H₂O hergestellt. Nach dem Konkurrenzschritt, gefolgt von der magnetischen Separation, konnte der erwartete Absorptionsunterschied zwischen 0 µg/L und 100 µg/L MC-LR nicht beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung ist die von Burns et al. gemachte Beobachtung, dass ein gewisser Salzgehalt (Ionenstärke) in der zu untersuchenden Lösung notwendig ist (Burns, 2006). Diese spielt eine entscheidende Rolle für die Ladung der GNPs und damit deren Annäherungsmöglichkeiten an die magnetischen *coating*-Partikel. Ferner kommt es bei einem pH-Wert >7, bei dem sowohl die *coating*-Partikel als auch die Ak-GNPs negativ geladen sind, zu einer elektrostatischen Abstoßung. Experimente, die von Yu et al. und Zabetakis et al. durchgeführt wurden, zeigen, dass sich Phosphatpuffer am besten für die Immunreaktion eignet, weil er zudem optimale pH-Bedingungen liefert (Yu, 2011; Zabetakis, 2012). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden Experimente durchgeführt, bei denen jeweils 0 µg/L und 100 µg/L MC-LR in Phosphatpuffer hergestellt wurden (Bereich von 0 mM bis 200 mM, pH 7,4) und anschließend nach dem Goldwachstumsschritt die entsprechende Absorptionsdifferenz gegen die PBS-Konzentration aufgetragen wurde (Abbildung 32).

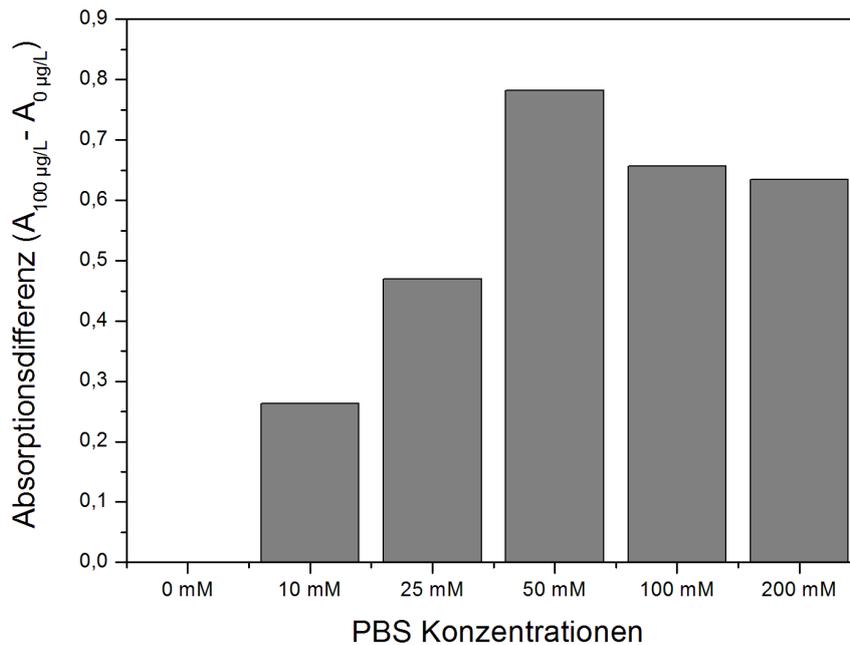


Abbildung 32: Korrelation von Salzgehalt und der Absorptionsdifferenz (zwischen 0 $\mu\text{g/L}$ und 100 $\mu\text{g/L}$ MC-LR) nach dem Kompetitionsschritt ($m=1$, $n=6$).

Eine Erhöhung des Salzgehaltes führte bis zu 50 mM PBS zu einer Erhöhung der Absorptionsdifferenz ($A_{100 \mu\text{g/L}} - A_{0 \mu\text{g/L}}$). Bei höheren Salzkonzentrationen von 100 mM und 200 mM war ein gegenteiliger Effekt feststellbar. Die Absorptionsdifferenz könnte beispielsweise aufgrund von sich ablösenden Antikörpern von der Oberfläche der GNPs sinken. Weniger Antikörper an der Oberfläche führen aufgrund fehlender Bindungsstellen zu schlechteren Nachweisstärken.

In Oberflächenwasser wird die Ionenstärke durch Anwesenheit von chaotropen Ionen wie beispielsweise Ca^{2+} oder Mg^{2+} gewährleistet. Allerdings zeigte sich, dass eine Quantifizierung einer mit MC-LR versetzten Oberflächenwasserprobe (1 $\mu\text{g/L}$) nicht möglich war. Die sogenannte Hofmeisterreihe, die eine Klassifizierung für Fällungsstärken von Salzen angibt, beschreibt, dass Ca^{2+} und Mg^{2+} die ausgeprägte Fähigkeit besitzen, mit dem Peptidrückgrat durch die Beeinflussung des Carbonylsauerstoffs oder den Amidgruppen wechselzuwirken. Dadurch kann oft die Sekundär- und Tertiärstruktur eines Antikörpers beeinflusst werden, sodass keine Bindung an das Antigen mehr stattfinden kann (Jungwirth, 2014). Um die möglicherweise störenden chaotropen Ionen zu entfernen, wurde vor Zugabe der Ak-GNPs Ethylendiamintetraacetat (EDTA) in einer finalen Konzentration von 10 mM zur Komplexbildung hinzugegeben. Nach dem Inkubationsschritt und der magnetischen Separierung waren mit bloßem Auge keine GNPs im Überstand sichtbar. Eine mögliche Erklärung könnte die negative Beeinflussung des kolorimetrischen Immunoassays durch weitere Bestandteile des Oberflächengewässers sein. Organische Substanzen, wie beispielsweise Huminsäuren und Fulvinsäuren

können an vereinzelte biofunktionalisierte GNPs und an teilweise entstehende Aggregate binden. Dies kann letzten Endes zu einer unspezifischen Adsorption an die magnetischen Partikel führen und zu einer ungewollten Entfernung durch die magnetische Separation.

Diese Ergebnisse führten zu der Erkenntnis, dass eine Probenvorbereitung für die Verwendung dieser Immunoassays unvermeidbar ist, um vermeintliche Störsubstanzen (siehe Tabelle 10) zu eliminieren.

Tabelle 10: Zusammenfassung der Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und DOC-Konzentration und der Leitfähigkeit (σ) in den vier verwendeten Oberflächenwasserproben.

Probe	Ca^{2+} / mg/L	Mg^{2+} / mg/L	DOC / mg/L	σ / $\mu\text{S/cm}$
Starnberger See	$39,8 \pm 0,2$	$15,7 \pm 0,1$	$4,63 \pm 0,2$	$317,0 \pm 0,0$
Ammersee	$54,4 \pm 0,2$	$17,7 \pm 0,1$	$5,07 \pm 0,1$	$484,0 \pm 0,0$
Isar	$54,8 \pm 0,1$	$15,8 \pm 0,0$	$2,53 \pm 0,1$	$378,0 \pm 0,0$
Windach	$93,9 \pm 0,2$	$25,7 \pm 0,1$	$7,57 \pm 0,1$	$590,0 \pm 0,0$

Die SPE von MCs mittels C_{18} -Phasen stellte dabei eine geeignete Möglichkeit dar (siehe Punkt 2.2 in Kapitel III). Hierfür wurden 50 mL der jeweiligen Realprobe mit MC-LR versetzt ($1 \mu\text{g/L}$), über die konditionierte SPE-Säule geleitet, jeweils mit 7 mL 5 % MeOH/dest. H_2O gewaschen und anschließend mit 7 mL reinem MeOH eluiert. Das MeOH wurde unter einem N_2 -Strom verdampft und der Rückstand anschließend in 50 % MeOH/ dest. H_2O aufgenommen.

1.3.2 Wiederfindung in Realproben

Die MC-LR-Wiederfindungen nach der SPE wurden mittels HPLC-MS bestimmt und lagen zwischen 77,4 % und 89,9 % mit Standardabweichungen ($\pm 1 \cdot s$) zwischen 0,3 % und 1 %. Für die Bestimmung der Toxinkonzentration mittels des kolorimetrischen Immunoassays wurden zunächst Kalibrierlösungen in 50 mM PBS (pH 7,4) im Bereich von $0 \mu\text{g/L}$ bis $100 \mu\text{g/L}$ hergestellt. Die erhaltenen Absorptionsspektren nach dem Wettbewerbsschritt und zehninütiger Wachstumsreaktion sind in Abbildung 33 dargestellt.

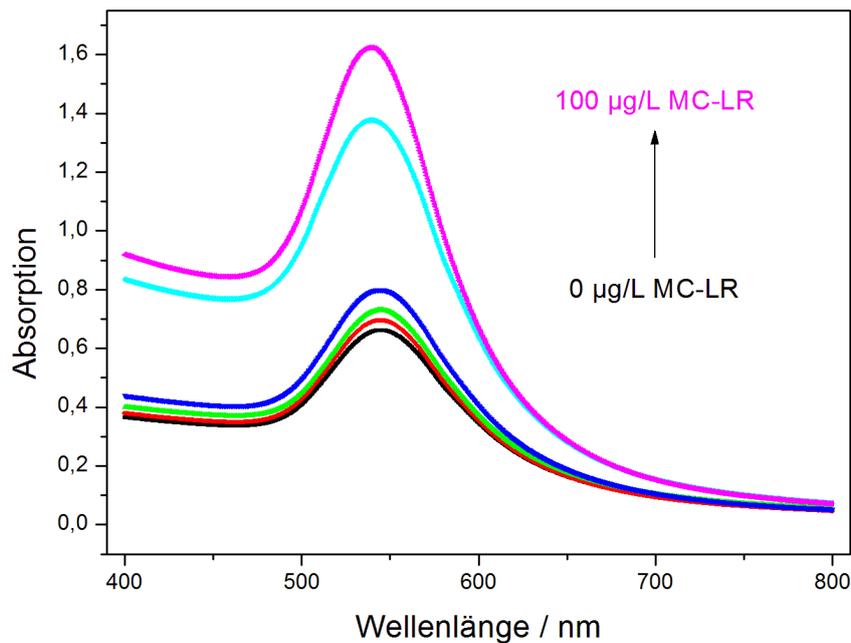


Abbildung 33: UV/Vis Absorptionsspektrum des Überstands nach dem Wettbewerbsschritt und zehnmütiger Wachstumsphase ($m=1$, $n=6$). Schwarz: 0, Rot: 0,01, Grün: 0,1, Blau: 1, Cyan: 10, Magenta: 100 $\mu\text{g/L}$ MC-LR.

Mit Erhöhung der Toxinkonzentration in Lösung stieg das Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 565 nm. Auch eine Blauverschiebung war zu erkennen, was durch ein geringeres Wachstum der Ak-GNPs in Anwesenheit von höheren Immunogoldkonzentrationen erklärt werden konnte. In Abbildung 34 sind die auf die Absorption bei der Konzentration 0 $\mu\text{g/L}$ (B_0) normierten Werte gegen die halblogarithmische MC-LR-Konzentration aufgetragen. Es wurde eine zur Analytkonzentration proportionale sigmoidale Kurve erhalten.

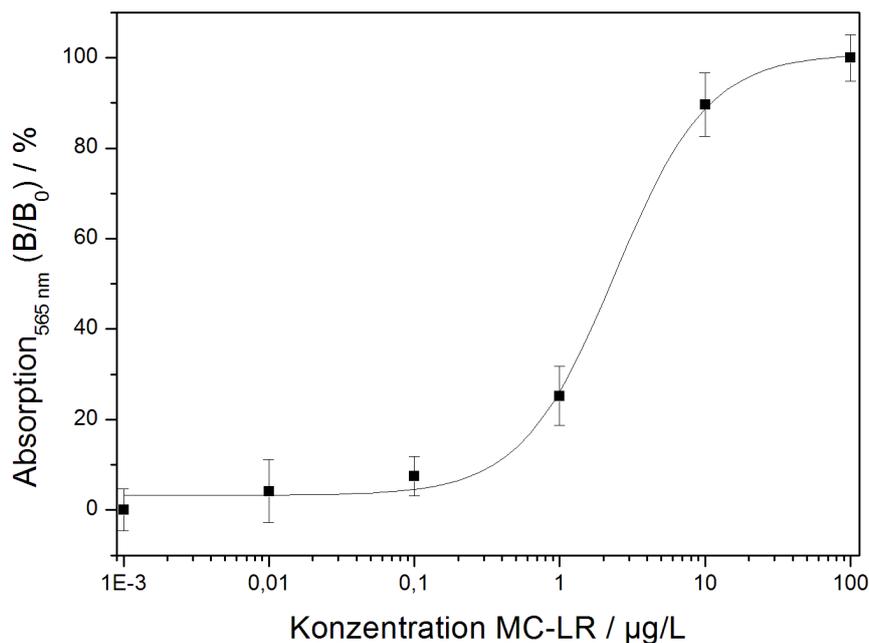


Abbildung 34: Kalibrierkurve aus den normierten Absorptionswerten bei 565 nm ($m=3$, $n=6$).

Der lineare Arbeitsbereich wurde zwischen 10 % und 90 % der maximalen Absorption gewählt und liegt zwischen 0,51 µg/L und 11,63 µg/L. Der IC₅₀-Wert, lag bei 2,43 ± 0,75 µg/L. Der LOD-Wert berechnete sich zu 0,38 µg/L basierend auf einem Signal/Rauschen-Verhältnis von drei. Die relativen Standardabweichungen betragen für die einzelnen MC-LR-Konzentrationen zwischen 2,5 % und 6,6 %. Um die Anwendbarkeit des kolorimetrischen Immunoassays zu testen, wurden vier Oberflächenwasserproben (Starnberger See, Ammersee, Isar und Windach) nach der Festphasenextraktion 1:60 in 50 mM PBS (pH 7,4) verdünnt und anschließend quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Zusammenfassung der Wiederfindungen von MC-LR mittels des kolorimetrischen Immunoassays aus Oberflächengewässern.

Probe	SPE/MS^a / µg/L	Immunoassay^b / µg/L	Wiederfindung in %
Starnberger See	42,34 ± 0,26	0,65 ± 0,01	92,4 ± 0,4
Ammersee	43,62 ± 0,42	0,85 ± 0,05	117,5 ± 4,6
Isar	44,94 ± 0,52	0,67 ± 0,03	88,8 ± 3,2
Windach	38,71 ± 0,51	0,66 ± 0,05	102,8 ± 5,6

^aunverdünnte Probe, ^b60-fach verdünnte Probe

Mit Wiederfindungen im Bereich zwischen 88,8 % und 117,5 % und einer Analysenzeit von etwa drei Stunden ist der kolorimetrische Immunoassay eine akzeptable Methode. Im Vergleich zum etablierten indirekt kompetitiven ELISA ist die Nachweisstärke mit einem IC₅₀-Wert von 2,42 µg/L zwar um Faktor 55 schlechter, allerdings ist die Nachweisstärke für zahlreiche Anwendungen ausreichend. Der kolorimetrische Immunoassay deckt mit seinem linearen Arbeitsbereich zwischen 0,5 µg/L und 11,6 µg/L den von der WHO angestrebten Grenzwert für Trinkwasser von 1 µg/L ab. Nachteilig an dieser Methode sind allerdings die erforderliche Probenaufbereitung mittels SPE und die Bereitstellung stabiler, reproduzierbarer und funktionalisierter Partikel.

2 Herstellung rekombinanter Antikörper in *Nicotiana* und *P. pastoris*

Die Herstellung der rekombinanten anti-MC-LR-Antikörper in *Nicotiana* und *P. pastoris* wurde von Herrn Stanislav Melnik von der Universität für Bodenkultur in Wien (BoKu) unter Anleitung von Prof. Dr. Eva Stöger durchgeführt. Einige der erhaltenen Teilergebnisse sollen im Folgenden aufgezeigt werden.

2.1 Sequenzierung von MC10E7

Grundlage für die Herstellung des rekombinant in Pflanzen produzierten Antikörpers gegen MC-LR stellte der in einer vorangegangenen Arbeit am IWC hergestellte murine MC10E7 dar (Zeck, 2001). Dieser wurde im Bereich der variablen Domäne sequenziert. Hierfür wurde die cDNA mittels RT-RACE-PCR (engl. *RT-rapid amplification of cDNA-ends-PCR*) aus der mRNA von MC10E7 (GAM) hergestellt. Nach einer gelchromatographischen Aufreinigung wurde die cDNA in einen Vektor (pJET1.2) kloniert und in *E. coli* exprimiert. Anschließend wurden fünf unabhängige Klone sequenziert und mittels Peptidmassenfingerprint-MALDI-TOF auf übereinstimmende Aminosäuresequenzen hin untersucht.

Die für die variable Region des Antikörper kodierenden DNA-Abschnitte wurden anschließend in den entsprechenden Expressionsvektor (*Nicotiana* oder *P. pastoris*) kloniert.

2.2 Herstellung von *Plantibodies* in *Nicotiana*

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete *Plantibody* MC10E7H wurde als Konstrukt mit einem humanen IgG₁Fc-Fusionsprotein (*hinge*-Region plus CH₁ bis CH₃) kloniert. Hierfür wurde ein binäres Vektorsystem, basierend auf dem *A. tumefaciens* Transformationssystem (GV3101::pMP90RK) verwendet. GV3101 entspricht dabei dem Agrobakterienstamm und pMP90RK dem Helfer-Plasmid, welches bereits in der Bakterienzelle vorliegt. Für die Transformation der Antikörper-kodierenden DNA in *A. tumefaciens* wurde jeweils ein Pflanzenexpressionsvektor (pTRAkt) für V_H und einer für V_L verwendet (siehe Abbildung 35). Erfolgreich transformierte Bakterienstämme wurden durch das Auftreten von Antibiotikaresistenzen auf Agarplatten identifiziert. Zudem gab es weitere *A. tumefaciens*-Bakterien, in die ein 35S::P19 Konstrukt transformiert wurde. Dieses Gen sorgt für die Ausschaltung einer verminderten Genexpression und stammt ursprünglich aus dem Tomatenzwergbuschvirus (engl. *tomato bushy stunt virus*, TBSV). Die erfolgreich mit jeweils einem Vektor bzw. dem

35S::P19 transformierten Bakterien wurden in YEB-Medium kultiviert, abzentrifugiert und die Zellpellets jeweils in zwei weiteren Medien (1. Medium: 50 mM 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure pH 5,6, 2 mM Na₃PO₄, 0,5 % Glucose und 100 µM Acetosyringon, 2. Medium: Vitamine und ohne Saccharose) inkubiert. Die finale *A. tumefaciens*-Suspension (Optische Dichte bei 600 nm lag bei 0,4) beinhaltete alle drei transformierten *A. tumefaciens*-Stämme (HC, LC, P19) in einem Verhältnis von 2:2:1.

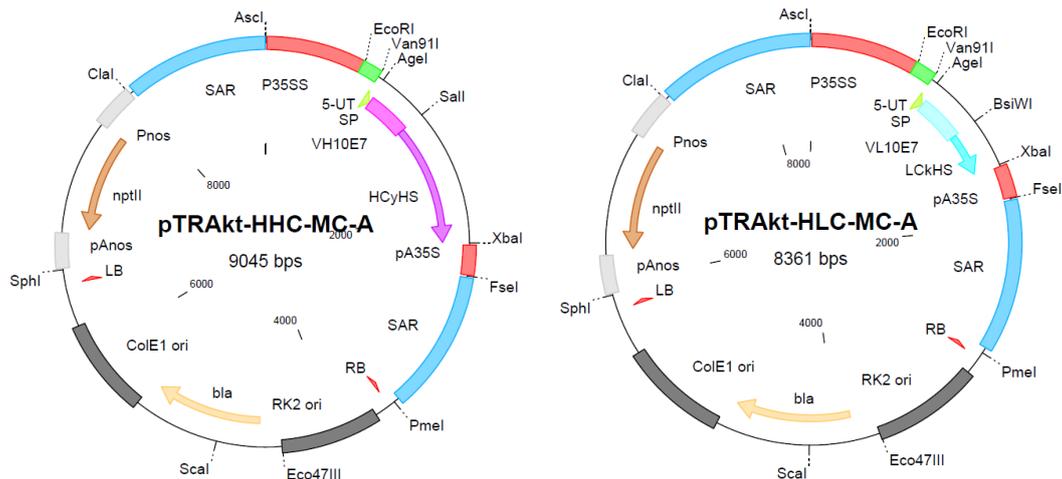


Abbildung 35: Vektoren die für die transiente Expression von MC10E7H verwendet wurden. Links: Vektor für die schwere Kette (pTRakt-**H**umanized-**H**eavy-Chain-anti-**M**icroCystin-**A**poplactic), Rechts: Vektor für die leichte Kette (pTRakt-**H**umanized-**L**ight-Chain-anti-**M**icroCystin-**A**poplactic). Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. E. Stöger und S. Melnik.

Die Suspension wurde in die abaxiale Seite der *Nicotiana*-Blätter (*N. tabacum* bzw. *N. benthamiana*) vakuumfiltriert oder händisch mittels Spritze eingebracht. Anschließend erfolgte eine 7-tägige Aufzucht der Pflanzen und Ernte der infiltrierten Tabakblätter. Die transformierten Blätter wurden in flüssigem N₂ eingefroren und mittels Mörser zerkleinert. Nach der Extraktion mittels Extraktionspuffer (PBS pH 7,4, 5 mM EDTA, 0,2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF) und Behandlung im Ultraschallbad (dreimal je 15 Sekunden auf Eis) wurde das Homogenat für eine Stunde bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Nicht benötigte Zellbestandteile wurden mittels Zentrifugation (9000 g für 20 min, 4 °C) entfernt. Der Überstand wurde langsam mit 0,5 M NaOH auf pH-Wert 8,0 eingestellt, für 30 min bei 4 °C gerührt und ausgefallene Proteine abzentrifugiert. Um MC10E7H (Protein G) zu erhalten, wurde der Überstand mittels *Protein G Sepharose 4 Fast Flow Beads* (GE Healthcare) aufgereinigt. Die Elution erfolgte dabei mittels Glycin (0,1 M in dest. H₂O, pH 3,0) und die direkte Neutralisierung in den einzelnen Fraktionen mittels *Tris-base* (1,0 M in dest. H₂O). Wurde hingegen nur das MC10E7H-Zellpellet benötigt, so folgte nach der Einstellung des basischen pH-Werts mit

NaOH eine Proteinfällung mittels Ammoniumsulfat. Hierzu wurde $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ langsam unter Rühren zum Überstand hinzugegeben ($4\text{ }^\circ\text{C}$) bis eine 45 %ige Sättigung erreicht wurde. Nach einer Inkubation über Nacht, Abzentrifugieren und anschließendem Waschschritt erhält man das MC10E7H-Zellpellet.

Die Reinheitskontrolle der exprimierten chimären *Plantibodies* MC10E7H (Protein G gereinigt) erfolgte mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen und anschließender Coomassie Brilliantblau-R-250-Färbung. Als Referenz zur Bestimmung des relativen Molekulargewichts der aufgetrennten Probe wurde ein Standardproteingemisch aufgetragen (siehe Abbildung 36 rechts).

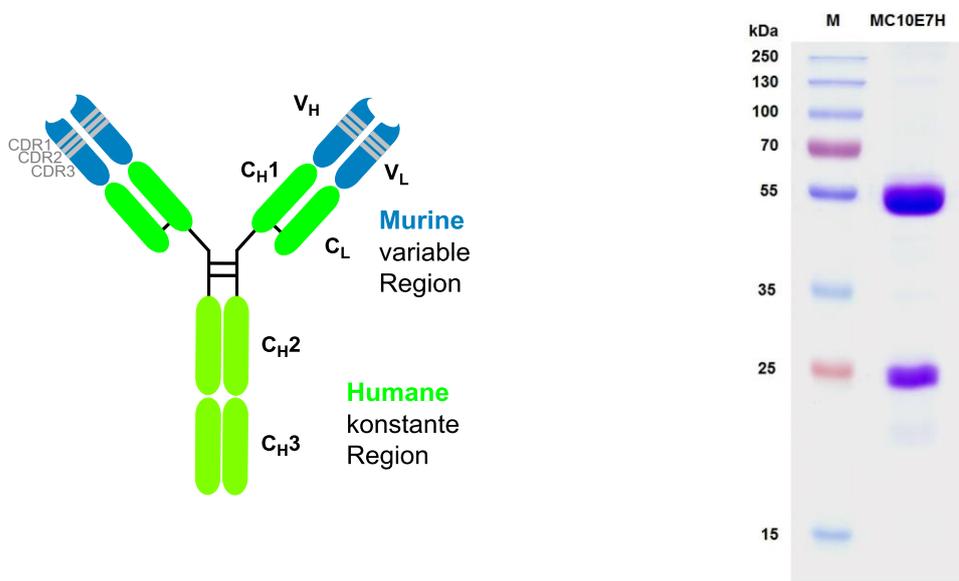


Abbildung 36: Links: Schematische Abbildung des chimären MC10E7H. Rechts: SDS-PAGE des Protein G aufgereinigten MC10E7H (5 µg) unter reduzierenden Bedingungen. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. E. Stöger und S. Melnik.

Unter reduzierenden Bedingungen mittels Dithiothreitol wurden die Disulfidbrücken gespalten und es resultierten die schweren Ketten mit einem Molekulargewicht von je etwa 50 kDa und die leichten Ketten mit etwa je 25 kDa.

Die funktionalen *Plantibodies* wurden sowohl in *N. tabacum* als auch in *N. benthamiana* produziert. Für *N. tabacum* ergaben sich Ausbeuten von 68 ± 41 mg Antikörper pro Kilogramm des frischen Blattmaterials. Hingegen konnte für die Herstellung in *N. benthamiana* mit 291 ± 36 mg die gut vierfache Antikörpermenge pro Kilogramm des frischen Blattmaterials erhalten werden. Vergleicht man diese Ergebnisse mit Resultaten ähnlicher *Plantibody*-Expressionssysteme, so zeigen diese eine sehr gute Übereinstimmung mit den in der Literatur bekannten höchsten Ausbeuten. Beispielsweise dokumentierten Giritch et al. die Produktion eines Vollängenantikörpers (humaner mAk A5) in *N. benthamiana* in Ausbeuten von

0,5 g/kg (Giritch, 2006). Das große Potential von Pflanzen als alternative Antikörperproduktionsstätte zeigt sich beim direkten Vergleich mit den Ausbeuten von murinen Antikörpern, die durch Hybridomazellkultur erhalten wurden. So wurden bei der Produktion von MC10E7 (GAM) über eine Zellkultur lediglich 16 mg Antikörper pro Liter Kulturmedium erhalten (Herstellerangaben, Squarix Biotechnology, Marl).

2.3 Herstellung von scFvs in *P. pastoris*

Zusätzlich zu den rekombinant in *Nicotiana* hergestellten Antikörpern wurden zwei scFv-Fragmente (MCscFv2 und MCscFv2EL) rekombinant in *P. pastoris* produziert. Beide scFvs bestanden aus V_H und V_L von MC10E7 und unterschieden sich lediglich durch die Länge der Aminosäuresequenz, die der V_H - V_L -Verknüpfung diente (engl. *linker*). Die Aminosäuresequenz des *linkers* bei MCscFv2 betrug viermal Gycin, gefolgt von einmal Serin mit insgesamt drei Wiederholungen (G4S)₃. MCscFv2EL besaß einen erweiterten *linker* (engl. *extended linker*), der aus insgesamt vier Wiederholungen bestand (G4S)₄. Zudem wurden beiden scFvs die Erkennungssequenzen 6x His-Tag und cMyc kloniert. Für die Herstellung beider scFvs wurde der Proteinexpressionsvektor pPICZα (siehe Abbildung 37 links) verwendet, der mittels Elektroporation in linearer Form in den *P. pastoris*-Stamm X-33 transformiert wurde. Nach einer Aufreinigung mittels Immobilisierte-Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (Ni²⁺-IMAC) wurden die scFvs gelelektrophoretisch auf ihre Reinheit überprüft (siehe Abbildung 37 rechts).

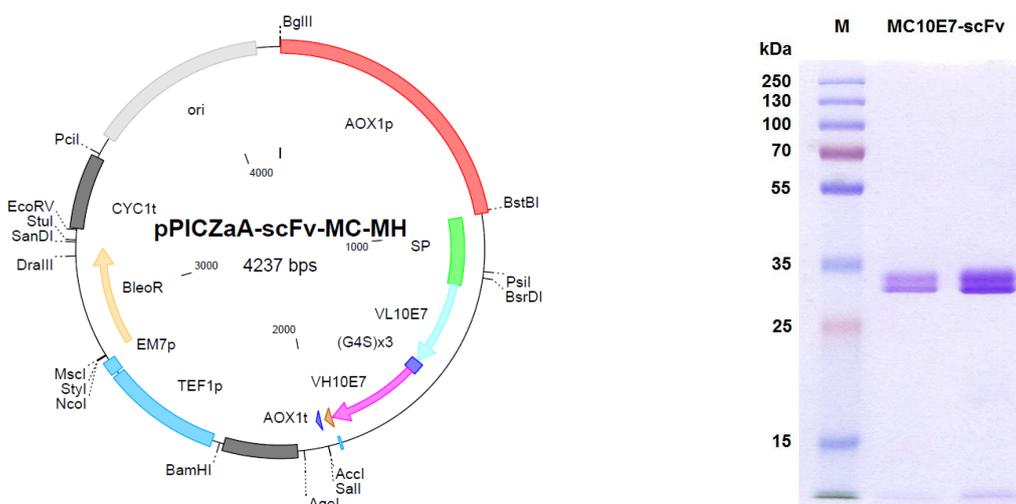


Abbildung 37: Links: Expressionsvektor für die stabile Transformation von *P. pastoris*, um anti-MC-LR-scFvs zu exprimieren. Rechts: SDS-PAGE des aufgereinigten MCscFv2 aus *P. pastoris* (1,5 µg und 3 µg Protein). Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. E. Stöger und S. Melnik.

Die Ergebnisse der Gelelektrophorese zeigten, dass die Herstellung der scFvs erfolgreich war, da zwei starke Banden auftraten. Die Bande bei etwa 30 kDa entsprach dem reinen MCscFv2. Hingegen deutete die zweite Bande, bei etwa 33 kDa darauf hin, dass es zu keiner vollständigen Abspaltung des Signalpeptids (α -Faktor) kam.

Die funktionellen scFv-Fragmente wurden in Ausbeuten von etwa 4 mg des löslichen scFvs pro Liter des Mediums erhalten. Zum Zeitpunkt der Entnahme waren 36 g der Hefezellen im Medium enthalten.

3 Charakterisierung der rekombinanten Antikörper

Die Grundlage für hohe Abreicherungseffizienzen bei der Immunofiltration bilden hochaffine, stabile und sehr selektive Antikörper. Hinsichtlich dieser Eigenschaften wurden sowohl der rekombinante in *Nicotiana* hergestellte MC10E7H, als auch die zwei in *P. pastoris* produzierten scFvs mit dem murinen MC10E7 verglichen. Dabei kamen der indirekt kompetitive ELISA, die SPR und die ITC zum Einsatz.

3.1 Charakterisierung von MC10E7H aus *N. tabacum*

Zu Beginn der *Plantibody*-Herstellung wurde *N. tabacum* als Produktionssystem verwendet. Da *N. benthamiana* allerdings höhere Antikörperausbeuten lieferte, wurde im Verlauf des Projekts auf dieses Produktionssystem umgestellt. Beide *Nicotiana*-Arten vereint der gleiche Sekretionsweg in den Apoplasten der Pflanzenzelle. Somit sind die gleichen pflanzenspezifischen komplexen N-Glykosylierungen zu erwarten. Kleine Unterschiede könnten sich lediglich im Verhältnis der Glykoformen ergeben. Demzufolge wurde kein unterschiedliches Bindungsverhalten der in *N. tabacum* und *N. benthamiana* produzierten *Plantibodies* erwartet. Alle Experimente bezüglich der Charakterisierung von MC10E7H wurden stets mit dem nach einer Protein G-Aufreinigung erhaltenen *Plantibody* durchgeführt.

3.1.1 Affinitätsbestimmung mittels ELISA

Für die Optimierung der ELISA-Konditionen für MC10E7H wurde wie bereits für MC10E7 (Protein G) unter Punkt 1.2 in Kapitel IV beschrieben, vorgegangen. Es erfolgte eine sukzessive Verringerung der Antikörper- und der *coating*-Konzentrationen bis der niedrigste IC₅₀-Wert und ein weiter LAB ermittelt wurden. Anstelle eines HRP-markierten anti-Maus-Antikörpers wurde allerdings ein entsprechend markierter anti-Human-Antikörper als Sekundärantikörper verwendet. In Abbildung 38 sind für beide Antikörper charakteristische sigmoidale Kalibrierkurven dargestellt.

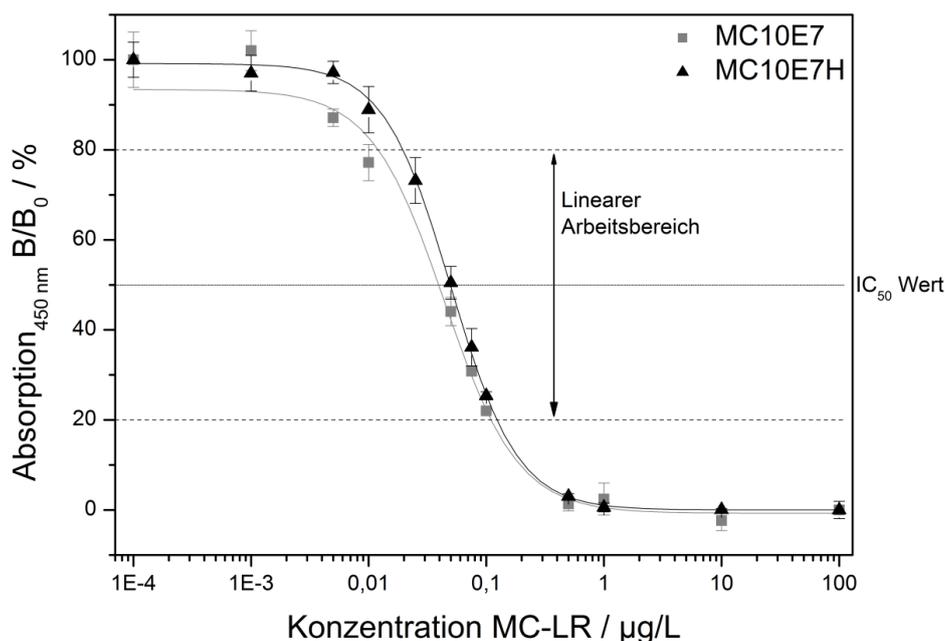


Abbildung 38: Kalibrierkurven für MC10E7 (GAM) und MC10E7H unter optimierten ELISA-Bedingungen (*coating*-Konzentration jeweils 50 ng/mL und Antikörper-Konzentration jeweils 5 ng/mL; n = 11 für MC10E7 und n = 12 für MC10E7H, m = 3).

Beim Vergleich der beiden Antikörper zeigte der rekombinant in *N. tabacum* hergestellte Antikörper MC10E7H mit einem IC_{50} -Wert von $50,0 \pm 3$ ng/L eine ähnlich gute Nachweisstärke im indirekten ELISA-Format wie MC10E7, bei gleicher *coating*- und Antikörperkonzentration. Auch der LAB im Bereich von 20 % und 80 % der maximalen Absorption (Tabelle 12) zeigte mit 20,2–123,8 ng/L eine hohe Übereinstimmung.

Tabelle 12: Zusammenfassung der ELISA-Parameter für optimale IC_{50} , LAB, LOD und LOQ-Werte (*Intraassay*-Studie).

Antikörper	IC_{50} / ng/L	LAB / ng/L	LOD / ng/L	LOQ / ng/L	<i>coating</i> - Konz. / ng/mL	Antikörper- Konz. / ng/mL
MC10E7	$44,0 \pm 4$	16,2–119,6	10,9	42,0	50	5
MC10E7H	$50,0 \pm 3$	20,2–123,8	12,5	32,3	50	5

3.1.2 Bestimmung der Kreuzreaktivitäten

Die Bestimmung der KR erfolgte im indirekt kompetitiven ELISA-Format, wobei die MTP mit dem *coating* beschichtet wurde. Die Kreuzreaktanden befanden sich jeweils in äquimolaren Mengen zum MC-LR in Lösung. Zur Bestimmung der KR wurde MC-LR als 100 % fest-

gelegt und der Wert für die möglichen Kreuzreaktanden als Quotient der IC_{50} -Werte in Prozent ausgedrückt. In Tabelle 13 sind die KRs für MC10E7 (GAM) und MC10E7H aufgelistet.

Tabelle 13: Kreuzreaktivitäten von MC10E7 (GAM) und MC10E7H für drei weitere MCs. Die KR wurde dabei für MC-LR auf 100 % festgelegt.

Microcystin	Charakteristische Aminosäuren	KR MC10E7 in %	KR MC10E7H in %
MC-LR	Leucin-Arginin	100	100
MC-RR	Arginin-Arginin	58	62
MC-LW	Leucin-Tryptophan	$<10^{-5}$	0,06
MC-LF	Leucin-Phenylalanin	0,07	0,09

Die Ergebnisse zeigten, dass beide Antikörper ähnliche KRs aufweisen und Werte im Bereich von 58 % bzw. 62 % nur für MC-RR relevant sind. Dies zeigt die Relevanz von Arginin in Position (4) für die Bindung beider Antikörper auf. Im Gegensatz dazu machen die KRs für MC-LW und MC-LF, die für beide Antikörper kleiner 0,09 % waren, deutlich, dass Leucin in Position (2) keine bedeutende Rolle für das Bindungsverhalten spielt.

3.1.3 Stabilität gegenüber Oberflächenwasserinhaltsstoffen

Die Bindung des Antigens an den Antikörper ist nichtkovalenten Ursprungs und wird hauptsächlich durch hydrophobe und ionische Wechselwirkungen sowie durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Amino-, Carbonyl- und Hydroxylgruppen beschrieben (Reverberi, 2007). Um den möglichen Einfluss von Inhaltsstoffen des Oberflächengewässers auf diese Interaktion beurteilen zu können, wurden ELISA-Tests im indirekt kompetitiven Format mit MC10E7H durchgeführt. Chaotrope Reagenzien wie beispielsweise Ca^{2+} , können die Sekundär- und Tertiärstruktur des Antikörpers beeinflussen, was sich in einer Verschlechterung der Nachweisstärke äußert. Um zu testen, ob dieser Effekt einen Einfluss auf den ELISA hat, wurden Kalibrierkurven von MC-LR mit verschiedenen Konzentrationen an Ca^{2+} erstellt. In Abbildung 39 sind die resultierten IC_{50} -Werte mit ihrer Standardabweichung gegen die Ca^{2+} -Konzentration aufgetragen.

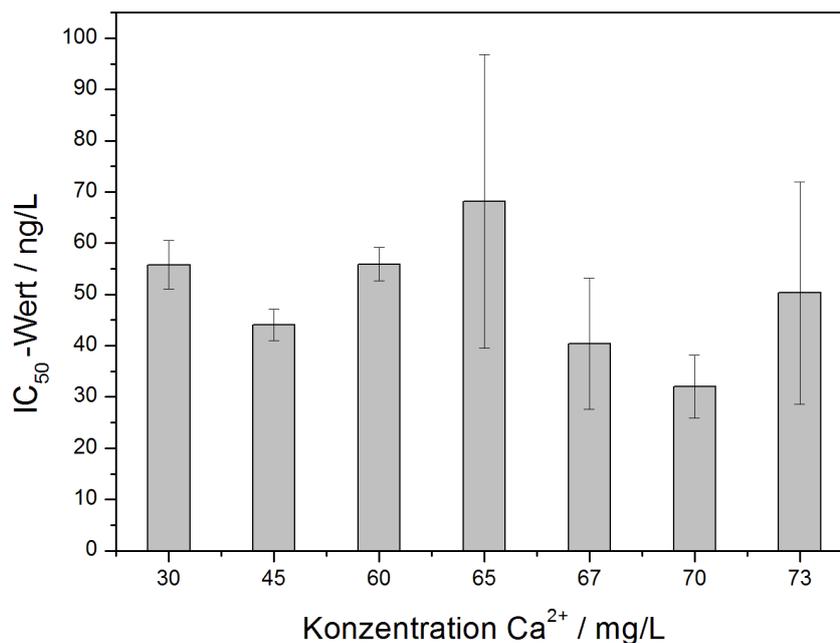


Abbildung 39: Einfluss von Ca²⁺ auf die Nachweisstärke von MC10E7H.

Bis zu 60 mg/L Ca²⁺ war keine signifikante Beeinflussung im ELISA zu verzeichnen. Lag die Ca²⁺-Konzentration darüber, deutete sich eine Beeinflussung der Antikörper-Antigen-Bindung in Form einer signifikanten Erhöhung der Standardabweichung bis zu 43 % an. Grund hierfür könnte die Destabilisierung der Wasserstoffbrückenbindungen und die Abschirmung der Ladung in der Antikörperbindungsregion sein (siehe Punkt 1.3.1 in Kapitel IV).

Eine Veröffentlichung von de la Cruz et al. zeigt, dass der anti-Microcystin-LR-Antikörper des QuantiPlateTM-Kits von Envirologix im direkten ELISA-Format bis zu einer Ca²⁺-Konzentration von 250 mg/L verlässliche Ergebnisse liefert (Cruz de la, 2012). Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen den in der vorliegenden Arbeit und den durch de la Cruz ermittelten Werte könnte in der Verwendung unterschiedlicher Immunoassay-Formate begründet sein. Im Vergleich zu indirekten Immunoassays kommen die immobilisierten Antikörper beim direkten Immunoassay nur an der Phasengrenzfläche in Kontakt mit den Probeninhaltsstoffe. Ferner ist erwiesen, dass nicht alle Antikörper gleichermaßen anfällig bezüglich Störeffekte durch Ca²⁺-Ionen sind.

Auch organische Substanzen wie Huminsäuren können den Immunoassay unter Verwendung von MC10E7H negativ beeinflussen. In Abbildung 40 sind die Ergebnisse für den indirekten ELISA mit unterschiedlichen Mengen an gelösten Huminsäuren dargestellt.

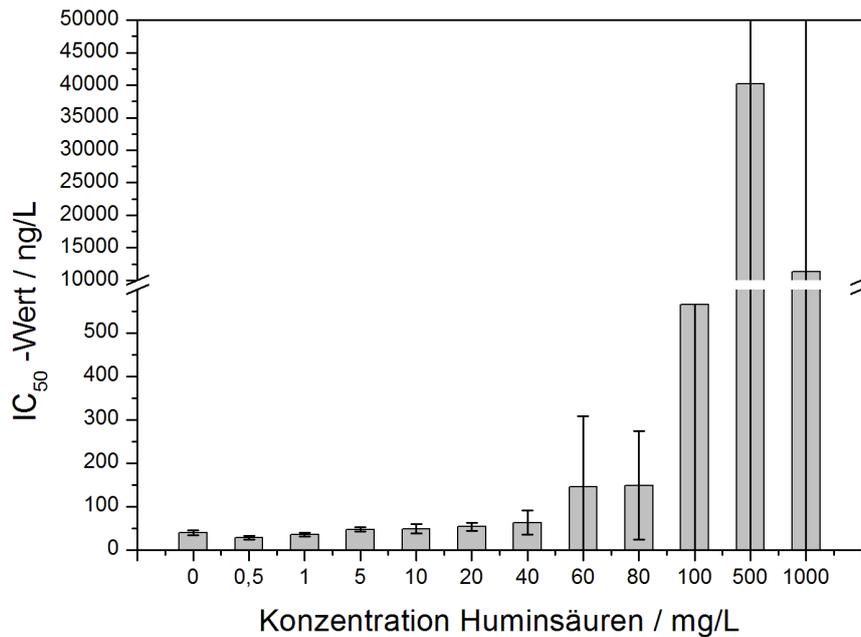


Abbildung 40: Einfluss von Huminsäuren auf die Nachweisstärke von MC10E7H.

Bis zu einer Konzentration von 20 mg/L Huminsäuren war nur eine geringfügige Differenz in den IC₅₀-Werten von $\pm 9,5 \mu\text{g/L}$ zu verzeichnen. Ab 40 mg/L stiegen zum einen die IC₅₀-Werte, zum anderen nahmen auch die Standardabweichungen von 45 % bei 40 mg/L bis auf Werte weit über 100 % bei höheren Huminsäurenkonzentrationen zu. In der vorliegenden Arbeit wurden nur Oberflächengewässer mit einem Wert an gelöstem organischem Kohlenstoff, dessen Hauptteil die Huminsäuren ausmachen, zwischen 2,53 mg/L und 9,5 mg/L verwendet. Eine Abnahme der Nachweisstärke des Immunoassays aufgrund der Anwesenheit von organischen Komponenten wurde daher nicht erwartet.

3.1.4 Stabilität in Realproben

Die vorangegangenen Experimente (siehe Punkt 3.1.3 in Kapitel IV) zeigten die hohe Stabilität von MC10E7H gegenüber Oberflächenwasserinhaltsstoffen. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden Kalibrierkurven in Münchner Leitungswasser (IWC, entnommen am 02.12.2015) und zwei Oberflächenwasserproben (Kastensee und Weßlinger See, jeweils entnommen am 06.07.15) generiert und diese über die erhaltenen IC₅₀-Werte in Bezug zu Standards in dest. H₂O gesetzt. Die erhaltenen Ergebnisse sind Abbildung 41 zu entnehmen.

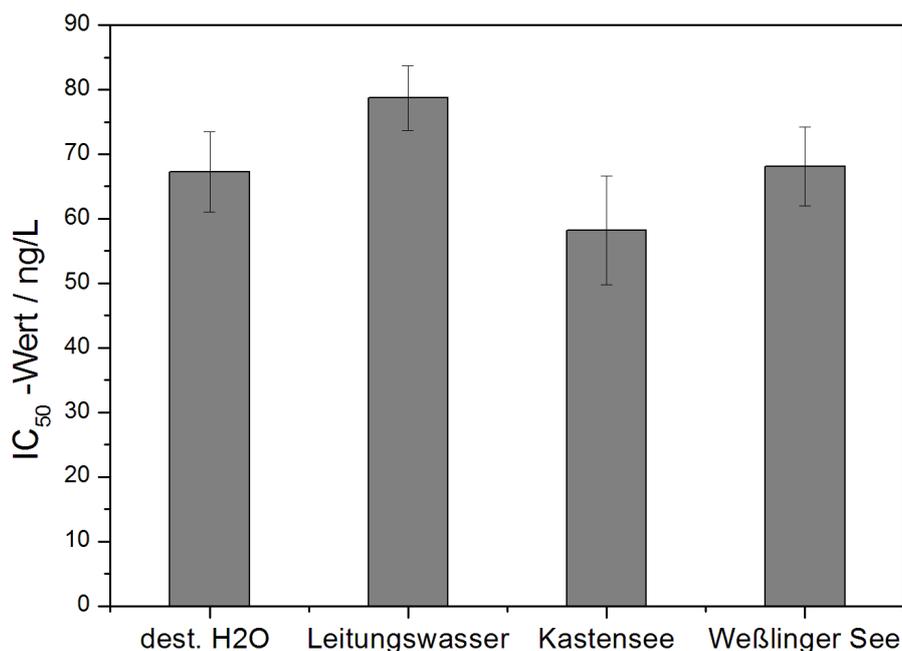


Abbildung 41: Stabilität von MC10E7H in Realproben.

Die beiden Realproben zeigten im Vergleich zu der in dest. H₂O generierten Kalibrierkurve und den daraus erhaltenen Testmittelpunkten vergleichbare Werte mit $58,2 \pm 8$ ng/L für den Kastensee und $68,1 \pm 6,1$ ng/L für den Weißlinger See. Weniger nachweisstark war der ELISA allerdings bei der Verwendung von Leitungswasser mit einem IC₅₀-Wert von $78,7 \pm 5,0$ ng/L im Vergleich zu $67,3 \pm 6,2$ ng/L für das dest. H₂O. Die vorangegangenen Experimente (siehe Punkt 3.1.3 in Kapitel IV) zeigten, dass MC10E7H ab einer Ca²⁺-Konzentration von 60 mg/L nicht mehr zuverlässig im Immunoassay funktioniert; hohe Standardabweichungen und eine Verschlechterung der Nachweisstärke waren das Resultat. Die ermittelte Ca²⁺-Konzentration lag bei dem verwendeten Leitungswasser bei 74 mg/L und könnte daher die Antikörperaffinität negativ beeinflusst haben.

3.1.5 Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln, pH-Wert und Temperatur

Organische Lösungsmittel, sehr saure/basische pH-Werte, aber auch die Temperatur können die Antikörper-Antigen-Interaktion reversibel und irreversibel beeinflussen. In Abbildung 42 ist der Effekt von zwei in der Bioanalytik häufig verwendeten organischen Lösungsmitteln (MeOH und ACN) auf die Nachweisstärke von MC10E7H dargestellt.

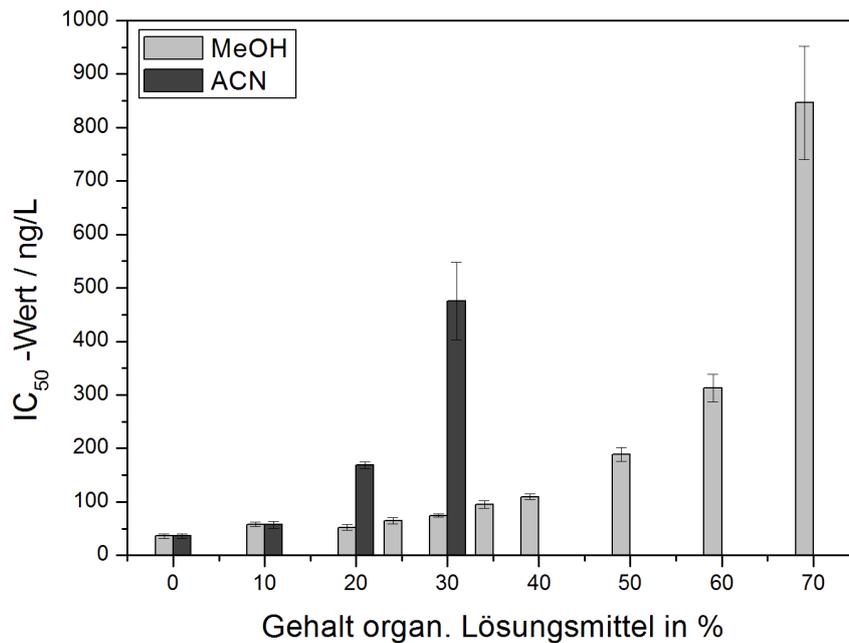


Abbildung 42: Effekt von organischen Lösungsmitteln auf die Nachweisstärke von MC10E7H.

Der Antikörper MC10E7H tolerierte MeOH bis zu etwa 20–30 %. Bei 30 % MeOH-Gehalt verschlechterte sich der IC₅₀-Wert bereits auf $74,4 \pm 2,8$ ng/L und bei 35 % MeOH auf $95,1 \pm 7,5$ ng/L. Eikenberg und Zeck zeigten die etwa gleiche Toleranz für MC10E7 im direkten ELISA-Format. Bei Verwendung von ACN zeigte MC10E7H eine verlässliche Funktionalität während des Competitionsschritts nur bis zu einer Konzentration von 10 % ACN, während es bei MC10E7 bis zu 20 % waren (Eikenberg, 2000; Zeck, 2001). Diese verhältnismäßig hohe Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln ist ein Indiz dafür, dass ionische Wechselwirkungen maßgeblich an der Antikörper-Antigen-Interaktion beteiligt sind.

Sehr basische, aber auch sehr saure pH-Werte können zum einen eine Zerstörung der Sekundär- und Tertiärstruktur induzieren, zum anderen können sie aber auch die elektrostatischen Wechselwirkungen, die einen großen Teil der Bindung zwischen Antikörper und Antigen ausmachen, beeinflussen. Sowohl MC10E7 als auch MC10E7H zeigten im indirekten ELISA-Format eine Stabilität zwischen pH 3 und 12, was sich in nicht signifikanten Unterschieden in den IC₅₀-Werten äußerte. Bei höheren bzw. niedrigeren pH-Werten war es nicht mehr möglich, Kalibrierkurven zu generieren, da die Standardabweichungen bei bis zu 60 % lagen.

Auch hinsichtlich des Temperatureinflusses auf die Nachweisstärke wurden ELISA-Tests durchgeführt. Der Competitionsschritt wurde bei 22 °C und im Vergleich dazu bei 37 °C durchgeführt. Der Temperaturanstieg führte zu einer Erhöhung des IC₅₀-Wertes von 44 ± 4 ng/L auf 234 ± 17 ng/L für MC10E7 und von 50 ± 3 ng/L auf 143 ± 15 ng/L für MC10E7H. Der ELISA wurde aus diesem Grund grundsätzlich bei RT durchgeführt.

3.1.6 Affinitätsbestimmung mittels SPR-Spektroskopie

Um Bindungsstudien zur Ermittlung des Assoziations- und Dissoziationsverhaltens von MC10E7H mittels SPR-Spektroskopie (Biacore X100) durchzuführen, wurde zunächst versucht, das *coating* kovalent an die Oberfläche eines CM5-Chips (Carboxymethyl-dextran-funktionalisierte Goldoberfläche) zu immobilisieren. Für die Interaktion des Proteins mit dem carboxymethylierten Dextran spielen elektrostatische Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle. Laut Herstellerangaben besitzt der CM5-Chip einen pK_s -Wert von 3,5. Liegt der pH-Wert des Immobilisierungspuffers unterhalb dieses Wertes, so ist die CM5-Chip-Oberfläche nicht negativ geladen. Eine Annäherung, die für die Bindung des *coatings* notwendig ist, wird dadurch nicht begünstigt. Umgekehrt verhält sich die Oberflächenladung bei pH-Werten, die höher als 3,5 liegen. Oberhalb seines isoelektrischen Punktes (pI) wird das Protein daher von der Oberfläche abgestoßen. Nachdem der pI-Wert des *coatings* nicht bekannt war, wurde zunächst der pH-Wert des Immobilisierungspuffers ermittelt, bei dem die Annäherung zwischen der Chip-Oberfläche und des Proteins am größten ist. Dafür wurde das *coating* über einen nichtaktivierten CM5-Chip geleitet. In Abbildung 43 ist der Signalanstieg gegen den pH-Wert aufgetragen.

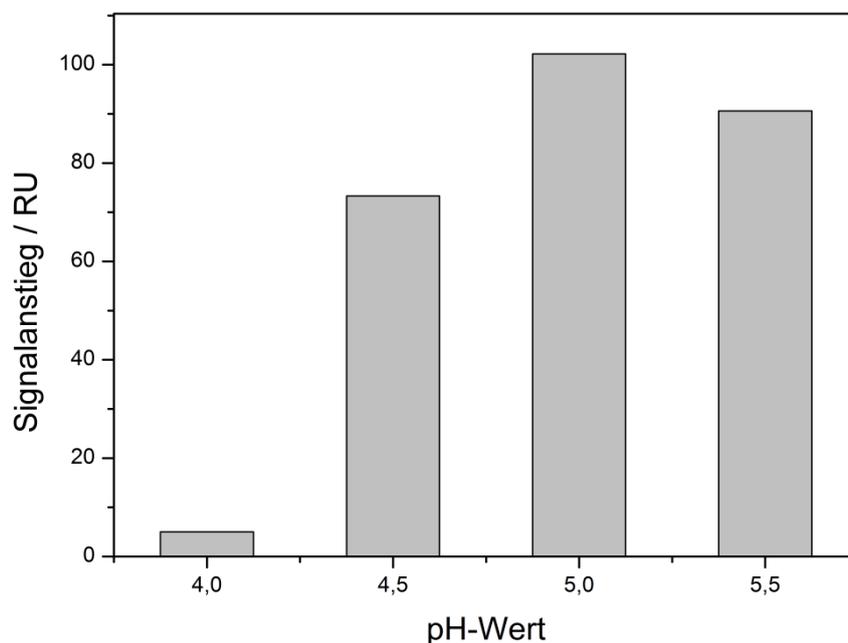


Abbildung 43: Abhängigkeit des SPR-Signalanstiegs vom pH-Wert auf einem nichtaktivierten CM5-Chip.

Der maximale Signalanstieg wurde bei einem pH-Wert von 5 des Immobilisierungspuffers erreicht. Grundsätzlich führt eine höhere *coating*-Beladung zu einer höheren Antikörperbindung und somit zu einem höheren Signalanstieg. Diese hohe Signalstärke ist aber nur bedingt nutzbar. Um eine vollständige Dissoziation des Antikörpers vom *coating* zu gewährleisten

und um einem Antikörper-*hopping* von Antigen zu Antigen entgegen zu wirken, haben sich niedrigere Immobilisierungsdichten bewährt. Ein pH Wert von 4,5 wurde daher gewählt, um einen Kompromiss aus ausreichend hoher Signalstärke und akzeptablem Dissoziationsverhalten zu schließen.

Zunächst wurde der CM5-Chip mit EDC/NHS aktiviert, mit dem *coating* unter optimierten Immobilisierungsbedingungen (pH 4,5) beschichtet und anschließend noch freie Carboxylgruppen mit Ethanolamin blockiert. Vor dem Start der Assoziations- und Dissoziationsexperimente zeigte sich allerdings eine allmähliche Basislinienverschiebung hin zu niedrigeren Belegungsichten (~500 RU in 2,2 Stunden). Grund hierfür kann ein nur adsorptiv gebundenes Protein sein, das mit dem Laufpuffer wieder von der Chipoberfläche desorbiert wird. Weitere Schritte hinsichtlich des Immobilisierungsprotokolls des *coatings* wurden daraufhin nicht weiter verfolgt und ein neuer Ansatz in Betracht gezogen.

Grundsätzlich wird bei relativ kleinen Molekülen die Immobilisierung des entsprechenden Protein-Konjugats bevorzugt, um höhere Signalunterschiede zu erhalten. Es wurde der Versuch unternommen, MC-LR außerhalb des SPR-Spektroskopie-Geräts direkt an die Chipoberfläche zu koppeln. Zunächst erfolgte die Aktivierung des Chips mit EDC/NHS, gefolgt von der Immobilisierung von MC-LR und anschließender Deaktivierung mit Ethanolamin.

Alle Bindungsstudien wurden anschließend im *single-cycle*-Modus mit einer Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ mit Laufpuffer durchgeführt und die Antikörper jeweils in unterschiedlichen Konzentrationen im Bereich von 0,06 bis 1,04 nM bzw. 0,26 bis 4,2 nM für je zwei Minuten über den Chip geleitet. Bei allen Messungen konnte eine konzentrationsabhängige Bindung der Antikörper verzeichnet werden (Assoziation). Aufgrund der direkten Proportionalität zwischen dem SPR-Signal und der gebundenen Antikörpermenge an der Oberfläche, kommt es zu einem Anstieg des SPR-Signals. Allerdings konnte keine Dissoziation des Antikörpers von der Chipoberfläche beobachtet werden. Die Berechnung einer Dissoziationskonstante war daher nicht möglich. Auch eine längere Dissoziationsphase von bis zu 1500 s führte zu keiner signifikanten Dissoziation (Abbildung 44).

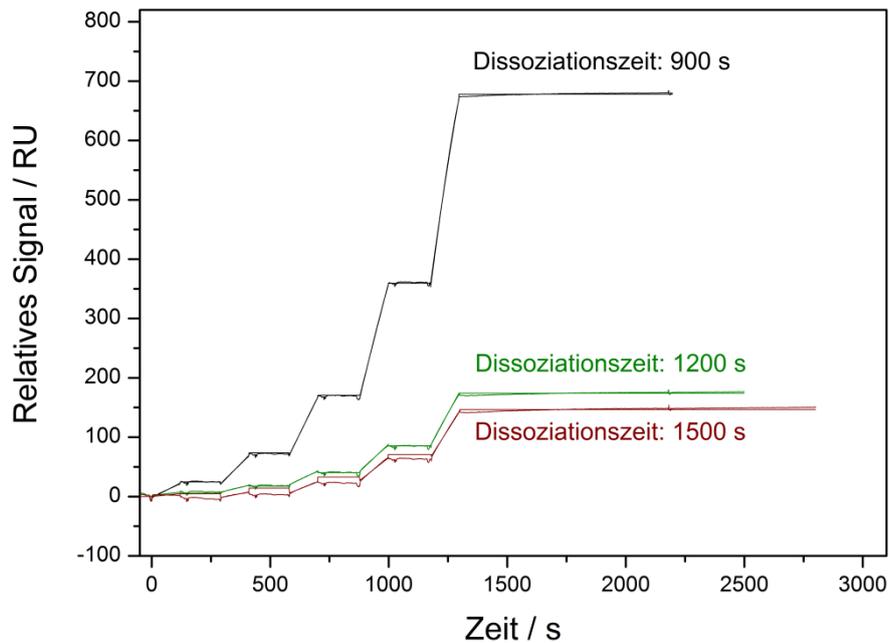


Abbildung 44: Assoziations- und Dissoziationsverhalten bei 25°C am Beispiel von MC10E7 bei unterschiedlichen Dissoziationszeiten (900–1500 s) und Antikörperkonzentrationen (4,2 nM (schwarz), 1,04 nM (grün und rot)). Als Kurvenanpassungsmodell zur Berechnung der Konstanten wurde das 1:1 Bindungsmodell herangezogen.

Der Grund für die nicht messbare Dissoziation könnte in der hohen Affinität beider Antikörper begründet sein, die dazu führt, dass die Antikörper unter den verwendeten Bedingungen (25 °C, Laufpuffer, 10 µL/min) nicht von der Oberfläche des Chips dissoziieren.

Wie vorangegangene ELISA-Tests bereits zeigten (siehe Punkt 3.1.5 in Kapitel IV), hat die Temperatur einen Einfluss auf das Bindungsverhalten beider Antikörper. Weitere SPR-Experimente wurden daraufhin bei 37°C und Antikörperkonzentrationen im Bereich zwischen je 0,13 nM und 2,03 nM durchgeführt. Beide Antikörper zeigten daraufhin eine messbare Dissoziation vom immobilisierten MC-LR (Abbildung 45).

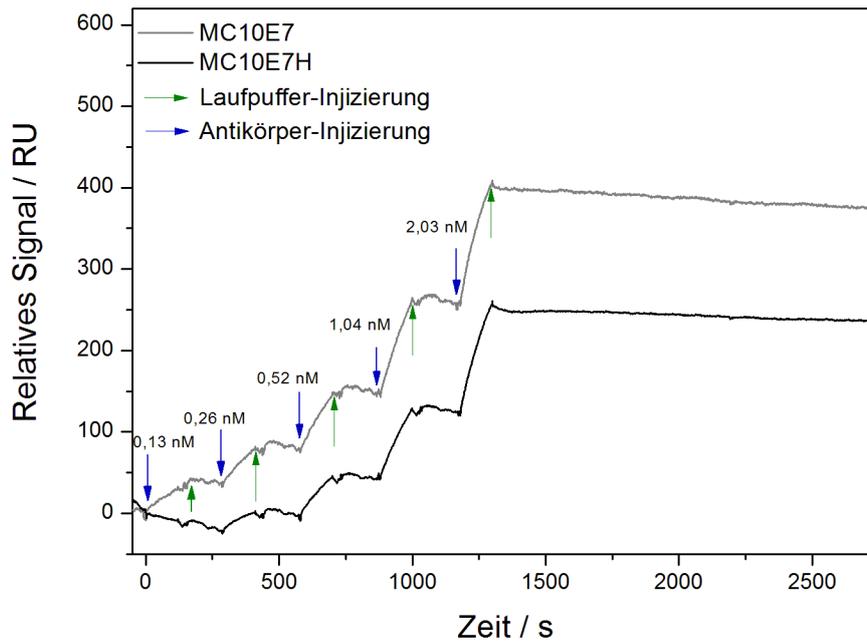


Abbildung 45: Assoziations- und Dissoziationsverhalten der Antikörper MC10E7 und MC10E7H bei 37°C und Antikörperkonzentrationen im Bereich zwischen je 0,13 nM und 2,03 nM. Als Kurvenanpassungsmodell zur Berechnung der Konstanten wurde das 1:1 Bindungsmodell herangezogen.

MC10E7 und MC10E7H unterschieden sich kaum in ihrem Assoziationsverhalten, mit Assoziationsratenkonstanten (k_a) von $3,27 \cdot 10^6$ 1/Ms für MC10E7 und $3,21 \cdot 10^6$ 1/Ms für MC10E7H (siehe Tabelle 14). Die Unterschiede in den sich aus dem Quotienten von k_d und k_a ergebenden K_d -Wert rührten daher vom unterschiedlichen Dissoziationsverhalten bei 37 °C her. Die Ursachen für die unterschiedlichen Dissoziationsratenkonstanten sind noch nicht abschließend geklärt. Allerdings liegt die Vermutung nahe, dass der Unterschied auf die abweichenden konstanten Regionen der Antikörper zurückzuführen ist, da die Aminosäuresequenzen der Bindungsdomäne bei dem murinen MC10E7 und dem rekombinanten MC10E7H identisch sind.

Tabelle 14: Zusammenfassung der mittels SPR erhaltenen k_a -, k_d - und K_d -Werte.

Antikörper	k_a / 1/Ms	k_d / 1/s	K_d / M
MC10E7	$3,27 \cdot 10^6$	$4,58 \cdot 10^{-5}$	$1,40 \cdot 10^{-11}$
MC10E7H	$3,21 \cdot 10^6$	$3,09 \cdot 10^{-3}$	$9,61 \cdot 10^{-10}$

3.1.7 Affinitätsbestimmung mittels ITC

Mit der Anwendung der ITC eröffnen sich neue Wege, die Bindungskonstanten von Molekülen zu bestimmen. Das Messprinzip beruht auf der schrittweisen Addition eines zum Beispiel Proteins oder eines Nukleinsäureabschnitts zum entsprechenden Bindungspartner und der damit verbundenen Enthalpie- und Temperaturänderung. Für die Bestimmung der Gleichgewichts- und thermodynamischen Konstanten wurden die MC-LR-Lösung (50 μM für MC10E7 und 2,5 μM für MC10E7H) jeweils in 1- μL -Schritten zu 300 μL einer Antikörperlösung (MC10E7 2,5 μM , MC10E7H 50 μM) bei konstant gehaltenen 25 $^{\circ}\text{C}$ injiziert. Da es sich bei der Antikörper-Antigen-Interaktion um einen exothermen Prozess handelt wird die Messzelle wärmer als die Referenzzelle, wodurch das Signal einen negativen Peak aufwies. Dieser wird aufgrund zunehmender Sättigung der Paratope immer kleiner. Sobald der Temperaturausgleich zwischen beiden Zellen stattgefunden hat, kehrt das Signal in seine Ausgangsposition zurück und die nächste Injektion kann erfolgen. Dies passiert, bis es aufgrund einer Sättigung zu keiner weiteren Antikörper-Antigen-Interaktion mehr kommt und die Wärmemengenänderungen abzunehmen beginnt (siehe Abbildung 46 links oben, ab Minute 21).

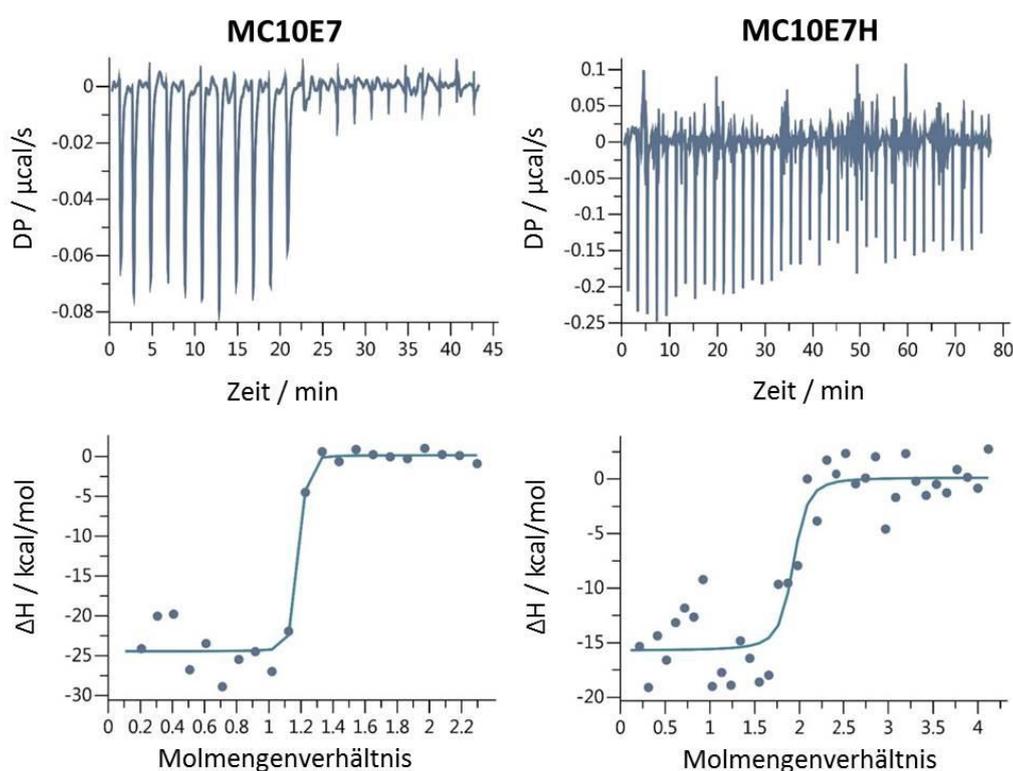


Abbildung 46: Rohdaten für die negativen Heizleistungen aufgetragen gegen die Zeit (oben) und integrierte Heizleistungen aufgetragen gegen das Molmengenverhältnis (MC-LR/Antikörper) (unten). MC10E7 (links) und MC10E7H (rechts) (Daten erhalten von Malvern Instruments GmbH, Lappersdorf).

Nach der Integration der erhaltenen Spitzen der Heizleistung, die sich aus den Unterschieden zwischen Referenz- und Messzelle ergeben (engl. *differential power*, DP), erhält man die freigesetzte Wärmemenge ΔH . Diese wird gegen das molare Verhältnis von MC-LR und dem entsprechenden Antikörper aufgetragen (siehe Abbildung 46 unten).

Die resultierenden Isothermen wurden mittels nichtlinearer Regression an ein Bindungsmodell angepasst (*single-site model*), aus denen der K_d -Wert erhalten wurde. Die Enthalpie ΔG entsprach der abgegebenen Wärmemenge pro Mol des gebundenen Antikörpers. Die Änderung der freien Gibbs-Energie ΔG sowie die Entropie S wurden über Gleichung (4) berechnet und sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15: Zusammenfassung der mittels ITC erhaltenen ΔH -, ΔG -, $-T\Delta S$ - und K_d -Werte.

Antikörper	ΔH / kcal/mol	ΔG / kcal/mol	$-T\Delta S$ / kcal/mol	K_d / M
MC10E7	-24,6	-12,7	11,9	$4,85 \cdot 10^{-10}$
MC10E7H	-15,8	-11,1	4,77	$7,85 \cdot 10^{-9}$

Für MC10E7 ergab sich eine K_d von $4,85 \cdot 10^{-10}$ M und für MC10E7H ein Wert von $7,85 \cdot 10^{-9}$ M. Die über SPR ermittelten K_d -Werte lieferten im Vergleich zu den ITC-Werten etwa um eine Größenordnung höhere Werte. Die ITC-Messungen wurden allerdings bei 25 °C aufgenommen und liegen mit bis zu $4,85 \cdot 10^{-10}$ M nahe am Detektionslimit des Gerätes (Herstellerangaben Malvern Instruments GmbH), weshalb ein direkter Vergleich mit den SPR-Ergebnissen nur mit Einschränkungen sinnvoll scheint. Trotzdem zeigten auch diese Messungen, dass es sich bei dem rekombinant in Pflanzen hergestellten Antikörper MC10E7H um einen hochaffinen Antikörper handelt.

3.2 Affinitätsbestimmung von scFvs aus *P. pastoris* mittels ELISA

Zu Vergleichszwecken wurden neben den vollständigen, in Pflanzen produzierten IgGs zwei verschiedene scFvs (MCscFv2 und MCscFv2EL) hergestellt, welche die gleiche Aminosäuresequenz im variablen Teil des Antikörpers im Vergleich zu MC10E7H besaßen. Als Erkennungssequenz für die Sekundärantikörper besaßen beide Antikörperfragmente zum einen eine Aminosäuresequenz, die aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinmolekülen bestand (6xHis-Tag), zum anderen ein aus 496 Aminosäuren bestehendes Protein, welches durch das Gen c-Myc kodiert wird (c-Myc). Erste indirekt kompetitive ELISA-Tests zeigten allerdings, dass es

nur bei Verwendung eines anti-polyHistidin-HRP-Antikörpers zu einer Farbentwicklung kam. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten in der eingeschränkten Zugänglichkeit und/oder der verminderten Funktionalität des c-Myc-Proteins nach der Expression begründet sein, wodurch die Erkennung mittels Sekundärantikörper erschwert war.

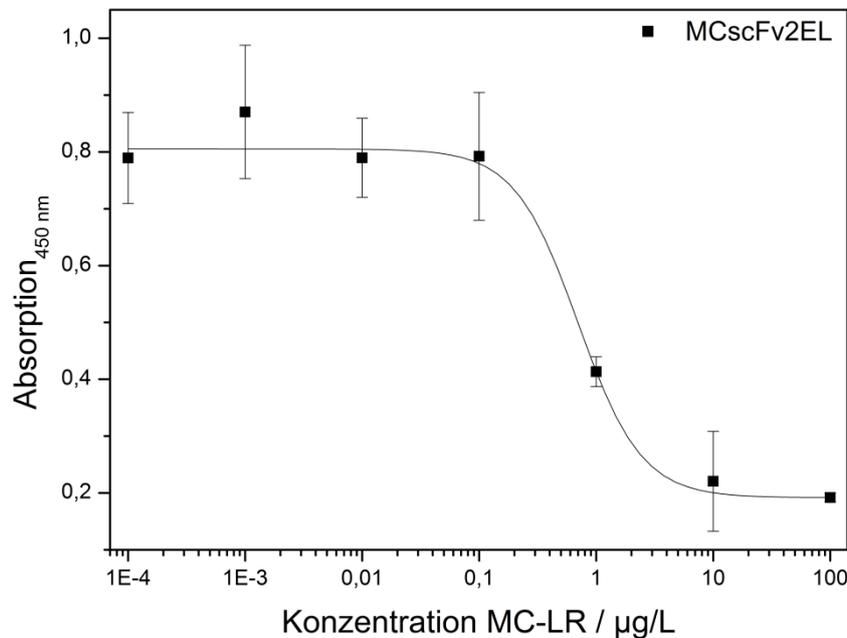


Abbildung 47: Kalibrierkurve für das Antikörperfragment MCscFv2EL. Die eingesetzte Antikörperkonzentration betrug 20 ng/mL bei einer *coating*-Konzentration von 50 ng/mL ($n=7$, $m=3$).

Nach der Optimierung der scFv-Konzentrationen im Bereich zwischen 5 ng/mL und 100 ng/mL wurde für MCscFv2EL bei einer Konzentration von 20 ng/mL der niedrigste IC_{50} -Wert von $0,70 \pm 0,33$ µg/L (Abbildung 47) und für MCscFv2 ein Wert von 0,81 µg/L erhalten. Bei letzterem scFv war eine Berechnung der IC_{50} -Standardabweichung aufgrund der hohen Standardabweichungen der einzelnen Messpunkte, die zwischen 7 % und 22 % lagen, nicht möglich. Im Vergleich zum in *N. tabacum* hergestellten rekombinanten Vollängenantikörper, zeigten die Antikörperfragmente einen 14- bis 16-fach schlechtere Nachweisstärke, bei einer vierfach höheren benötigten Antikörperfragmentmenge. Ein Grund hierfür könnte die Monovalenz der scFvs gegenüber den bivalenten IgGs sein. Außerdem entspricht die Tertiärstruktur der scFvs, bei denen V_H und V_L über einen künstlich eingeführten *linker* miteinander verbunden sind, vermutlich nicht exakt der Bindungsregion des Vollängenantikörpers.

Die rekombinante Herstellung von kompletten IgG-Molekülen mittels Bakterien und Hefen ist allerdings aufgrund ihrer Größe schwierig. Wie sowohl vorangegangene Arbeiten (z.B. Karsunke, 2011), als auch die vorliegenden Experimente zeigen, liefern scFvs allerdings häufig eine deutlich schlechtere Nachweisstärke im Vergleich zu vollständigen IgGs. Neben der

Möglichkeit, relativ große Antikörpermengen herstellen zu können, ergibt sich also ein weiterer entscheidender Vorteil der Pflanze als Antikörperproduzent.

Die unter Punkt 3 in Kapitel IV beschriebenen Affinitätsbestimmungen von zwei scFvs zeigte im Vergleich zum murinen MC10E7 bis zu 16-fach schlechtere Nachweisstärken im indirekt kompetitiven ELISA. Hingegen zeigte die Charakterisierung des rekombinanten in *N. tabacum* hergestellten MC10E7H eine hohe Vergleichbarkeit hinsichtlich des Bindungsverhaltens im ELISA. Die Stabilitäten gegenüber Probeninhaltsstoffen wie chaotropen Reagenzien, Huminsäuren, organischen Lösungsmitteln und Randbedingungen wie Temperatur und pH-Wert waren nicht signifikant unterschiedlich. Auch Bindungsstudien mittels SPR und ITC zeigten das gleiche Assoziationsverhalten. Die Generierung von Kalibrierkurven in Oberflächenwasser erwies sich als erfolgreich, was sich aus den ähnlichen IC_{50} -Werten in Matrix und dest. H_2O ablesen lässt.

Zusammenfassend verdeutlichen diese Ergebnisse das große Potential der immunanalytischen Anwendung von *Plantibodies* bei gleichzeitig geringen Produktionskosten im Vergleich zu konventionell hergestellten monoklonalen Antikörpern. Ferner ist mit der Entwicklung von hochaffinen *Plantibodies* die Grundlage für eine effiziente und kostengünstige Abreicherungsmethode basierend auf der Immunofiltration geschaffen worden.

4 Immunofiltration: Optimierung und Charakterisierung der Matrix

Zur Herstellung von effizienten, auf MC10E7 und MC10E7H basierenden Immunofiltrations-Säulen, musste zunächst ein geeignetes Syntheseprotokoll entwickelt werden. Geeignet bedeutet in der vorliegenden Arbeit, eine Sol-Gel-Glas-Matrix zu generieren, die Poren aufweist, die klein genug sind, damit die Antikörper nach der Immobilisierung nicht aus der Poren diffundieren können (engl. *leaching*), aber groß genug, damit das MC-LR in die Poren gelangen kann. Diese Eigenschaften galt es nach erfolgreicher Synthese mittels bildgebenden und physikalisch-chemischen Methoden zu bestätigen.

Für die Ergebnisbewertung der Immunofiltrationsexperimente und deren Diskussion sollen nachfolgend zunächst zwei Begriffe definiert werden. Die *Bindungskapazität* bezeichnet die prozentuale Menge an Toxin, welche spezifisch an die Immunadsorbermatrix gebunden hat, bezogen auf die Menge an MC-LR, die theoretisch an die immobilisierte Menge des Antikörpers binden kann. Für die Berechnung der theoretisch maximal möglichen Menge an MC-LR wurde eine 100 %ige Zugänglichkeit und Funktionalität aller Paratope, unter Annahme eines bivalenten Bindungsverhaltens, zugrunde gelegt. Exemplarisch können 0,5 mg des Antikörpers (Annahme: $M_{(AK)} = 150$ kDa) 6,63 μg MC-LR ($M_{(MC-LR)} = 995$ Da) binden. Die *Wiederfindung* bezieht sich in Punkt 4 und 5 in Kapitel IV auf die eluierte Menge an MC-LR im Verhältnis zur gebundenen Menge an Toxin in Prozent.

Erste Ergebnisse zu Bindungskapazität und Wiederfindungen wurden bei der Bestimmung der unspezifischen Bindung, der Reproduzierbarkeit und Lagerstabilität und den Elutionsversuchen erhalten.

4.1 Auswahl des Syntheseprotokolls für die Sol-Gel-Glas-Herstellung

Für die Herstellung von Sol-Gelen für die Einkapselung von Antikörpern gibt es eine Vielzahl an Ansätzen, die sich zum einen in der Wahl des Präkursors, zum anderen aber auch im Wasser/Präkursor-Verhältnis, der Reaktionstemperatur, der Alterungsdauer, sowie in der variablen Zugabe von Additiven (z.B. MeOH, Glycerol) und der Art des Katalysators unterscheiden. Je nach Zusammensetzung können Eigenschaften wie beispielsweise die Art des Gels (Lyogel, Xerogel, Aerogel) und der Vernetzungsgrad des Polysiloxannetzwerks bestimmt werden. Des Weiteren können diverse Poren- und Partikelgrößen gezielt hergestellt werden. Für die vorliegenden Experimente wurden zu Beginn drei unterschiedliche Sol-Gel-Zusammensetzungen getestet. Allen gemeinsam waren der Präkursor TMOS und die mittels Salzsäure katalysierte

Reaktion (Tabelle 16). Auf das Monomer TMOS wird im Vergleich zu TEOS häufiger zurückgegriffen, da das bei der Polymerisation entstehende MeOH einen weniger starken denaturierenden Effekt auf die immobilisierten Biomoleküle zeigt als EtOH, welches bei der Verwendung von TEOS entsteht (Buckley, 1994).

Tabelle 16: Zusammensetzungen unterschiedlicher Sol-Gele nach Zühlke (Zühlke, 1995), Schedl (Schedl, 2001) und Degelmann (Degelmann, 2006).

Zühlke	Schedl	Degelmann
67 μ L 40 mM HCl-Lsg	250 μ L MeOH	100 μ L MeOH
250 μ L H ₂ O	25 μ L 40 mM HCl-Lsg	100 μ L 40 mM HCl-Lsg
1,13 mL TMOS	1,25 mL TMOS	250 μ L H ₂ O
Für 30 min im Ultraschallbad gekühlt.	Für 20 min auf Eis mixen.	300 μ L H ₂ O/Glycerol (1:1, v/v)
		1,7 mL TMOS
		Ansatz auf Eis kühlen, für 15 min rühren lassen.

Die Gelbildung nach der Zugabe des Silikasols zu der Antikörperlösung erfolgte bei den Synthesevorschriften von Zühlke und Degelmann innerhalb von wenigen Minuten, bei der verwendeten Rezeptur von Schedl erst nach 20 Minuten. Bei Experimenten nach Zühlke und nach Schedl trübte sich das Sol-Gel nach der begonnenen Polymerisation leicht ein, was ein Indiz für denaturiertes und ausgefallenes Protein sein kann. Der Zusatz von Glycerol führte zu einer Stabilisierung des Proteins während des Polymerisationsprozesses. Aufgrund des solvophoben Effektes findet eine Anlagerung des Additivs an die Proteinoberfläche nicht statt. Da diese Reaktion entropisch ungünstiger ist als der Kontakt mit Wasser, wird das Protein bevorzugt hydratisiert und die native Struktur bleibt weitestgehend erhalten (Arakawa, 1991). Die Synthese der Sol-Gele erfolgte deshalb im Verlauf der vorliegenden Arbeit stets nach der Vorschrift von Degelman et al. Die Lagerung des Sol-Gel-Glases während des Alterungsprozesses erfolgte grundsätzlich bei 4 °C, um die Funktionalität des Antikörpers zu gewährleisten. In der Literatur wird die Verwendung sowohl von Hydro-, als auch von Xerogelen (z.B. Turniansky, 1996) beschrieben. Hydrogele, die neben den Alkogelen der Gruppe der Lyogele angehören, besitzen im Vergleich zu Xerogelen aufgrund des meist kürzeren Polymerisationsprozesses größere Poren. Nachteil an den häufig vollständig getrockneten Xerogelen ist somit die eingeschränkte Erreichbarkeit der Antikörper aufgrund einer Diffusionslimitation in kleinere Poren. Die Aktivität des in Xerogele eingekapselten Proteins kann nach einem langen Trocknungsprozess drastisch abnehmen und zu niedrigeren Abreicherungs-effizienzen führen.

4.2 Optimierung des Sol-Gels

Die Optimierung der Sol-Gel-Glas-Matrix verfolgte das entscheidende Ziel, möglichst hohe spezifische Abreicherungs-effizienzen zu erlangen. Dabei spielen grundsätzlich Parameter wie die Porengröße, die unspezifische Bindung an das Sol-Gel und das Antikörper/Matrix-Verhältnis eine wichtige Rolle.

4.2.1 Gewichtsverlust

Die Porosität, die mittlere Partikel- und mittlere Porengrößenverteilung der Sol-Gel-Glas-Matrix lassen sich durch unterschiedliche Parameter beeinflussen. Neben dem Monomeranteil (TMOS) in der Ausgangslösung sind dies hauptsächlich die Dauer des Alterungsprozesses und die Temperatur. Die Menge des Monomeranteils wurde in der vorliegenden Arbeit von der Synthesevorschrift von Degelmann et al. übernommen und auch die Temperatur wurde als fixer Parameter auf 4 °C gesetzt, um die Funktionalität des Antikörpers zu gewährleisten. Lediglich der Einfluss des Alterungsprozesses, der direkt mit dem Gewichtsverlust des Gels korreliert, wurde variiert. Bei einem Gewichtsverlust von 40 % war noch ein so hoher Feuchtigkeitsgehalt zu verzeichnen, dass eine Zerkleinerung des Sol-Gel-Glases mittels Mörser nur schlecht möglich war. Bei einem Gewichtsverlust von 76 % war eine signifikant schlechtere Abreicherungs-effizienz zu verzeichnen. Im Verlauf der Experimente zeigten sich Sol-Gele, deren Gewichtsverlust zwischen 46 % und 50 % lag, am effizientesten. Dieser Wert wird auch in der Literatur als geeignet für die Anwendung von Hydrogelen beschrieben (z.B. Zühlke, 1995; Cichna-Markl, 2006). In Abbildung 48 ist der Trocknungsprozess bei 4 °C in Glasgefäßen mit unterschiedlichen Durchmessern (\varnothing 2,5 cm und \varnothing 3,5 cm) und unterschiedlichen Volumina (0,5 mL Antikörperlösung + 0,5 mL Silikasol bzw. jeweils das doppelte Volumen) abgebildet.

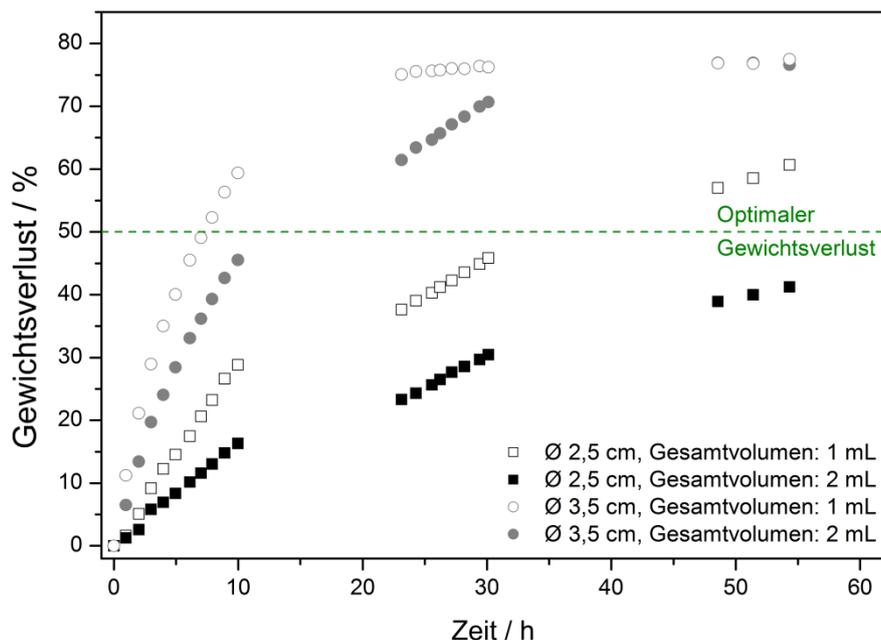


Abbildung 48: Zeitlicher Verlauf des Gewichtsverlusts bei Verwendung unterschiedlicher Glasgefäße (Ø 2,5 und Ø 3,5 cm) und unterschiedlichen Volumina (0,5 mL Antikörperlösung + 0,5 mL Silikasil bzw. jeweils das doppelte Volumen) bei 4 °C.

Je niedriger das Gesamtvolumen des Sol-Gels und je größer der Durchmesser des Glasgefäßes, desto rascher vollzog sich der Polymerisationsprozess: Mit fortschreitendem Alterungsprozess, der mit der Verflüchtigung von MeOH und Wasser einhergeht, stieg der prozentuale Gewichtsverlust. Nach Erreichen von 46–50 % Gewichtsverlust wurde das Sol-Gel-Glas gemörsert und gesiebt (Maschenweite 250 µm). Dieser Schritt führte zu einer Erhöhung der Oberfläche und ermöglichte somit eine bessere Zugänglichkeit für das MC-LR zu den freien Paratopen.

4.2.2 Unspezifische Bindung

Als unspezifische Bindung wurde im vorliegenden Fall die Interaktion von MC-LR mit der Sol-Gel-Glas-Matrix verstanden, welche durch unterschiedliche Wechselwirkungen und Effekte hervorgerufen werden konnte. Auf der einen Seite können nichtkovalente Bindungen, wie elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Effekte zwischen dem Analyten und dem Sol-Gel-Glas, zu einer adsorptiven Bindung an die Matrix führen (Jin, 2002). Im vorliegenden Fall handelt es sich bei MC-LR um eine hydrophile Substanz und bei der Sol-Gel-Glas-Matrix um ein polares Polymer. Es kann daher zu einer unspezifischen Wechselwirkung kommen.

Auf der anderen Seite kann das mesoporöse Polymernetzwerk als eine Art Größenausschlusschromatographie fungieren, bei der Moleküle aufgrund ihres hydrodynamischen Volumens im

Säulenmaterial retardiert werden. Moleküle mit einem niedrigen hydrodynamischen Volumen passieren die stationäre Phase langsamer, da das Eindringen in die Poren ermöglicht wird.

Um die Menge an unspezifisch gebundenem MC-LR zu erhalten, wurden Abreicherungsexperimente durchgeführt, bei denen entweder die reine Sol-Gel-Matrix (*blank*) oder Sol-Gel mit einem eingekapselten unspezifischen Antikörper (γ -Globulin) in Säulenexperimenten verwendet wurden. Hierfür wurden die Säulen jeweils mit 4 μg MC-LR beladen.

Tabelle 17: Menge an unspezifisch gebundenem MC-LR an zwei unterschiedliche Säulen ohne Antikörper (*blank* und γ -Globulin, je 0,5 g Sol-Gel-Glas-Matrix). Aufgabe von je 4 μg MC-LR in 10 % MeOH/dest. H_2O .

Art des Sol-Gels	Menge Sol-Gel-Glases	Gebundene Menge MC-LR	Menge MC-LR ^b
<i>Blank</i>	0,5 g	202 ng	202 ng
<i>Blank</i>	2,2 g	839 ng	191 ng
γ -Globulin ^a	0,5 g	130 ng	130 ng

^a Einkapselung von 0,5 mg γ -Globulin, ^b Menge an MC-LR, die unspezifisch gebunden wurde (bezogen auf 0,5 g Sol-Gel-Glas)

Die unspezifische Bindung von MC-LR an *blank*-Sol-Gel-Glas lag zwischen 191 ng und 202 ng, was etwa 5 % entspricht. Dass die unspezifische Bindung in Anwesenheit von γ -Globulin um 2 % sinkt und eine Bindung von nur noch 130 ng zu verzeichnen ist, kann durch die Belegung der Poren und damit der Sol-Gel-Glas-Oberfläche bedingt sein.

4.2.3 Antikörper/Sol-Gel-Glas-Verhältnis

Die Menge an eingekapseltem aktiven Antikörper ist ein wichtiger Parameter für die Bindungskapazität des Analyten. Allerdings muss beachtet werden, dass eine Erhöhung der Menge an eingekapseltem Protein in gleich bleibender Menge der Sol-Gel-Glas-Matrix nicht endlos mit der Erhöhung der Abreicherungs-effizienz skaliert werden kann. Grund hierfür ist die schlechtere Zugänglichkeit der Paratope mit zunehmender Menge an Bioliganden aufgrund des Platzmangels. Eine zu große Menge an Sol-Gel-Glas-Matrix führt wiederum dazu, dass die in Punkt 4.2.2 in Kapitel IV beschriebene unspezifische Bindung an das Säulenmaterial steigt. Um dies zu verifizieren, wurden Experimente durchgeführt, bei denen unterschiedliche Mengen (50–500 μg) des murinen Antikörpers MC10E7 (GAM) jeweils in 0,5 g Sol-Gel-Glas-Matrix eingekapselt wurden und mit 4 μg MC-LR beladen wurden (Tabelle 18).

Tabelle 18: Zusammenhang zwischen der eingekapselten Menge an MC10E7 (GAM) (in je 0,5 g Sol-Gel-Glas-Matrix) und dessen Bindungskapazität nach Aufgabe von 4 µg MC-LR in 10 % MeOH/dest. H₂O.

Menge an eingekapseltem MC10E7	Bindungskapazität
50 µg	146 %
100 µg	80 %
300 µg	71 %
500 µg	51 %

Die vermeintlich hohen Bindungskapazitäten vor allem bei eingekapselten 50 µg MC10E7 (GAM) sind ein Resultat aus der ihr zugrundeliegenden Berechnung. Die ermittelte unspezifische Bindung von 202 ng MC-LR bei 0,5 g Sol-Gel-Glas-Matrix fällt bei geringeren eingekapselten Mengen an Antikörper deutlicher ins Gewicht und es kommt zu Bindungskapazitäten >100 %. Damit die unspezifische sich deutlich von der spezifischen Bindung unterscheidet, wurde ein Antikörper/Sol-Gel-Glas-Verhältnis von 1:1000 gewählt (500 µg Antikörper in 0,5 g Sol-Gel-Glas).

In Tabelle 19 sind die für diese Arbeit verwendeten Parameter für die Herstellung der auf Sol-Gel-Glas basierenden Immunfiltrationssäulen zusammengefasst.

Tabelle 19: Zusammenfassung der optimierten Sol-Gel-Glas-Bedingungen für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Immunfiltrationssäulen.

Synthese nach	Antikörpermenge	Sol-Gel-Glas-Menge	Gewichtsverlust	Temperatur
Degelmann et al.	0,5 mg	0,5 g ^a	46–50 %	4 °C

^a Nach Gewichtsverlust von 50 %.

4.3 Charakterisierung des Sol-Gel-Glases

Um einen Eindruck hinsichtlich des Polymernetzwerks und der Größenverteilung der Poren zu erhalten, wurden zwei bildgebende Verfahren und eine physikalisch-chemische Methode angewendet.

4.3.1 REM und TEM Messungen

Die Aufnahme mittels Rasterelektronenmikroskop (REM) (Abbildung 49) zeigt die Netzwerkstruktur des auf TMOS-basierenden Sol-Gels ohne eingekapselten Antikörper (Gewichtsverlust 50 %) bei einer 150000-fachen Vergrößerung. Deutlich erkennbar sind die kugelförmigen Strukturen mit Durchmessern im unteren Nanometerbereich. Diese fügten sich wiederum zu Gebilden mit Durchmessern von 20–50 nm zusammen, die das Netzwerk bilden. Die Einkapselung von Antikörpern erfolgt in die entstehenden Poren, die aufgrund der geringen Auflösung des REMs nicht eindeutig zu erkennen sind.

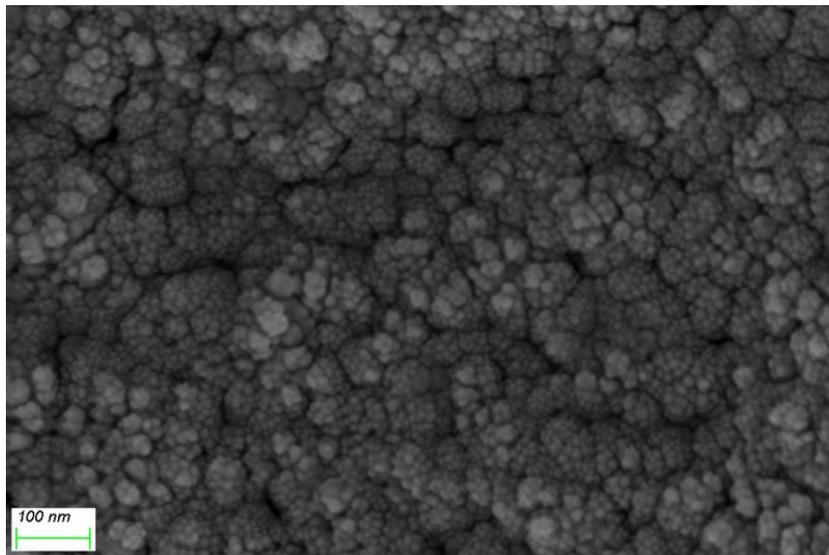


Abbildung 49: REM-Bild eines *blank*-Sol-Gel-Glases, 150000-fache Vergrößerung, Hochspannung: 5,00 kV, Blendengröße: 30,00 μm , Arbeitsabstand: 5,3 mm.

Die entstandene Polymernetzwerkstruktur zeigte deutliche Charakteristika bei der Anwendung der sauren Katalyse während der Polymerisationsreaktion. Liegt ein pH-Wert <7 vor, so sind die Präkursor-Moleküle nur schwach ionisiert. Dies führt zu einer nur sehr langsamen Bildung der ersten Partikel. Aufgrund der geringen elektrostatischen Abstoßungen kommt es schneller zu einer fibrillären Aggregation von vielen kleinen Partikeln (Durchmesser etwa 5–10 nm, siehe Abbildung 49). Im Vergleich herrschen bei der basischen Katalyse höhere elektrostatische Abstoßungen vor. Dies führt zu einem limitierten Aggregationsprozess, es bilden sich eher größere Partikel von etwa 100 nm im Durchmesser (Coradin, 2003). Auch bei den mittels Transmissionselektronenmikroskop (TEM) generierten Bildern (exemplarisch Abbildung 50) war das Polymernetzwerk deutlich sichtbar. Einzelne Poren und deren Größe allerdings ebenfalls nicht erkennbar.

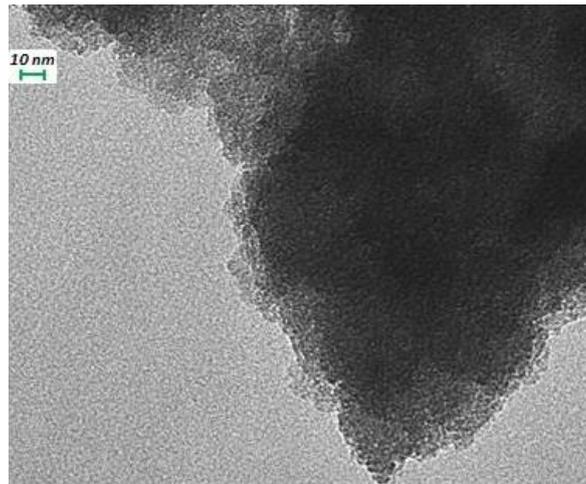


Abbildung 50: TEM-Bild eines *blank* Sol-Gel-Glases.

4.3.2 Bestimmung der Sorptionsisotherme

Für die Größenbestimmung der Oberfläche des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sol-Gel-Glases wurden Sorptionsisothermen bestimmt. Hierzu wurde die Probe zunächst bei 25 °C für zwei Stunden evakuiert und anschließend die Sorptionsisotherme mit dem Adsorptiv Stickstoff bei der Siedetemperatur des Gases bei etwa -196 °C bestimmt. In Abbildung 51 ist beispielhaft die Sorptionsisotherme für ein Sol-Gel-Glas mit eingekapseltem Antikörper (γ -Globulin) abgebildet. Dabei wurde das zugegebene Gasvolumen (V_{ads}) gegen den Relativdruck (p/p^0) im Probenraum bei konstanter Temperatur aufgetragen.

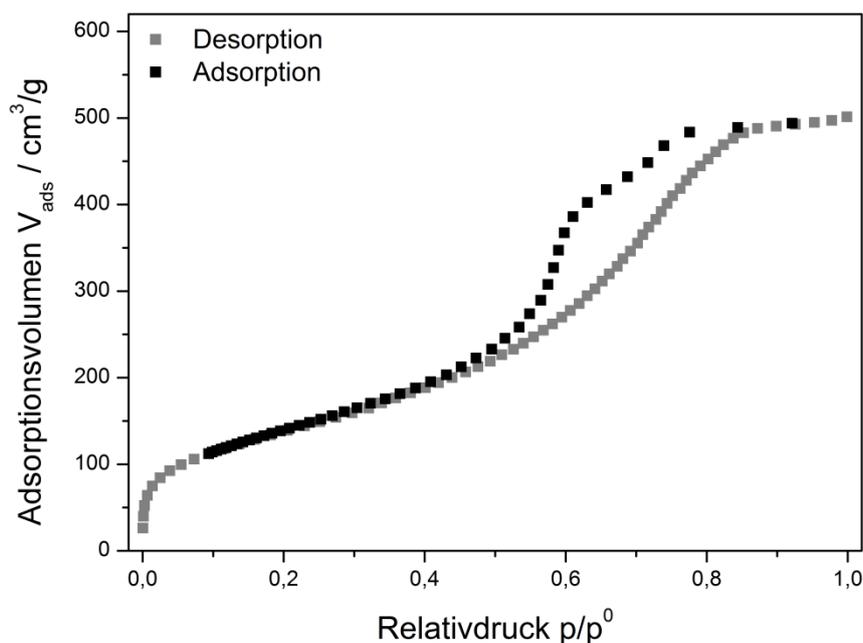


Abbildung 51: Bestimmung der Sorptionsisothermen am Beispiel eines Sol-Gel-Glases mit eingekapseltem Antikörper. Probenvorbereitung: 2 Stunden Evakuierung bei 25°C, N_2 als Adsorbat, Probentemperatur während Messung: -196 °C, Maximaler Adsorptionsdruck: 720 Torr.

Die IUPAC teilte 1985 alle Isothermen in sechs Grundtypen ein, welche 2015 um zwei weitere erweitert wurden (Sing, 1985; Thommes, 2015). In der vorliegenden Arbeit entsprachen die Sorptionsisothermen beider Sol-Gel-Gläser (*blank* und γ -Globulin) denen des Typ IV, welches auf ein mesoporöses Material (Porendurchmesser zwischen 2 nm und 50 nm) schließen lässt. Das charakteristischste Merkmal ist hierbei die Kapillarkondensation des Stickstoffs an die Mesoporen, was als Adsorptionshysterese bezeichnet wird. Der erste Teil des Isothermenverlaufs bei niedrigen Relativdrücken entspricht dem Bereich, bei dem die Vervollständigung der Monoschicht abgeschlossen ist. Dieser Bereich wird hauptsächlich durch die Langmuir-Isotherme beschrieben. Es folgt die Bildung von Mehrschichtadsorptionen bei mittleren Relativdrücken, die durch die von S. Brunauer, P. Emmett und E. Teller eingeführte BET-Isotherme. Ab einem $p/p^0 \leq 0,8$ kommt es letztlich zur Kapillarkondensation.

Tabelle 20: Zusammenfassung der mittels BET-Analyse erhaltenen Porendurchmesser, BET-Oberflächen und BET-Konstanten für ein *blank*- und ein γ -Globulin-Sol-Gel-Glas.

Probe	Porendurchmesser / nm	BET-Oberfläche / m²/g	BET-Konstante / -
<i>Blank</i>	5,04	505,8	70,598
γ -Globulin	4,87	560,8	69,502

Die ermittelte BET-Oberfläche stellt einen Wert für die Quantifizierung der Feststoffoberfläche dar und lag zwischen 560,8 m²/g für das γ -Globulin-Sol-Gel-Glas und bei 505,8 m²/g für das *blank*-Sol-Gel-Glas. Die BET-Konstante liefert eine Aussage über den Kurvenverlauf der Isotherme im BET-Bereich. Bei einem Wert von etwa 80 liegt die Vervollständigung der Monoschicht vor und es beginnt die Mehrschichtadsorption. Ein Wert unter 50 weist auf eine Überschneidung zwischen Monoschicht- und Mehrschichtadsorption hin. Da die hier beobachteten Werte von 69,5 für das Sol-Gel-Glas mit Antikörper und 70,6 für das Sol-Gel-Glas ohne Antikörper zwischen den definierten Bereichen lagen, erwies sich eine eindeutige Interpretation der Daten als wenig sinnvoll (Thommes, 2015).

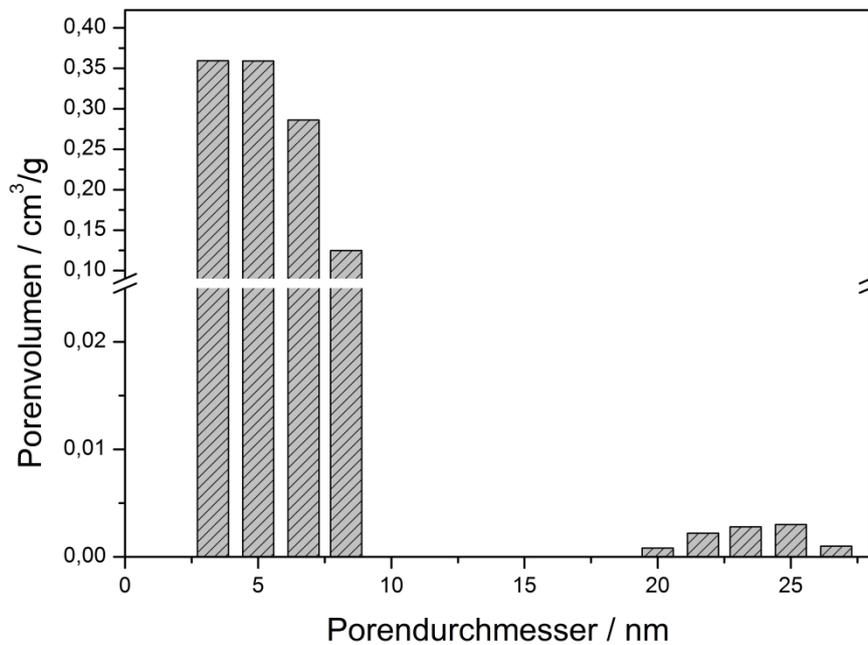


Abbildung 52: Verteilung der Porendurchmesser im Sol-Gel-Glas.

Wider Erwarten lagen die bestimmten mittleren Porendurchmesser bei etwa 5 nm (siehe Abbildung 52). Ein IgG-Antikörper hat eine Größe von etwa 10 nm im aktiven Zustand und wie im weiteren Verlauf der Arbeit beschrieben wird, zeigte er in eingekapselter Form eine hohe Abreicherungseffizienz. Die erwartete Porengröße sollte also mindestens 10 nm betragen. Erklärt werden kann diese Diskrepanz durch die notwendige Probenvorbereitung. Die Bestimmung der Sorptionsisotherme beinhaltet die Probenevakuierung für zwei Stunden bei 25 °C, damit adsorptiv gebundenes Wasser oder organisches Lösungsmittel (MeOH) entfernt werden. Während dieses Vorgangs läuft der Polymerisationsprozess des Sol-Gels weiter ab, auch unabhängig von mehreren vorangegangenen Waschschritten mit Wasser, um die Salzsäure, welche als Reaktionskatalysator fungiert, zu entfernen. Kleinere Porendurchmesser waren das Resultat.

Für die spätere Anwendung in der Immunofiltration befand sich das Säulenmaterial stets in wässriger Umgebung, eine weitere Polymerisation wurde damit ausgeschlossen.

4.4 Reproduzierbarkeit und Lagerstabilität

Neben der Optimierung und Charakterisierung der Sol-Gel-Glas-Matrix sind die Reproduzierbarkeit der Herstellung des Säulenmaterials und dessen Lagerstabilität entscheidende Faktoren für die spätere effiziente Anwendung als Biofilter. Mit dem murinen Antikörper MC10E7 (GAM) wurde die Reproduzierbarkeit innerhalb einzelner Sol-Gel-Glas-Chargen für

die Herstellung der Immunfiltrations-Säulen und die Stabilität über einen Monat getestet. Ebenfalls wurde in diesem Zusammenhang der Effekt der Trocknungsdauer im Bereich von ein bis drei Tagen geprüft. Hierzu wurden Säulen jeweils an unterschiedlichen Tagen aus den jeweiligen Sol-Gel-Glas-Ansätzen hergestellt und jeweils 0,5 mg Antikörper in 0,5 g Matrix immobilisiert. Die Beladung der Säulen erfolgte mit 4 µg MC-LR. Die resultierten Bindungskapazitäten sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 21: Reproduzierbarkeit und Effekte der Lagerung auf die Bindungskapazität von MC10E7-Säulen (0,5 mg Antikörper (GAM) eingekapselt in 0,5 g Sol-Gel-Glas. Beladung mit 4 µg MC-LR in 10 % MeOH/dest. H₂O).

Ansatz	Lagerung	Sol-Gel-Trocknung	Bindungskapazität
1	Direkt verwendet	3 Tage	51 %
2	Direkt verwendet	3 Tage	54 %
3	12 Tage 4°C in PBS	5 Tage	55 %
4	13 Tage 4°C in PBS	1 Tag	52 %
5	31 Tage 4°C in PBS	3 Tage	47 %

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Bindungskapazitäten in Abhängigkeit vom Sol-Gel-Ansatz und der Lagerung in PBS bei 4 °C über den getesteten Zeitraum von 31 Tagen. Dies deutet auf eine gleichbleibend hohe Antikörperfunktionalität in der Sol-Gel-Glas-Matrix während des gesamten Lagerungsprozesses hin. Ein Vorteil der mesoporösen Struktur der Sol-Gel-Glas-Matrix ist der Schutz der Antikörper vor einem möglichen Abbau durch eventuell mikrobielle Kontaminanten. Diese Organismen sind zu groß, um in die Poren zu diffundieren. Auf den Zusatz von zum Beispiel NaN₃ während der Lagerung kann demnach verzichtet werden. Weiterhin konnte in diesem Zusammenhang beobachtet werden, dass auch eine Variation in der erforderlichen Zeit des Trocknungsprozesses, der wie bereits unter Punkt 4.2.1 in Kapitel IV gezeigt und je nach Dimension des Glasgefäßes variierte, keinen merklichen Effekt auf die Bindungskapazität hatte. Dies zeigt eine hohe Stabilität der immobilisierten Antikörper auch gegen punktuell auftretende höhere MeOH-Konzentration, bedingt durch den Polymerisationsprozess, auf. Auf diesen Ergebnissen basierend besteht also die Möglichkeit, größere Mengen des Säulenmaterials aus einer Sol-Gel-Charge zu produzieren und dieses bis zur Verwendung mindestens einen Monat bei 4 °C zu lagern.

4.5 Elution und Wiederfindung

Neben einer hohen Abreicherungseffizienz ist auch die Möglichkeit einer Regenerierung und Wiederverwendung unter Umständen ein entscheidender Parameter, um kostengünstige Biofilter für die Entfernung von MC-LR herstellen zu können. Wenn dies vollständig unter milden Bedingungen möglich ist, kann eine erneute Verwendung der Säule in Betracht gezogen werden.

Nach der Probenaufgabe und dem Waschvorgang folgte die Elution der spezifisch an die Antikörper gebundenen Analyten. Bei diesem Teilschritt der Immunofiltration galt es eine hohe Wiederfindung bei möglichst niedrigen Elutionsvolumina zu erzielen.

4.5.1 Vorversuche für die Elution

Um Antikörper einzusparen, wurden vor den Immunofiltrationsexperimenten zunächst Vorversuche im ELISA-Format durchgeführt, um geeignete Reagenzien für eine optimale Elution von MC-LR zu ermitteln. Die Auswahl reichte dabei von organischen Lösungsmitteln (80 % ACN, DMF), über chaotrope Reagenzien (3 M MgCl_2 mit 75 mM HEPES) und Detergenzien (0,1 % SDS/dest. H_2O) bis hin zu Substanzen, die eine pH-Wertverschiebung induzieren (100mM Gly-HCl, pH 3,0 bzw. 2 mM NaOH, pH 11) (siehe Punkt 4.2 in Kapitel III).

Um die Stabilität und Funktionalität des Antikörpers in Anwesenheit der Elutionsreagenzien zu testen und damit den Elutionsprozess zu simulieren, wurden Kalibrierkurven unter Verwendung dreier unterschiedlich dotierter MC10E7 (Protein G)-Lösungen beim Kompetitionschritt aufgenommen. Die erste Lösung enthielt MC10E7 in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS. Bei der zweiten Lösung wurde der Antikörper in einer 1:100-Verdünnung des Eluenten in PBS mit einer MC10E7 (Protein G)-Konzentration von 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hergestellt. Die dritte Lösung enthielt den Antikörper im unverdünnten Eluenten und wurde nach zehnminütiger Inkubation 1:100 mit PBS verdünnt. Die finale MC10E7-Konzentration betrug ebenfalls 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Diese experimentelle Vorgehensweise simuliert den Elutionsschritt bei der Immunofiltration, bei der der Antikörper für eine kurze Zeitspanne mit dem Elutionsreagenz in Kontakt kommt. In Abbildung 53 sind die Ergebnisse dargestellt. Dabei wurde die relative Differenz aus oberer und unterer Asymptote ($A_1 - A_2$) der Kalibrierkurve als Vergleichsparameter herangezogen, da diese im vorliegenden Fall am aussagekräftigsten war. Diese hängt allerdings auch von anderen Faktoren, wie beispielsweise der Färbedauer und Temperatur ab, weshalb für die Vergleichbarkeit der einzelnen Eluenten (*Interassay*) der $A_1 - A_2$ -Wert für PBS jeweils auf eins normiert wurde.

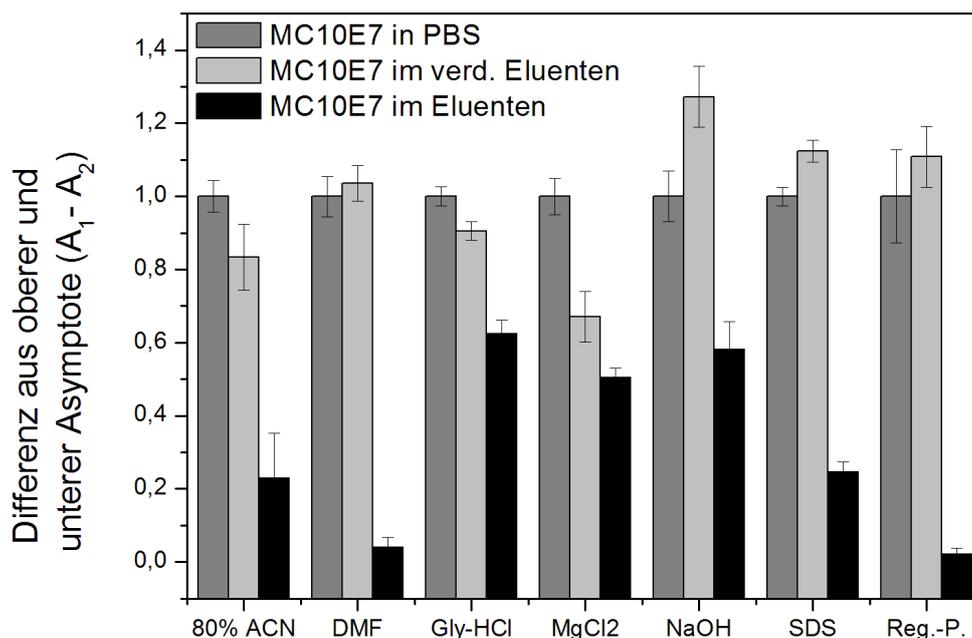


Abbildung 53: Einfluss von unterschiedlichen Elutionsreagenzien auf die Funktionalität von MC10E7 (Protein G) im indirekt kompetitiven ELISA-Format.

Der Effekt der verdünnten Eluenten auf die Funktionalität von MC10E7 (Protein G) im ELISA war bei allen verwendeten Elutionsmitteln marginal. Deutlichere Unterschiede ergaben sich allerdings bei der Verwendung der unverdünnten Eluenten. Nach zehnminütiger Inkubation mit dem Elutionsreagenz war es sowohl für den Regenerationspuffer als auch für DMF nicht möglich Kalibrierkurven zu generieren. Die relative Differenz betrug weniger als 0,1. Dies spricht für eine Denaturierung des Proteins, was eine Wiederverwendung der Säule somit wahrscheinlich ausschließt. Ähnliches Verhalten zeigten 80 % ACN und SDS, allerdings waren noch relative Differenzen von leicht über 0,2 zu verzeichnen. Mit Glycin-HCl, NaOH und MgCl₂ war es möglich, Kalibrierkurven zu generieren, auch wenn die Differenz zwischen A₁ und A₂ <1 war. Dies deutet auf eine nur partiell irreversible Konformationsänderung des Proteins hin. Sollte eine Wiederverwendung der Säule in Betracht gezogen werden, so scheinen die letzten drei Elutionsreagenzien am geeignetsten. Müssen drastischere Bedingungen gewählt werden, um den Antikörper-Antigen-Komplex zu lösen und MC-LR zu eluieren, so kommen 80 % ACN, SDS und der Regenerationspuffer in Frage. Aufgrund der Toxizität von DMF wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

4.5.2 Elution: NHS-aktivierte Agarose

Die ersten Elutionsversuche mit den als gut geeignet beurteilten Elutionsreagenzien wurden nicht mit Sol-Gel-Glas-Immundefiltrationssäulen durchgeführt, da die unter Punkt 4.2.3 in Kapitel IV benötigten Antikörpermengen von 500 µg im Verlauf des Projekts zeitweise nicht vorhanden waren, sondern nur Mengen von 166 µg.

Der Antikörper MC10E7 (GAM, 166 µg) wurde kovalent über freie Aminogruppen an eine NHS-aktivierte Agarose-Matrix gebunden (über Nacht). Es folgte ein Waschschriff, der zur Quantifizierung des nicht gebundenen Antikörpers diente und ein 20 minütiger Blockierungsschritt mit Ethanolamin. Das Absättigen der aktivierten Agaroseoberfläche mit freien Aminogruppen führt zu einer deutlichen Reduzierung der unspezifischen Wechselwirkung zwischen Säulenmaterial und Analyt. Anschließend wurde die Säule mit MC-LR beladen. Nach der Elution mit dem entsprechenden Elutionsreagenz wurden unter konstanten Bedingungen unterschiedliche Wiederfindungen erzielt. Für Glycin-HCl und MgCl₂ lagen die Werte unterhalb von 10 %. Der Einsatz von saurem pH-Wert bzw. chaotropen Reagenzien erwies sich damit als wenig geeignet, um hohe Wiederfindungen zu erreichen. Bessere Werte konnten für 80 % ACN und den Regenerations-Puffer mit 65 % bzw. 83 % erreicht werden. Um mögliche Interferenzen mit dem ELISA durch den hohen Salzgehalt des Regenerationspuffers und den damit verbundenen Aufreinigungsschritt vor den HPLC-MS-Messungen zu vermeiden, wurde für die nachfolgenden Sol-Gel-Glas-Experimente lediglich ACN als Elutionsreagenz weiter verfolgt.

4.5.3 Elution: Sol-Gel-Glas

Da die vorangegangenen Experimente zeigten, dass die Bindung zwischen Antikörper und Antigen mit den verwendeten Elutionsreagenzien nur schwer zu lösen ist, wurden in den nachfolgenden Experimenten mit Sol-Gel-Glas-Säulen teilweise sehr hohe ACN-Konzentrationen und Elutionsvolumina bis zu 21 mL verwendet. Das Ziel sollte stets eine möglichst vollständige Wiederfindung an MC-LR sein. Die Ergebnisse mit den jeweiligen Versuchsbedingungen sind Tabelle 22 zu entnehmen.

Tabelle 22: Zusammenfassung der Elutionsbedingungen mit ACN und unterschiedlichen Immunofiltrationssäulen.

Antikörper^a	Menge / mg	MC-LR gebunden^b / µg	Konz. ACN in %	ACN Volumen / mL	Wiederfin- dung in %
MC10E7	0,5	2,86	80	21	76
MC10E7	0,5	4,0	60	15	57
MC10E7	0,5	0,97	50	15	69
MC10E7	0,5	3,6	40	5	46
MC10E7	0,5	1,9	40	5	56
MC10E7H	2,2	16,5	70	75	92 ^c
MC10E7H	0,5	3,5	70	15	75 ^d
MC10E7H	0,5	2,8	70	15	73
MC10E7H	0,4	3,3	50	10	67
MC10E7H	0,36	1,87	50	10	76

^a Immobilisierte Antikörper: MC10E7 (GAM) bzw. MC10E7H (Protein G), ^b aufgegebene Mengen an MC-LR lagen zwischen 2,2 µg und 18 µg, Toxinaufgabe jeweils in 10 % MeOH/dest. H₂O, außer: ^c Starnberger See, ^d Ammersee.

Die resultierenden Werte zeigten sowohl für MC10E7 als auch für MC10E7H, dass hohe ACN-Konzentrationen und Elutionsvolumina benötigt wurden, um akzeptable Wiederfindungen zu erhalten. Dies liegt darin begründet, dass die Immobilisierung in die Sol-Gel-Glas-Matrix zu einem protektiven Effekt der Antikörper führt. Die sanfte Fixierung lässt so eine Strukturänderung, wie sie durch ACN induziert werden würde, nicht mehr zu. Hohe benötigte ACN-Konzentrationen und Elutionsvolumina sind das Resultat. Zühlke et al. zeigten in einer vergleichbaren Arbeit, dass die Wiederfindungen bei Beladungen weit oberhalb der Durchbruchskapazität, wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall war, zunehmend schlechter werden (Zühlke, 1995). Da in der vorliegenden Arbeit die Säulen allerdings genutzt werden sollten, um verhältnismäßig große Mengen an MC-LR quantitativ aus Oberflächenwasser abzureichern, wurde auf eine weitere Optimierung hinsichtlich besser Wiederfindungen verzichtet.

5 Immunofiltration: Abreicherung von MC-LR

Nach der Optimierung und Charakterisierung der Sol-Gel-Glas-Matrix wurden Abreicherungsexperimente von MC-LR aus unterschiedlichen Wasserproben durchgeführt. Die Etablierung einer verlässlichen Methode für die Quantifizierung der Toxin- und Antikörpermengen war dafür der erste Schritt. Neben der *Bindungskapazität* wurde zudem die *Abreicherungseffizienz* bestimmt. Diese lässt sich durch den Quotienten aus der MC-LR-Menge, welche an das Säulenmaterial gebunden hat und der ursprünglich aufgegebenen Toxinmenge, berechnen und wird in Prozent angegeben (vergleiche Punkt 4.7 in Kapitel III)

Hinsichtlich der Durchführung der Abreicherung wurden im Folgenden drei unterschiedliche Verfahren betrachtet. Zunächst die sequentielle Abreicherung (stufenweise Analytzugabe) und der zyklische Betrieb (kontinuierliche Analytzugabe) im klassischen Säulenformat. Beide Methoden wurden unter Punkt 4.5.1 und 4.5.2 in Kapitel III beschrieben. Bei der Anwendung des Säulenformats können die vier Teilschritte der IAC (Antikörperimmobilisierung, Probenaufnahme, Waschschrift und Elution) durchgeführt werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde zudem das Abreicherungspotential unter turbulenten Abreicherungsbedingungen (Schwebebettverfahren) getestet.

5.1 Toxin- und Antikörperquantifizierung

5.1.1 Quantifizierung der MC-LR-Menge mittels ELISA und HPLC-MS

Aufgrund der hohen Probenzahl für die einzelnen Immunofiltrations-Experimente, den niedrigeren Kosten und des geringeren Zeitaufwands wurde der indirekt kompetitive ELISA für die MC-LR-Quantifizierung (in Durchlauf, Waschfraktion und Eluat der Immunofiltrations-Experimente) verwendet. Zur Validierung des ELISAs wurden Einzelproben zusätzlich mittels HPLC-MS quantifiziert. Diese orthogonale Messmethode erlaubt eine Aussage über die Genauigkeit der Ergebnisse. Zur graphischen Darstellung wurden die Konzentrationen gegeneinander aufgetragen und unter Berücksichtigung der jeweiligen Standardabweichungen ($\pm 1 \cdot s$) eine lineare Regression durchgeführt (siehe Abbildung 54). Bei Unabhängigkeit vom Messprinzip ist ein Steigungsparameter von 1 zu erwarten. Abbildung 54 zeigt eine Gerade mit einer Steigung von $1,056 \pm 0,01$ und einem y-Achsenabschnitt von $-0,03 \pm 5 \cdot 10^{-4}$, was eine hohe Übereinstimmung beider Messmethoden zum Ausdruck bringt.

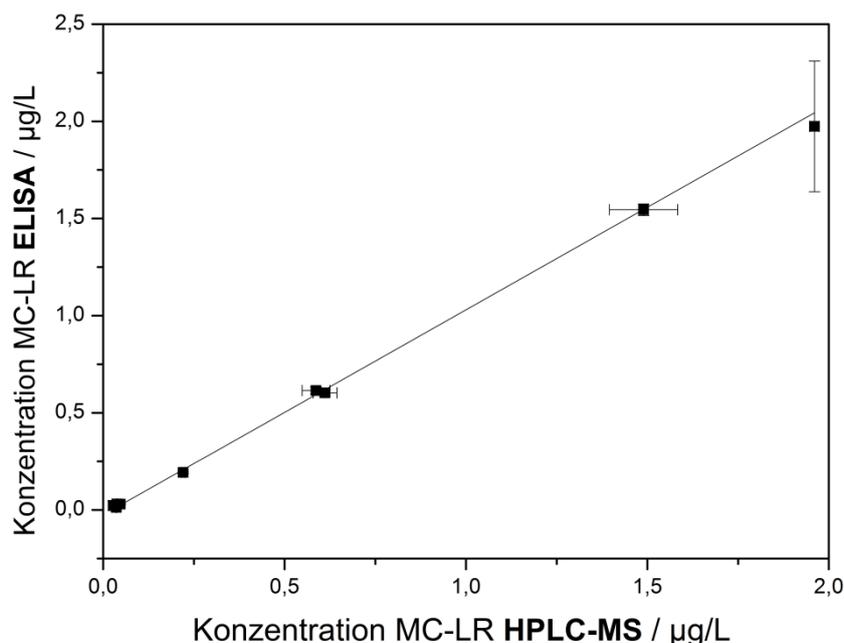


Abbildung 54: Vergleich der MC-LR Konzentration, bestimmt mittels ELISA und HPLC-MS (jeweils $n=9$ und $m=3$).

Für die Vergleichbarkeit der Messmethoden kann neben der Auftragung auch der t-Test als statistisches Instrument verwendet werden. Der Zweistichproben-t-Test trifft eine Aussage über die Unterschiede der Mittelwerte zweier unabhängiger Proben. Bei einem angenommenen Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ wurde ein p-Wert von 0,91 bestimmt. Dieser besagt, dass der Unterschied zwischen beiden Methoden eindeutig nicht signifikant ist, sodass die Ergebnisse statistisch gesehen konkordant sind.

5.1.2 Quantifizierung der nicht immobilisierten Antikörpermenge

Häufig verwendete Methoden zur Proteinquantifizierung wie der Biuret-, Lowry-, BCA- oder Bradford-Test, haben Detektionsgrenzen im Bereich zwischen $0,05 \mu\text{g/mL}$ und $10 \mu\text{g/mL}$ bei Probenvolumina zwischen $0,1 \text{ mL}$ und 1 mL (Lottspeich, 2012). In den ersten Versuchen zeigte sich, dass die Antikörperkonzentrationen in den Waschfraktionen, die direkt nach dem Packen der Säulen erhalten wurden, deutlich geringer waren. Daher wurde das indirekt nicht-kompetitive ELISA-Format in der vorliegenden Arbeit stets zur Antikörperquantifizierung verwendet. Die Kalibrierung erfolgte mit MC10E7-Lösungen (GAM) im Bereich zwischen 1109 ng/mL und $1,39 \text{ ng/mL}$. Der erhaltene LAB wurde zwischen 20 % und 80 % der maximalen Absorption gewählt und lag zwischen 17 ng/mL und 335 ng/mL . In allen Experimenten, bei denen $0,5 \text{ mg}$ des Antikörpers eingekapselt wurde, wurden in den Waschfraktionen maximal $15 \mu\text{g}$ Antikörper bestimmt. Dies entsprach etwa 3 % der aufgegebenen Antikörpermenge.

5.2 Abreicherung mittels sequentieller Probenaufgabe

5.2.1 Bestimmung der maximalen Bindungskapazität

Um die maximal mögliche Bindungskapazität bei der sequentiellen Toxinaufgabe zu testen, wurden drei Säulen, in denen je 0,5 mg des murinen Antikörpers MC10E7 (GAM) immobilisiert waren, mit der MC-LR-Menge, die theoretisch maximal gebunden werden kann (6,63 µg) schrittweise beladen. Die Gleichgewichtseinstellung zwischen Antikörper und Antigen wird entscheidend durch die Kontaktzeit bestimmt. Um dieser Limitierung entgegenzuwirken, wurde eine möglichst lange Kontaktzeit dadurch gewährleistet, dass die einzelnen Fraktionen (zehnmal je 1 mL einer 663 µg/L MC-LR-Lösung in 10 % MeOH/dest. H₂O) aufgegeben und bei verschlossener Säule inkubiert wurden. Nach fünf Minuten wurde die Säule geöffnet, der Durchfluss gesammelt und die nächste Fraktion aufgegeben. Toxin-Mengen im Bereich zwischen 4,28 µg und 5,97 µg waren gebunden, was Bindungskapazitäten im Bereich zwischen 65 % und 90 % entspricht. Bei der Durchführung von klassischen Säulenexperimenten mit einer kontinuierlichen Toxinaufgabe ist zu erwarten, dass die Werte niedriger ausfallen. So könnten die kürzeren Verweilzeiten im Säulenbett dazu führen, dass es zu keiner Gleichgewichtseinstellung zwischen Antikörper und Antigen führt. Daraus resultieren niedrigere Bindungskapazitäten.

5.2.2 Bestimmung der Durchbruchskurven

Der Durchbruchwert einer Säule wird ganz klassisch als die gebundene Menge an Analyt beschrieben, die in der stationären Phase angereichert wird, bis die Kapazität der stationären Phase nicht mehr ausreicht und zunächst kleine Mengen des Analyten im Durchfluss zu finden sind. Wann dieser Durchbruch geschieht, hängt in erster Linie von der Interaktion zwischen Trägermaterial und mobiler Phase ab, im vorliegenden Fall also zwischen Antikörper und Antigen. Diese wiederum kann durch Parameter wie die Flussrate, die Analytkonzentration und kinetische Faktoren, wie beispielsweise dem K_d -Wert der Antikörper, beeinflusst werden. Um die Durchbruchskurven für zwei Säulen ohne Antikörper (*blank*-Säule: 0,5 g Sol-Gel-Glas-Matrix, γ -Globulin: 0,5 mg γ -Globulin eingekapselt in jeweils 0,5 mg Sol-Gel-Glas) und zwei Antikörper-Säulen (jeweils 0,5 mg Antikörper eingekapselt in 0,5 mg Sol-Gel-Glas, Gewichtsverlust 50 %) zu bestimmen, wurde jeweils schrittweise eine MC-LR-Lösung in 1-mL-Schritten (50 ng für MC10E7H und 100 ng für die beiden Säulen ohne Antikörper und MC10E7 Säulen) auf die Säulen aufgegeben und der Durchfluss fraktioniert gesammelt. Die erhaltenen Durchbruchskurven sind in Abbildung 55 dargestellt.

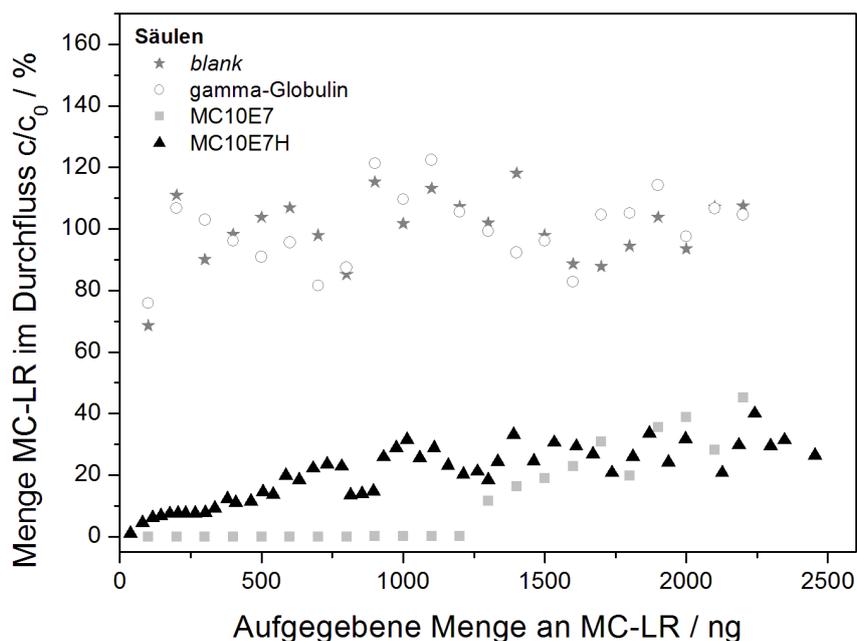


Abbildung 55: Durchbruchskurven für unterschiedliche Säulen ohne Antikörper (*blank*-Säule: 0,5 g Sol-Gel-Glas-Matrix, γ -Globulin: 0,5 mg γ -Globulin eingekapselt in 0,5 mg Sol-Gel-Glas) und Antikörper-Säulen (jeweils 0,5 mg Antikörper eingekapselt in 0,5 mg Sol-Gel-Glas). Die MC-LR-Lösung (10 % MeOH/dest. H₂O) wurde schrittweise in 1 mL-Fractionen mit jeweils 50 ng (für MC10E7H) und 100 ng (für die Säulen ohne Antikörper und MC10E7 (GAM) Säule) aufgegeben.

Der Durchbruchwert wurde in der vorliegenden Arbeit als die Menge an MC-LR definiert, ab der 10 % der anfangs aufgegebenen MC-LR-Menge im Durchfluss zu finden waren. Sowohl für die *blank*-, als auch für die γ -Globulin-Säule erfolgte der Durchbruch unmittelbar nach der Aufgabe der ersten MC-LR-Fraktion. Die Unterschiede bei den Wiederfindungen in den einzelnen Fraktionen zwischen etwa 80 % und 120 % könnten durch Größenausschluss in der porösen Sol-Gel-Glas-Struktur hervorgerufen worden sein. Toxinmoleküle, die in der vorangegangenen Fraktion nicht mit quantifiziert wurden und somit zu einer vermeintlichen Unterbestimmung führten, wurden mit einer der nächsten Fraktionen ausgespült, was dann zu einer vermeintlichen Überbestimmung führte. Bei den Durchbruchskurven für die Antikörper-Säulen wurde für MC10E7 (GAM) ein Wert von 1,2 μ g erzielt, für MC10E7H erfolgte der Durchbruch bereits nach 336 ng. Im indirekt kompetitiven ELISA zeigten die beiden Antikörper aber nur marginale Unterschiede in ihrem Bindungsverhalten. Entgegen der Erwartungen wurden bei der Bestimmung des Durchbruchwertes signifikante Unterschiede erhalten. Diese könnten darin begründet sein, dass sich die Antikörper-Antigen-Gleichgewichtseinstellung bei MC10E7 schneller vollzieht, im Vergleich zu MC10E7H. Die Zeitspanne für eine mögliche Gleichgewichtseinstellung beträgt beim ELISA während des Competitionsschrittes eine Stunde, bei den Immunofiltrationsexperimenten hingegen nur etwa eine Minute. Differenzen im Bindungsverhalten wären so in den Säulenversuchen

offensichtlicher im Vergleich zum ELISA. Auch die mittels SPR und ITC bestimmten Unterschiede im Dissoziationsverhalten beider Antikörper würden diese Vermutung untermauern, da die Kontaktzeit hierbei wie bei den Säulenversuchen nur einige Minuten beträgt.

Mögliche Stellparameter, um den Durchbruchswert zu erhöhen, wären folglich vor allem jene, die eine Antikörper-Antigen-Gleichgewichtseinstellung ermöglichen. Dazu wäre in erster Linie eine längere Verweilzeit des Toxins in der Sol-Gel-Glas-Matrix sinnvoll. Um dies zu testen, wurde eine weitere MC10E7H-Säule hergestellt (0,5 mg Antikörper in 0,5 g Sol-Gel-Glas) und schrittweise mit einer MC-LR-Lösung beladen (1. Fraktion 25 ng, 2.–30. Fraktion 50 ng, 0,5 bzw. 1 mL Fraktionen in 10 % MeOH/dest. H₂O). Jede Fraktion wurde nach Aufgabe und dreiminütiger Verweilzeit im Säulenbett gesammelt und anschließend erneut aufgegeben. Dieser Schritt wurde bei jeder Fraktion jeweils dreimal durchgeführt. Die erhaltene Durchbruchskurve ist Abbildung 56 zu entnehmen.

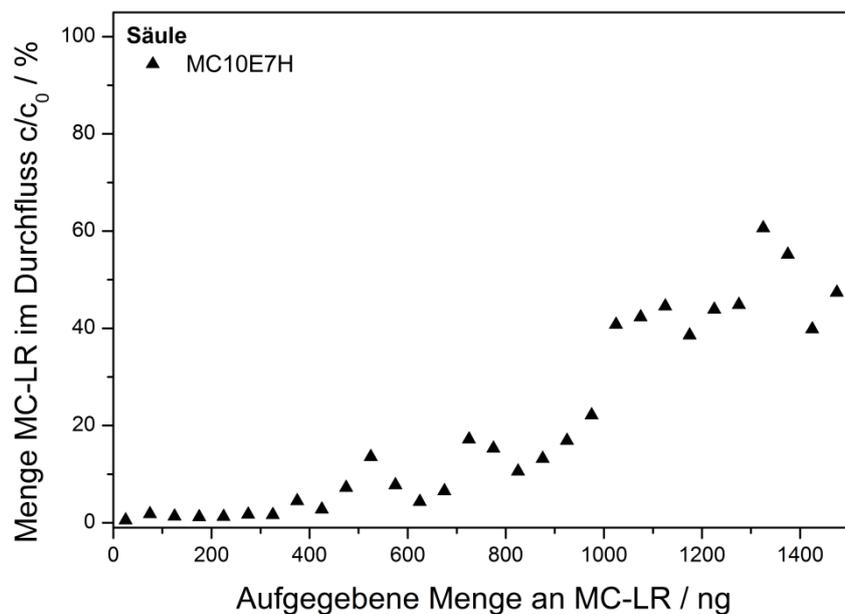


Abbildung 56: Durchbruchskurve für MC10E7H (0,5 mg Antikörper in 0,5 g Sol-Gel-Glas-Matrix). Bedingungen: 1. Fraktion 25 ng MC-LR, Fraktionen 2–30 jeweils 50 ng MC-LR (jeweils in 10 % MeOH/dest. H₂O). Dreimalige Aufgabe jeder Fraktion mit jeweils dreiminütiger Verweilzeit im Säulenbett.

In diesem Fall wurde ein Durchbruchswert von 475 ng MC-LR für MC10E7H erreicht, was eine Verbesserung um 139 ng im Vergleich zu der nur einmaligen Toxinaufgabe ohne Verweilzeit im Säulenbett darstellt. Bezogen auf den ermittelten Durchbruchswert für MC10E7 von 1,2 µg ist dies allerdings nur eine marginale Verbesserung. Eine weitere Erhöhung der Verweilzeit im Säulenbett wurde hinsichtlich des experimentellen Aufwands und der erwarteten nur geringen Verbesserung nicht weiterverfolgt.

Der einzige Unterschied zwischen beiden Antikörpern liegt in den unterschiedlichen konstanten Regionen. Daraus resultieren beispielsweise unterschiedliche pI-Werte, die basierend auf der Antikörper kodierenden Aminosäuresequenz berechnet werden können (<https://www.protpi.ch/Calculator/ProteinTool>). Diese Berechnungen ergaben deutliche Unterschiede der pI-Werte, die zwischen 6,0 und 6,3 bei MC10E7 (komplett murin) und zwischen 8,3 und 8,9 bei MC10E7H (chimärer Antikörper) lagen. Bei diesen pH-Werten liegen die Antikörper in Lösung ungeladen vor und weisen somit keine Nettoladung auf. Inwieweit diese Differenzen einen Effekt auf die Durchbruchswerte haben konnten, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt.

5.3 Abreicherung im kontinuierlich zyklischen Betrieb

Die vorangegangenen Experimente, bei denen nach sequentieller Addition von MC-LR der Durchbruchswert bestimmt wurde (Punkt 5.2.2 in Kapitel IV), zeigten leichte Unterschiede im Bindungsverhalten zwischen MC10E7 und MC10E7H. Um die möglicherweise längere benötigte Zeit für die Gleichgewichtseinstellung von MC10E7H zu kompensieren, wurden die nachfolgenden Experimente im kontinuierlich zyklischen Betrieb (siehe Punkt 4.6.2 in Kapitel III) über Nacht durchgeführt. Dies erhöht statistisch gesehen die Wahrscheinlichkeit, dass jedes verfügbare Paratop ein MC-LR-Molekül bindet und erhöht dadurch auch die Möglichkeit einer Antikörper-Antigen-Gleichgewichtseinstellung. Dies wiederum könnte zu höheren Abreicherungseffizienzen führen. Um den kontinuierlich zyklischen Betrieb in der Praxis zu realisieren, wurde die über die Säule geleitete Toxin-Lösung wieder in das Ausgangsgefäß zurückgeführt. Die Literatur zeigt, dass eine Flussgeschwindigkeit im Bereich zwischen 0,5 mL/min und 1 mL/min geeignet erscheint, um eine Bindung zwischen Antikörper und Antigen bestmöglich zu gewährleisten (Cichna-Markl, 2006). Basierend auf diesem Ergebnis wurden die nachfolgenden Experimente stets bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 mL/min durchgeführt. Die Homogenität der Toxin-Lösung wurde während der Experimente durch stetiges Rühren gewährleistet.

Für die Abreicherungsexperimente von den mit MC-LR versetzten Proben wurden drei verschiedene Oberflächengewässer verwendet. Um eine Abschätzung hinsichtlich der unter Punkt 3.1 in Kapitel IV erwähnten Störsubstanzen auf die Antikörper-Antigen-Interaktion treffen zu können, wurden die Oberflächengewässer auf relevante Inhaltsstoffe untersucht. Die Charakterisierung erfolgte hinsichtlich des Gehalts an chaotropen Ionen (Ca^{2+} und Mg^{2+}),

DOC, sowie dem pH-Wert und der Leitfähigkeit (σ). Die erhaltenen Daten sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Tabelle 23: Zusammenfassung einiger Inhaltsstoffe von den in den nachfolgenden Experimenten verwendeten Oberflächen-gewässern (n=3).

Probe	Ca²⁺ mg/L	Mg²⁺ mg/L	DOC mg/L	σ $\mu\text{S/cm}$	pH-Wert -
Starnberger See	41,5±0,5	14,5±0,5	4,6±0,0	335,0±0,5	7,99
Ammersee	54,4±0,2	17,7±0,1	5,1±0,1	389,4±0,0	8,26
Windach	91,7±0,8	26,2±0,2	4,7±0,0	607,0±0,0	8,09

In vorangegangenen Experimenten zeigte sich, dass ELISA-Messungen bis zu einer Ca²⁺-Konzentration von etwa 60 mg/L und einer Huminsäurekonzentration von bis zu 40 mg/L verlässlich sind. Für die nachfolgenden Abreicherungsexperimente aus Starnberger See- und Ammerseewasser wurden demzufolge keine Matrixeffekte erwartet, die die Abreicherungs-effizienz bei der Immunfiltration verschlechtern würden. Lediglich das Oberflächenwasser auf dem Fluss Windach zeigte mit einer Ca²⁺-Konzentration von 91,7 mg/L einen höheren Wert als die als unbedenklich im ELISA bestimmte Konzentration. Dies muss bei der Interpretation der erhaltenen Daten berücksichtigt werden.

5.3.1 Abreicherung mit affinitätsaufgereinigten Antikörpern

Um das Potential der rekombinant in *Nicotiana* hergestellten Antikörper hinsichtlich der Abreicherungs-effizienz von MC-LR aus Realproben bewerten zu können, wurden zunächst affinitätsaufgereinigte Antikörper (MC10E7 GAM, MC10E7H Protein G) verwendet. Etwaige Matrixeffekte, die auf die Anwesenheit von Fremdproteinen aus Pflanzen zurückzuführen sind, welche während des Herstellungsprozesses von MC10E7H als Begleitstoffe auftreten, können somit ausgeschlossen werden.

Abreicherungs-effizienzen in Abhängigkeit von der (Realproben-)Matrix

Anhand des monoklonalen Antikörpers MC10E7 (GAM) wurde zunächst die Abreicherungs-effizienz in Abhängigkeit von der gewählten Matrix untersucht. Hierfür wurden Säulen-Experimente (0,5 mg des in 0,5 g Sol-Gel-Glas immobilisierten MC10E7) mit vier verschiedenen Wasserproben (dest. H₂O, 10 % MeOH/dest. H₂O, Starnberger See, Windach) durchgeführt. Die ermittelten Abreicherungs-effizienzen, Bindungskapazitäten und gebundenen MC-LR-Mengen sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tabelle 24: Abreicherungs-effizienzen, Bindungskapazitäten und gebundene MC-LR-Mengen in Anhängigkeit on der Probenmatrix. Die Antikörper-Säulen (0,5 mg MC10E7 (GAM) in 0,5 g Sol-Gel-Glas eingekapselt) wurden mit je 4 µg MC-LR beladen (40 mL, 100 µg/L MC-LR, kontinuierlich zyklische Abreicherung über 16–20 Stunden, Flussrate von 0,5 mL/min).

Medium	Abreicherungs-effizienz	Bindungs-kapazität	Menge MC-LR ^a / µg
Dest. H ₂ O	85 %	52 %	3,4
10% MeOH/dest. H ₂ O	91 %	55 %	3,8
Starnberger See	92 %	56 %	3,7
Windach	92 %	56 %	3,7

^a Menge an MC-LR die gebunden wurde (bezogen auf 0,5 g Sol-Gel-Glas mit 0,5 mg MC10E7 (GAM))

Für alle durchgeführten Experimente lagen die Abreicherungs-effizienzen im Bereich zwischen 85 % und 92 %, was 3,4–3,7 µg MC-LR pro 0,5 g Sol-Gel-Glas-Matrix entspricht. Es sind keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit der verwendeten (Realproben-)Matrix zu erkennen. Die höhere Ca²⁺-Konzentration im Windachwasser schien keinen Effekt auf die Antikörperfunktionalität zu haben. Der Grund könnte der proteinstabilisierende Effekt der Sol-Gel-Glas-Matrix sein. Die Bindungskapazitäten zwischen 52 % und 56 % deuten darauf hin, dass im Mittel jedes zweite Paratop ein MC-LR-Molekül bindet.

Abreicherung aus Oberflächengewässern

Die vorangegangenen Ergebnisse zeigten, dass die Verwendung von Realproben keinen signifikanten Einfluss auf die Abreicherungs-effizienz im Vergleich zu dest. H₂O hat. Um die Resultate zu verifizieren, wurden Experimente mit zwei Oberflächengewässern (Starnberger See und Ammersee) und Immunofiltrationssäulen basierend auf MC10E7 (GAM) und MC10E7H durchgeführt.

Um die Abreicherungs-effizienz während des Abreicherungsprozesses zu verfolgen, wurden Aliquote (je 100 μL) zu verschiedenen Zeiten aus den abzureichernden Starnberger See-Proben entnommen und auf ihren Toxingehalt hin untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 57 dargestellt.

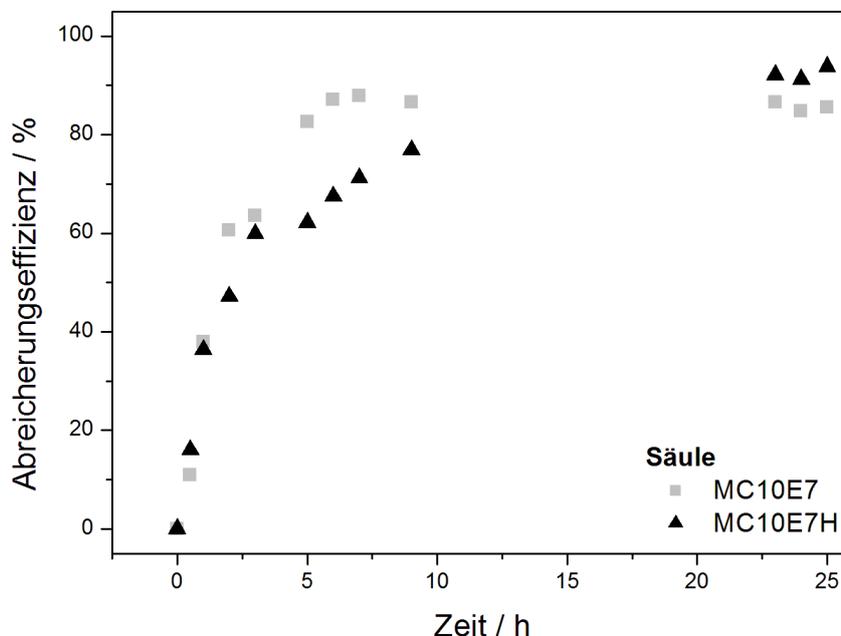


Abbildung 57: Kontinuierlich zyklische Abreicherung zweier mit MC-LR versetzten Starnberger See-Proben (40 mL, 104 $\mu\text{g/L}$ MC-LR) über 25 Stunden. Säulen mit jeweils 0,5 mg immobilisiertem Antikörper (MC10E7 (GAM) und MC10E7H) in jeweils 0,5 g Sol-Gel-Glas.

Zu Beginn (Stunde 0,5 bis 4) des Experiments zeigten sich kaum Unterschiede hinsichtlich der Abreicherungs-effizienz in Bezug auf den immobilisierten Antikörper. Erst ab Stunde vier wurde deutlich, dass die Säule mit dem eingekapselten murinen Antikörper die Sättigungsphase schneller erreicht als der chimäre Antikörper. Grund hierfür könnte der mittels SPR und ITC ermittelte größere k_d -Wert sein, der eine leichtere Dissoziation vom Antigen erwarten lässt. Während der Sättigungsbereich bei MC10E7 bereits nach zehn Stunden erreicht war, wurde er bei MC10E7H offenbar erst zwischen Stunde 11 und 22 erreicht.

Die resultierten Abreicherungs-effizienzen, Bindungskapazitäten und MC-LR-Mengen sind in Tabelle 25 zusammengefasst.

Tabelle 25: Zusammenfassung der Abreicherungs-effizienzen, Bindungskapazitäten und gebundenen Menge an MC-LR für den Starnberger See und Ammersee. Jeweils 0,5 mg des Antikörpers immobilisiert in 0,5 g Sol-Gel-Glas. Kontinuierlich zyklische Abreicherung von jeweils 40 mL einer 104 µg/L bzw. 100 µg/L MC-LR-Lösung.

Antikörper	Probe	Abreicherungs-effizienz	Bindungs-kapazität	Menge MC-LR^a / µg
MC10E7	Starnberger See	86 %	52 %	3,4
MC10E7	Ammersee	81 %	49 %	3,2
MC10E7H	Starnberger See	94 %	57 %	3,8
MC10E7H	Ammersee	99 %	60 %	4,0
<i>Blank^b</i>	Ammersee	7 %	-	-

^a Menge an MC-LR, die gebunden wurde (bezogen auf 0,5 g Sol-Gel-Glas mit 0,5 mg Antikörper), ^b Unspezifische Bindung

Auch die Verwendung eines weiteren Oberflächenwassers (Ammersee) zeigte im Vergleich zum Starnberger See übereinstimmende Ergebnisse mit Abreicherungs-effizienzen von 86 % bzw. 81 % für MC10E7 und 94 % bzw. 99 % für MC10E7H. Auf die Menge an Sol-Gel-Glas bezogen, banden 3,3 µg MC-LR an 0,5 g des Sol-Gel-Glases, in dem 0,5 mg MC10E7 eingekapselt war. Hingegen waren es bei gleichen Bedingungen 3,9 µg des Toxins, wenn dieselbe Menge des rekombinanten Antikörpers eingekapselt ist. Diese Ergebnisse sind statistisch noch nicht vollständig abgesichert. Für diese Experimente sind weitere Antikörpermengen erforderlich. Der Vergleich mit der *blank*-Säule zeigte allerdings, dass der Mechanismus der Abreicherung auf der spezifischen Interaktion zwischen Antikörper und Antigen basiert. Die unspezifische Abreicherungs-effizienz von 7 % für die *blank*-Säule entspricht 280 ng an MC-LR. Dieser Wert entspricht in etwa den in Punkt 4.2.2 in Kapitel IV beschriebenen 202 ng MC-LR pro 0,5 g Sol-Gel-Glas-Matrix. Mit gebundenen MC-LR-Mengen im Bereich von 3,2 µg bis 3,4 µg pro 0,5 g des Sol-Gel-Glases für MC10E7 und 3,8 µg bis 4,0 µg für MC10E7H zeigte sich die entwickelte Immunofiltration als sehr effiziente Abreicherungsmethode. Vergleiche mit Werten aus der Literatur zeigen, dass es beispielsweise Tsutsumi et al. gelang, eine maximale Menge von 5 µg MC-LR pro 0,5 g Säulenmaterial abzureichern (Tsutsumi, 2000). In dieser Menge an Säulenmaterial waren allerdings 2,5 mg anti-MC-LR-Antikörper (M8H8) eingekapselt (Kondo, 1996). Dies entspricht der 5-fachen Antikörpermenge im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit dokumentierten Daten.

Skalierungsexperimente mit MC10E7

Mit dem murinen Antikörper MC10E7 (GAM) wurden Skalierungsexperimente in Hinblick auf die Abreicherung von größeren kontaminierten Wassermengen durchgeführt. Hierfür wurden unterschiedliche Mengen an Antikörper eingekapselt und die Menge an abzureicherndem MC-LR linear erhöht. Die Ergebnisse sind Tabelle 26 zu entnehmen.

Tabelle 26: Zusammenfassung der Abreicherungseffizienzen und Bindungskapazitäten dreier Sol-Gel-Gläser mit unterschiedlichen Mengen an eingekapseltem MC10E7 (GAM) (500 µg, 1000 µg und 2000 µg) in unterschiedlichen Sol-Gel-Glas-Mengen (0,5 g, 1 g und 2 g). Abreicherung von 80 mL, 160 mL und 320 mL einer 100 µg/L MC-LR-Lösung (Starnberger See) über 41 Stunden im kontinuierlich zyklischen Betrieb.

Menge an eingekapseltem MC10E7	Abreicherungseffizienz ^a	Bindungskapazität
500 µg	78 %	47 %
1000 µg	80 %	54 %
2000 µg	94 %	56 %

^a Auf Ausgangsmenge von 4 µg, 8 µg bzw. 16 µg MC-LR normierte Werte

Bei der Abreicherung von entsprechend größeren Toxinmengen ist keine Verschlechterung der Bindungskapazitäten zu verzeichnen. Die absolute Abreicherungseffizienz lässt sich allerdings nicht mit den vorangegangenen Ergebnissen vergleichen. Statt sonst 4 µg MC-LR zu Beginn des Experiments, wurde bei diesem Experiment die doppelte Menge des Toxins eingesetzt. Die erhaltenen Abreicherungseffizienzen wurden aus diesem Grund mit Faktor zwei multipliziert.

Dieses Experiment zeigt das große Potential für die spätere Abreicherung von größeren kontaminierten Wassermengen. Allerdings müssen bei einer weiteren Hochskalierung einige Parameter bedacht werden. Die Flussgeschwindigkeit von 0,5 mL/min ist bei der Abreicherung von großen Wasservolumina unpraktisch. Daher müssten deutlich größere Säulen mit größeren Packungsvolumina eingesetzt werden.

5.3.2 Abreicherung mittels MC10E7H-Zellpellet

Bei der Produktion von MC10E7H stellt die Aufreinigung mittels Protein G einen hohen Kostenfaktor dar. Um das Potential von weniger aufgereinigten Antikörpern hinsichtlich der MC-LR-Abreicherung zu testen, wurde ein Zellpellet immobilisiert. Dieses wurde nach der Zerkleinerung der Tabakblätter, einer pH-Veränderung und einer Ammoniumsulfatfällung in Form einer braunen feuchten Masse erhalten.

Für die experimentelle Durchführung wurden sowohl das MC10E7H-, als auch ein *blank*-Zellpellet ohne Antikörper (Gesamtgewicht jeweils etwa 165 mg bzw. 100 mg im feuchten Zustand) in je 2 mL PBS gelöst und anschließend die äquivalente Menge des Silikasols hinzugegeben. Die Abreicherung einer 100 µg/L MC-LR-Lösung (180 mL, Starnberger See) erfolgte ebenfalls im kontinuierlich zyklischen Betrieb über 18 Stunden.

Tabelle 27: Zusammenfassung der Abreicherungseffizienzen, Bindungskapazitäten und Mengen MC-LR pro 0,5 g Sol-Gel-Glas eines MC10E7H-Zellpellets (2,2 mg MC10E7H in 164 mg eines nassen Pellets) im Vergleich zu einem *blank*-Zellpellet in zwei Abreicherungszyklen (Je 180 mL Starnberger See, 100 µg/L MC-LR, 0,5 mL/min und über 18 Stunden im kontinuierlich zyklischen Betrieb).

Probe	Abreicherungseffizienz	Bindungskapazität	Menge MC-LR ^a / µg
1. Abreicherung	87 %	53 %	3,6
2. Abreicherung ^b	54 %	33 %	2,2
<i>Blank</i>	13 %	-	-

^aMenge an MC-LR die gebunden wurde (bezogen auf 0,5 g Sol-Gel-Glas mit 0,5 mg Antikörper), ^bNach Elution mit 70 % ACN

Während dem ersten Abreicherungszyklus wurden 87 % MC-LR (3,6 µg MC-LR pro 0,5 g Sol-Gel-Glas) aus der Realprobe abgereichert, was einer Bindungskapazität von 53 % entspricht (Tabelle 27). Diese Daten zeigen eine hohe Übereinstimmung mit den Daten, die mittels des über Protein G aufgereinigten MC10E7H erhalten wurden (vergleiche Punkt 5.3.1 in Kapitel IV). Die Zugänglichkeit der freien Paratope scheint in Anwesenheit der anderen Pflanzenzellbestandteile (z.B. Proteine, die ebenfalls mittels (NH₄)₂SO₄ ausgefällt wurden) nicht beeinflusst worden zu sein. Mit einer Abreicherungseffizienz des eingekapselten *blank*-Pellets von 13 %, was 2,34 µg entspricht, zeigte sich eine höhere unspezifische Bindung als bereits unter Punkt 4.2.2 in Kapitel IV beschrieben wurde. Dort waren es für 2,2 g der *blank*-

Sol-Gel-Glas-Matrix nur rund 839 ng. Allerdings müssen auch diese Werte aufgrund mangelnder Antikörpermengen noch weiter statistisch abgesichert werden.

Nach einem Elutionsschritt mit insgesamt 75 mL 70 % ACN konnte eine Wiederfindung des Toxins von 92 % erhalten werden. Daraufhin wurde die Säule ein zweites Mal unter denselben Bedingungen beladen, wobei eine reduzierte Abreicherungs-effizienz von 54 % erhalten wurde. Dies deutet darauf hin, dass selbst die harschen Elutionsbedingungen einen Großteil der eingekapselten Antikörper nicht irreversibel denaturieren und eine verbleibende Menge an funktionell gefaltetem Protein noch vorhanden ist. Diese Antikörper können im zweiten Abreicherungszyklus wieder MC-LR binden. Die unter Punkt 3.1.4 in Kapitel IV gezeigten Stabilitäten gegen organische Lösungsmittel zeigten, dass MC10E7H im indirekt kompetitiven ELISA-Format bereits bei ACN-Konzentrationen, die höher als 10 % lagen, deutlich schlechtere Nachweisstärken aufzeigt. Höhere ACN-Konzentrationen führten zu einem inaktiven Protein, mit dem keine Kalibrierkurven erstellt werden konnten. Dieses Ergebnis würde vermuten lassen, dass nach der Elution mit einer ACN-Konzentration von 70 % keinerlei Funktionalität des Antikörpers zu erwarten ist. Der gegenteilige Befund kann durch den schützenden Effekt des Sol-Gels erklärt werden, der durch die sanfte Fixierung eine irreversible Entfaltung des Proteins erschwert. Auch die anderen eingekapselten Zellbestandteile könnten zum protektiven Effekt beitragen und somit eine erneute Verwendung des Biofilters ermöglichen.

5.4 Abreicherung im Schwebebettverfahren

Bei der Abreicherung ohne Säule fallen Parameter wie die geschwindigkeitsbestimmende Diffusionslimitierung, beispielsweise die Diffusion in Längsrichtung der Säulenachse, die sogenannte Longitudinaldiffusion, weg (Van-Deemter, 1995). Im Vergleich zu den zuvor verwendeten gepackten Säulen ist bei diesem Experiment die zur Verfügung stehende Adsorbensoberfläche wesentlich größer. Damit steigt die Wahrscheinlichkeit der Antikörper-Antigen-Interaktion. Für den experimentellen Aufbau wurden zwei Sol-Gel-Gläser (jeweils 2,5 mg Antikörper in 2,5 g Sol-Gel-Glas eingekapselt), gemörsert und direkt zu 1 L einer mit MC-LR versetzten Lösung (25 µg/L, Windach) gegeben. Die Abreicherung wurde für 25 Stunden verfolgt und zu Beginn jede Stunde eine Probe entnommen, um den Prozess zeitabhängig, wie bereits bei dem vorangegangenen Experiment beschrieben, zu verfolgen (Abbildung 58).

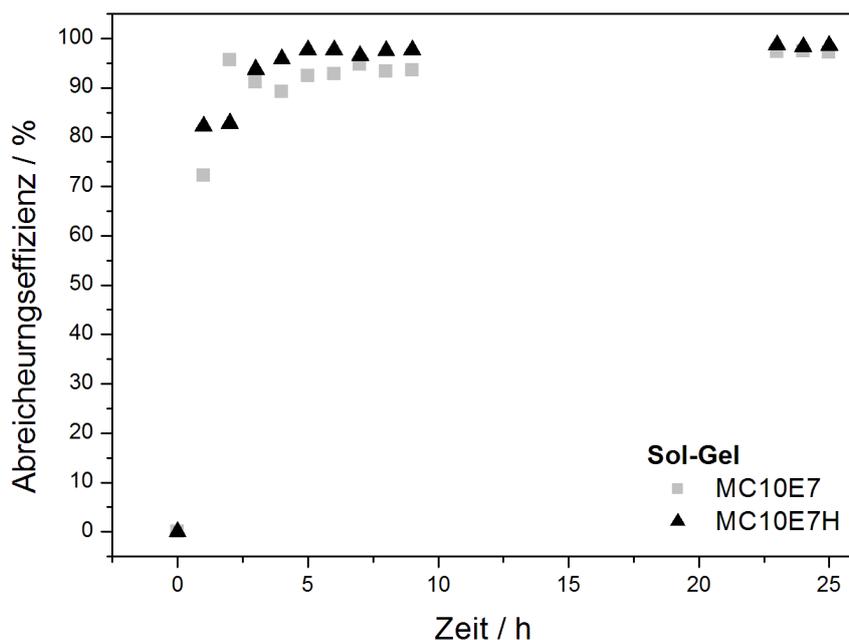


Abbildung 58: Abreicherung zweier mit MC-LR versetzten Windach Proben im Schwebbettverfahren über 25 Stunden (1 L, 25 µg/L MC-LR). Jeweils 0,5 mg Antikörper eingekapselt in 0,5 g Sol-Gel-Glas.

Nach der ersten Stunde waren bereits 72 % (MC10E7 (GAM)) bzw. 82 % (MC10E7H (Protein G)) der anfänglichen 25 µg an MC-LR abgereichert. Die Sättigungsphase stellt sich unabhängig vom Antikörper bereits nach etwa fünf Stunden ein. Dies war im Vergleich zum Säulenversuch deutlich schneller. Wie bereits beschrieben, kann dies über die größere Interaktionsfläche und turbulente Strömung aufgrund des Rührvorgangs erklärt werden. Die final erhaltenen Abreicherungseffizienzen und Bindungskapazitäten sind in Tabelle 26 zusammengefasst.

Tabelle 28: Zusammenfassung der Abreicherungseffizienzen, Bindungskapazitäten und gebundenen Mengen an MC-LR zweier Sol-Gel-Gläser (MC10E7 und MC10E7H, jeweils 2,5 mg Antikörper in 2,5 g Sol-Gel-Glas-Matrix eingekapselt), Abreicherung von 1 L einer 25 µg/L MC-LR-Lösung (Windach) über 25 Stunden mittels Schwebbettverfahren. Die Sol-Gel-Glas-Zugabe erfolgte ohne die Verwendung einer Säule direkt in das Glasgefäß.

Antikörper	Abreicherungseffizienz	Bindungskapazität	Menge MC-LR ^a / µg
MC10E7	98 %	74 %	4,9
MC10E7H	99 %	75 %	5,0

^aMenge an MC-LR, die gebunden wurde (bezogen auf 0,5 g Sol-Gel-Glas mit 0,5 mg Antikörper)

Die höheren Bindungskapazitäten für beide Antikörper zeigen, dass im Mittel bei jedem zweiten Antikörper beide Paratope ein MC-LR-Molekül binden. Bezogen auf die Sol-Gel-Glas-Matrix können unabhängig vom immobilisierten Antikörper je 5,0 µg pro Gramm Säulenmaterial (0,5 mg Antikörper eingekapselt) binden. Dieses Experiment weist noch einmal die Vorteile der Immobilisierung mittels Sol-Gel-Prozess auf. Die sanfte Fixierung in das Polymer Netzwerk liefert eine stabile Matrix, die eine sehr hohe Antikörperfunktionalität und Stabilität garantiert.

V Zusammenfassung und Ausblick

In warmen Frühjahrs- und Herbstmonaten kommt es in eutrophierten Gewässern immer häufiger zu einem explosionsartigen Wachstum von Cyanobakterien. Sterben diese ab, so setzen sie nach der Zellyse für Mensch und Tier toxische Sekundärmetaboliten frei. Zu ihnen zählen neben zahlreichen neuro- und dermatotoxischen Substanzen vor allem Hepatotoxine. Den weitverbreitetsten und toxischsten Vertreter der Lebertoxine stellt das Microcystin-LR dar, welches bei akut toxischen Konzentrationen zu Leber- und Nierenversagen führt (Wehr, 2015). Die auftretenden „Algenblüten“ führten in den vergangenen Jahren immer häufiger dazu, dass Trinkwasserreservoirs wie beispielsweise der Eriesee in den USA zeitweise nicht mehr genutzt werden konnten. Auch Badeverbote für Badegewässer mussten häufig ausgesprochen werden. Aufgrund der akuten und subakuten Toxizität von MC-LR hat die WHO einen Grenzwert von 1 µg/L in freier und zellgebundener Form für Trinkwasser festgesetzt (WHO, 1998). Ein 100-fach höherer Wert (akut tolerierbar bei einmaliger Exposition) wird hingegen vom Umweltbundesamt als Richtwert postuliert, ab welchem ein Badeverbot ausgesprochen werden soll (Umweltbundesamt, 2015). Folglich müssen Maßnahmen getroffen werden, um die gesundheitlichen Risiken für Mensch und Tier zu reduzieren. Klassische physikalische Abreicherungsverfahren für Cyanobakterien und -toxine, wie die Adsorption an Aktivkohle, Langsamsand-, Mikro-, Ultra- und Nanofiltration oder Umkehrosmose haben einen gemeinsamen Nachteil: Sie versagen, wenn es um die selektive Abreicherung von einer bestimmten Substanz oder Substanzklasse geht. Neben den physikalischen werden auch chemische Verfahren verwendet, wobei durch den Einsatz von Oxidationsmitteln (z.B. Ozon, Chlor, Kaliumpermanganat) eine Strukturänderung des MC-LR erzeugt wird und es dadurch ungiftig gemacht wird (Chorus, 2010b; Shawwa, 2001). Allerdings sind auch diese Aufreinigungsmethoden wenig selektiv und zudem, aufgrund der möglichen chemischen Nebenreaktionen und hohen Chemikalienkosten, limitiert. Eine neuartige Abreicherungsmethode, die eine hohe Selektivität gewährleistet, stellt die Immunofiltration dar. Basierend auf der Antikörper-Analyt-Interaktion können Toxine aus kontaminierten Gewässern eliminiert werden. Nachdem klassische Herstellungsverfahren für mono- und polyklonale Antikörper für diesen Zweck nicht ökonomisch sind, hat sich in den letzten 30 Jahren die Möglichkeit der Produktion und Anreicherung von rekombinanten Proteinen in Pflanzen (z.B. *Nicotiana tabacum*) im Großmaßstab herauskristallisiert. Gelingt es eine selektive und kostengünstige Abreicherungsmethode für MC-LR aus Oberflächengewässern basierend auf hochaffinen *Plantibodies* zu etablieren, könnten die bereits erwähnten Nachteile der derzeit genutzten klassischen Abreicherungsmethoden eliminiert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst die Charakterisierung von in *Nicotiana* hergestellten rekombinanten anti-MC-LR-Antikörpern (*Plantibodies*). In diesem Zusammenhang sollte das immunanalytische Anwendungspotential der *Plantibodies* im Vergleich zum monoklonalen Maus-Antikörper abgeschätzt werden. Des Weiteren sollte, basierend auf immobilisierten *Plantibodies*, eine effiziente und kostengünstige neuartige Abreicherungsverfahren für nicht zellgebundenes MC-LR entwickelt und hinsichtlich der Anwendung auf Oberflächengewässersproben geprüft und optimiert werden.

In Zusammenarbeit mit der Universität für Bodenkultur in Wien (BOKU) konnten rekombinante anti-MC-LR-Volllängenantikörper (MC10E7H) in *Nicotiana* in Ausbeuten von 68 ± 41 mg für *N. tabacum* und 291 ± 36 mg für *N. benthamiana* pro Kilogramm des frischen Blattmaterials exprimiert werden. Um das Bindungsverhalten des *Plantibodies* im Vergleich zum murinen Antikörper zu testen, wurde ein indirekt kompetitiver ELISA entwickelt. Bei dessen Optimierung wurde die *coating*- und Antikörperkonzentration konsekutiv reduziert, bis bei einer *coating*-Konzentration von 50 ng/mL und einer Antikörperkonzentration von jeweils 5 ng/mL LOD-Werte von 10,9 ng/L für den murinen Antikörper und 12,5 ng/L für den *Plantibody* erhalten wurden. Die Generierung von Kalibrierkurven mit drei Wasserproben zeigte zudem, dass es zu keiner signifikanten Beeinträchtigung der Assay-Sensitivität kam. Der *Plantibody* erwies sich somit als sehr gute Alternative für die MC-LR-Quantifizierung mittels ELISA im Rahmen des von der WHO festgelegten Grenzwertes für Trinkwasser von 1 µg/L. Des Weiteren war der rekombinante Antikörper weitgehend robust gegenüber chaotropen Reagenzien, organischen Lösungsmitteln, Huminsäuren und einen weiten pH-Bereich (3–12). Auch die Selektivität gegenüber anderen MCs wurde in diesem Zusammenhang getestet. Der *Plantibody* zeigte in Übereinstimmung mit dem murinen Antikörper vernachlässigbar geringe Kreuzreaktivitäten für MC-LW und MC-LF. Hingegen wurde eine Bindung des rekombinanten Antikörpers an MC-RR mit einer Kreuzreaktivität von 62 % ermittelt. Es wurden zudem Bindungsstudien mittels SPR durchgeführt. Die Assoziationsratenkonstanten bei 37 °C betragen $3,27 \cdot 10^6$ 1/Ms für den murinen Antikörper und $3,21 \cdot 10^6$ 1/Ms für den rekombinanten Antikörper. Die Berechnung der K_d ergab Werte von $1,40 \cdot 10^{-11}$ M und $9,61 \cdot 10^{-10}$ M für den murinen bzw. den rekombinanten Antikörper. Messungen mittels ITC wurden bei 25 °C durchgeführt und lieferten K_d -Werte von $4,85 \cdot 10^{-10}$ M und $7,85 \cdot 10^{-09}$ M für den murinen bzw. den rekombinanten Antikörper. Bei beiden Biosensormessungen (SPR und ITC) ergaben sich minimale Unterschiede im Dissoziationsverhalten zwischen beiden Antikörpern. Nachdem beide Antikörper die gleichen Aminosäuresequenzen im variablen Teil

aufweisen, sollte die Ursache in den unterschiedlichen konstanten Regionen beider Antikörper begründet sein.

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse der Bindungsstudien eine sehr hohe Übereinstimmung des murinen und des rekombinanten Antikörpers bezüglich der Interaktion mit MC-LR. Daraus ergibt sich ein großes Potential der immunanalytischen Anwendung von *Plantibodies* bei gleichzeitig geringeren Produktionskosten im Vergleich zum murinen Antikörper. Die Verbreitung von Antikörper-basierten Analyseverfahren könnte neben dem ELISA etwa in Form von kostengünstigen Teststreifen für die Vor-Ort-Analyse von MC-LR-kontaminierten Oberflächengewässern sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde zudem die Entwicklung eines auf Goldnanopartikeln basierenden Immunoassays mit dem murinen Antikörper beschrieben. Die Nachweisgrenze von MC-LR betrug dabei 0,4 µg/L, bei einer Analysezeit von etwa drei Stunden. Die Übertragbarkeit auf den *Plantibody* wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwar nicht getestet, allerdings wurde mittels ELISA gezeigt, dass keine signifikanten Unterschiede im Bindungsverhalten der beiden Antikörper vorliegen. Somit ist die Nutzung von rekombinanten Vollängenantikörpern statt dem murinen Antikörper durchaus möglich. Bei der Immobilisierung des funktionellen Proteins an die Goldnanopartikel muss lediglich bedacht werden, dass der *Plantibody* aufgrund eines humanen konstanten Teils einen anderen pI-Wert aufweist, im Vergleich zum murinen Antikörper. Der pH-Wert des Immobilisierungsmediums müsste demnach angepasst werden, um eine Annäherung zwischen Goldnanopartikel und Antikörper zu erreichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde neben der Charakterisierung der *Plantibodies* die Herstellung von Biofiltern für die Abreicherung von MC-LR, basierend auf *Plantibodies*, dokumentiert. Der rekombinante Antikörper wurde zu diesem Zweck in eine glasartige Matrix eingekapselt (Sol-Gel-Glas) und diente als stationäre Phase. Zunächst wurde die Zusammensetzung des Sol-Gels hinsichtlich der höchsten spezifischen Bindungskapazität von MC-LR an die funktionell immobilisierten Antikörper optimiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von Glycerol einen proteinstabilisierenden Effekt ausübt und der Antikörper im Säulenmaterial über eine Lagerzeit von 31 Tagen bei 4 °C keinen Funktionalitätsverlust aufweist. Ein Gewichtsverlust der Polymermatrix im Bereich von 46 % und 50 % führte zu Porengrößen, die zum einen die Immobilisierung des aktiven Antikörpers, zum anderen, die Diffusion des Analyten zum Antikörper gewährleistet. Bei einem Antikörper/Sol-Gel-Glas-Verhältnis von 1:1000 (w/w) war die unspezifische Bindung an das Säulenmaterial mit 404 ng MC-LR pro Gramm Sol-Gel-Glas am niedrigsten. Zudem war bei diesem Verhältnis die Antikörperbelas-

dung noch nicht so hoch, dass es zu einer gegenseitigen sterischen Hinderung der Paratope kam. Die Abreicherungsexperimente wurden in drei unterschiedlichen Varianten durchgeführt. Zunächst wurde mittels sequentieller Toxinaufgabe der Durchbruchswert für die Immunadsorbersäulen ermittelt, in denen der murine bzw. der rekombinante Antikörper immobilisiert war. Für MC10E7 ergab sich ein Durchbruchswert von 1,2 µg MC-LR. Ein signifikant niedrigerer Wert von 0,34 µg wurde für den MC10E7H ermittelt. Die Ursache für diesen signifikanten Unterschied, bei offensichtlich gleichen Bindungseigenschaften im ELISA, ist noch nicht abschließend geklärt. Allerdings könnten die bereits erwähnten unterschiedlichen pI-Werte eine entscheidende Rolle spielen. Die Abreicherungsexperimente wurden zudem mittels kontinuierlich zyklischer Toxinaufgabe einerseits mit dest. Wasser, andererseits mit Proben aus Oberflächengewässern durchgeführt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit vom verwendeten Medium. Mittels Säulenexperimenten konnten 3,3 µg bzw. 3,9 µg MC-LR pro 0,5 g Sol-Gel-Glas für MC10E7 bzw. MC10E7H aus Oberflächenwasser abgereichert werden. Dies entsprach Bindungskapazitäten im Bereich von 49–52 % (MC10E7) bzw. 57–60 % (MC10E7H) bezogen auf die theoretische Bindungskapazität und implizierte, dass jeder Antikörper im Schnitt ein Toxinmolekül gebunden hatte. Dies demonstriert erneut die große Übereinstimmung der Bindungseigenschaften beider Antikörper im kontinuierlich zyklischen Betrieb, die Stabilität des *Plantibodies* gegenüber Oberflächenwasserinhaltsstoffen und das große Potential der Anwendung als Biofilter für die effiziente und selektive Abreicherung von MC-LR. Um die Kosten für die *Plantibody*-Produktion drastisch reduzieren zu können, wurden Zellpellets ohne eine nachfolgende Protein G-Aufreinigung eingekapselt und anschließend auf ihre Abreicherung hin getestet. Dabei ergab sich eine Bindungskapazität von 53 %, was eine hohe Übereinstimmung mit den vorangegangenen Experimenten mit Protein G gereinigten *Plantibodies* zeigt. Der dritte Abreicherungsmodus umfasste lediglich die Zerkleinerung der Sol-Gel-Glas-Matrix und die anschließende Überführung in den Probenbehälter, der das mit MC-LR versetzte und mittels Magnetrührer behandelte Oberflächenwasser beinhaltete (Schwebebettverfahren). Bindungskapazitäten von rund 75 % wurden dabei in wesentlich kürzerer Zeit für beide Antikörper erreicht. Dies entspricht 10 µg pro Gramm Sol-Gel-Glas. Diese Methode würde sich für die Abreicherung aus Gewässern eignen, denen ein Filtrationsschritt nachgeschaltet werden würde, um das Immunadsorbermaterial aus der aufgereinigten Wasserprobe zu entfernen.

In der vorliegenden Arbeit konnten die Grundlagen für die Anwendung von hochaffinen *Plantibody*-Biofiltern zur Abreicherung von MC-LR aus kontaminierten Wasserproben dokumentiert werden. Bedingt durch die nur in geringen Mengen zur Verfügung gestandenen

Plantibody-Mengen, betragen die Probenvolumina allerdings maximal einen Liter. Für die Abreicherung aus größeren Wasserreservoirs müssen die durchgeführten Experimente entsprechend hochskaliert werden, wobei höhere Packungsvolumina und größere Antikörpermengen benötigt werden, sowie höhere Fließgeschwindigkeiten unabdingbar sind. Eine erneute Charakterisierung und Optimierung der Parameter für eine gleichbleibend effiziente Abreicherung ist dabei unumgänglich. Weiterhin müssen auch gesetzliche Regelungen für den Anbau von transgenen Pflanzen berücksichtigt werden. Das Europäische Parlament hat im Jahr 2015 eine Neuregelung zum Anbau von gentechnisch veränderten Pflanzen verabschiedet, welches noch im selben Jahr in Kraft getreten ist. Durch die sogenannte *Opt-Out*-Richtlinie 2015/412 (Amtsblatt der EU, 2015) können die Mitgliedstaaten der EU selbst über die Beschränkung oder das Verbot des Anbaus von GVO auf Äckern entscheiden. Die rechtlichen Rahmenbedingungen wären somit geschaffen, um Pflanzen als Produktionssystem für *Plantibodies* auch auf freien Ackerflächen anzubauen. Allerdings zeigen die Antikörperausbeuten mit bis zu 291 ± 36 mg für MC10E7H pro Kilogramm des frischen *N. benthamiana*-Blattmaterials, dass sich der Anbau in Gewächshäusern, der unabhängig von der *Opt-Out*-Richtlinie betrieben werden kann, bereits rentiert.

VI Summary and Outlook

The eutrophication of lakes and rivers which essentially increased by human activities is the main reason for an increased planktic cyanobacteria growth during warm spring and autumn periods. Several species of cyanobacteria produce potent toxins and can pose significant health risks for humans and animals worldwide. Adjacent to numerous neurotoxic and dermatotoxic substances two classes of peptidic hepatotoxins –nodularins and microcystins– are crucial. Microcystin-Leucin-Arginine (MC-LR) is the most toxic and most frequent microcystin congener. Due to its high nephro- and hepatotoxicity and its known tumor promoting effect it can either provoke acute or chronic poisoning (Wehr, 2015). Over the recent years, harmful cyanobacterial algal blooms grew for example in Lake Erie, one of the largest resources of drinking water in the United States of America. Due to an algal bloom in 2015 for example, Lake Erie could occasionally not be used as drinking water reservoir anymore. Considering the current knowledge of microcystin toxicity, the WHO recommends that the amount of free and cell bound MC-LR should be limited to 1 µg/L in drinking water (WHO, 1998). The *Umweltbundesamt* declares a bathing prohibition at a 100 times higher value (acute tolerable, single exposure) (Umweltbundesamt, 2015). Hence, there is a clear need for measures to reduce the risk to human and animal health. Common used physical techniques for the depletion of cyanobacteria and/or -cells are for example adsorption to activated carbon, slow sand-, micro-, ultra- and nanofiltration and reverse osmosis. Despite physical methods, chemical ones like the oxidation of MC-LR with e.g. ozone, chlorine or potassium permanganate are generally used to induce a structural change and thus form a nontoxic compound. All mentioned methods share a mutual disadvantage: they fail if the depletion of only a certain substance or substance class is demanded. Immunofiltration is an innovative depletion method which ensures high substance selectivity. Based on the antibody-analyte interaction toxins can be eliminated from contaminated waters. Since commonly used techniques for the production of large amounts of monoclonal and polyclonal antibodies used for this purpose are highly expensive and not economic, a new alternative and highly attractive antibody production system arose in the last 30 years. By using plants (e.g. *Nicotiana tabacum*) recombinant proteins can be produced on a large-scale and low cost.

The present thesis initially deals with the characterization of in plant produced anti-MC-LR-antibodies (plantibodies) in order to evaluate their immunoanalytical potential in this context. In addition, the second part of the thesis was focused on the development and optimization of a depletion method for MC-LR based on immobilized plantibodies.

With the collaboration of the University of Natural Resources and Life Sciences in Vienna purified full size recombinant antibodies (MC10EH) were produced in *Nicotiana* in yields of

68±41 mg (*N. tabacum*) and 291±36 mg (*N. benthamiana*) per kg fresh leaf material. To compare the binding behavior of MC10E7H with the murine antibody, an indirect competitive ELISA was devised and optimized. The coating and antibody concentrations of both the murine antibody and the recombinant antibody were gradually reduced until a coating concentration of 50 ng/mL and an antibody concentration of each 5 ng/mL revealed limits of detection (LODs) of 10.9 ng/mL and 12.5 ng/mL, respectively. Calibration curves from three different real water samples showed no significant sensitivity deterioration. These results clearly demonstrate the promising ELISA application of plantibodies for the quantification of MC-LR under the guidelines laid down by the WHO. Furthermore the plantibody showed high stability against chaotropic ions, organic solvents, humic acids and was stable over a wide range of pH value (3–12). In this context, the selectivity to other microcystins was tested and showed high accordance with the murine antibody, i.e. negligible cross reactivities for MC-LW and MC-LF and high cross reactivity of 62 % to MC-RR. The binding behavior was also examined using SPR spectroscopy. Association rate constants were recorded at 37 °C and revealed values of $3.27 \cdot 10^6$ 1/Ms for the murine antibody and $3.21 \cdot 10^6$ 1/Ms for the plantibody. The calculated K_d values were $1.40 \cdot 10^{-11}$ M and $9.61 \cdot 10^{-10}$ M for the murine and the recombinant antibody. For comparison measurements using ITC were conducted at 25 °C and delivered K_d values of $4.85 \cdot 10^{-10}$ M and $7.85 \cdot 10^{-9}$ M, respectively. Measurements with both biosensors (SPR and ITC) indicated only minor differences in the dissociation behavior between both antibodies. As both antibodies have the identical amino acid sequence in the variable region a possible explanation for this finding might be the difference in the constant antibody regions which originate from mouse and human, respectively.

In summary the results of the binding studies illustrate high accordance between the murine and the recombinant anti-MC-LR-antibodies and emphasize the high potential using in plant produced antibodies for analytical application with regard to lower production costs compared to the monoclonal murine antibody. The commercial availability of the plantibody based analytical methods could be achieved by e.g. cost-efficient lateral flow dipsticks for the rapid on-site analysis of contaminated surface water.

In addition, in this context, a highly sensitive immunoassay based on gold nanoparticles with immobilized murine antibodies was established and delivered a limit of detection of 0.4 µg/L MC-LR within three hours. Although not tested in the course of this thesis, it can be expected, that the transferability to the plantibody should be uncomplicated.

Beside the characterization of the plant produced antibody the present thesis also documents the basic development of biofilters based on plantibodies for the depletion of MC-LR from

water sources. For this purpose the antibody was encapsulated into a sol-gel glass matrix. First the composition was optimized with regard to high specific binding capacities. This study clearly showed that addition of glycerol led to a protein stabilization effect. Furthermore, the encapsulated antibodies were at least stable up to 31 days (4 °C) without noticeable functionality losses. A weight loss during the drying process of the sol-gel glass matrix between 46 % to 50 % led to pore sizes, which were small enough to gently fix the antibody but still big enough to ensure the diffusion of the analyte to the antibody. The lowest nonspecific binding to the matrix (404 ng MC-LR per gram of sol-gel glass) could be achieved by using an antibody/sol-gel glass ratio of 1:1000 (w/w). In addition using this ratio the antibody loading was not that high that steric hindrance was prevalently pronounced. The depletion experiments were conducted using three different modes. First, the breakthrough of the immuno filter columns was determined by a sequential sample addition. With the mouse antibody-loaded support the breakthrough occurred after addition of 1.2 µg MC-LR. In contrast, the breakthrough with the plantibody already occurred after the addition of 0.34 µg MC-LR. Although the ELISA results showed nearly the same binding behavior, a possible explanation for the significant difference of the breakthrough behavior could eventually be found in the difference between the constant regions of both antibodies (murine and chimeric), as already mentioned. This leads to completely different isoelectric points (between 6.0 to 6.3 for the murine antibody and 8.3 to 8.9 for the plantibody, respectively). However, the correlation could not be conclusively clarified. In a second approach the depletion was performed by addition of sample in a continuous cyclic mode. With regard to the used water sources (dest. water or surface water) no significant differences in the binding capacity were gained. By performing column experiments with surface water samples, 3.3 µg and 3.9 µg MC-LR were trapped on 0.5 g of the sol-gel glass with MC10E7 and MC10E7H, respectively. This corresponds to binding capacities of 49–52 % for the murine antibody and 57–60 % for the recombinant antibody related to the theoretical binding capacity. Hence, on average each antibody binds one MC-LR molecule. These results again illustrate the high accordance between both kinds of antibodies and point out the interesting potential to use recombinant antibodies as an efficient bioremediation tool. Due to considerable costs of downstream processing of plantibodies, mainly caused by protein G purification step, the present thesis documents the utilization of a less purified cell pellet containing the recombinant antibody. A binding capacity of 53 % was yielded and shows high accordance to the previous experiments accomplished with affinity purified plantibodies. The third depletion mode only included the crushing and sieving of the sol-gel glass and the transfer into the sample vessel containing MC-LR-spiked

surface water (suspension method). The solution was stirred for 25 h. Finally, a binding capacity of 75 % was yielded, which corresponds to 5.0 µg MC-LR per 0.5 g sol-gel glass. This approach led to a higher binding capacity in a significantly shorter period of time compared to the depletion using the continuous cyclic mode.

Although in these basic studies only minor water volumes (maximum 1 L) were tested, the study clearly showed that highly affine plantibodies could be applied to generate efficient biofilters for the depletion of MC-LR from different water sources. To use the immunofiltration for the depletion from large water amounts, some aspects have to be taken into account. The whole experimental set up has to be scaled up and optimized including higher package volumes, higher antibody amounts and preferably higher flow rates.

Furthermore, statutory provisions concerning the cultivation of transgenic plants have to be implied. In 2015 the European Parliament adopted a revised regulation on the cultivation of genetically modified plants. In the same year, the so-called opt-out directive 2015/412 came into force (Amtsblatt der EU, 2015). The EU member states can decide on themselves for the restriction or prohibition to cultivate genetically modified organisms in the open field. The legal framework is created by this directive and therefore the open land cultivation of plants as production system for plantibodies. However, the plantibody yields with up to 291 ± 36 mg for MC10E7H per kilogram of fresh *N. benthamiana* leaf material demonstrated that the greenhouse cultivation, which can be operated independently of the opt-out directive, is already profitable.

VII Abkürzungsverzeichnis

3A8	Monoklonaler Antikörper gegen MC-LR
Ø	Durchmesser
σ	Leitfähigkeit / μS/cm
γ-Globulin	Gamma-Globulin-Fraktion aus Rinderserum
A ₁	Obere Asymptote
A ₂	Untere Asymptote
ACN	Acetonitril
Adda	3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyldeca-10-phenyl-4,6-diensäure
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i> (chemische Ionisation bei Atmosphärendruck)
Äq	Äquivalent
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> (Bicinchoninsäure)
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BoNT/A	<i>Botulinum toxin serotype A</i> (Botulinum-Neurotoxin)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CD22	<i>Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins</i> (Gruppe Salinsäure bindender Lektine)
CDR 1–3	<i>Complementarity determining region 1–3</i> (hypervariable Domäne 1–3)
C _H	<i>Constant region heavy chain 1–3</i> (konstante Region der schweren Kette 1–3)
Chl.a	Chlorophyll a
C _L	<i>Constant light chain</i> (konstanter Teil der leichten Kette)
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Da	Dalton
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid
DOC	<i>Dissolved organic carbon</i> (Gelöster organischer Kohlenstoff)
DP	<i>Differential power</i> (Unterschied zwischen den Heizleistungen)
Ebolavirus GP1	<i>Ebolavirus glycoprotein</i> (Ebolavirus Glykoprotein)
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	<i>Electrospray ionisation</i> (Elektrospray-Ionisation)
EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
Fab	<i>Fragment antigen binding</i> (Antigen bindendes Fragment)
Fc	<i>Fragment crystallizable</i> (kristallisierbares Fragment)
FPIA	Fluoreszenz-Polarisation-Immunoassay
FRET-IA	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Immunoassay
Fv	<i>Variable Fragment</i> (variables Fragment)
G	Gibbs Enthalpie / J/mol
GAM	<i>Goat-anti-Mouse</i> (Ziege-anti-Maus)
GC	Gaschromatographie
GNPs	Goldnanopartikel
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
H	Enthalpie / J/mol
HAT-Medium	Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin-Medium
HCC	<i>Hepatocellular carcinoma</i> (Heptacelluläres Karzinom)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus

HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigchromatographie)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HSA	<i>Human serum albumin</i> (Humanalbumin)
IAC	Immunoaffinitätschromatographie
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Internationale Agentur für Krebsforschung)
IC ₅₀	Testmittelpunkt der ELISA-Kalibrierkurve
Ig	Immunglobulin
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitäts-Chromatographie
i.p.	Intraperitoneal
IR	Infrarot
ITC	<i>Isothermal titration calorimetry</i> (Isotherme Titrationskalorimetrie)
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> (Internationale Union für reine und angewandte Chemie)
i.v.	Intravenös
IWC	Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie, TU München
K	Gleichgewichtskonstante
k _a	Assoziationsratenkonstante / 1/Ms
K _d	Dissoziationskonstante / M
k _d	Dissoziationsratenkonstante / 1/s
KLH	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i> (Schlitzschnecken-Hämocyanin)
KR	Kreuzreaktivität
LAB	Linearer Arbeitsbereich (Werte zwischen 20 % und 80 % der maximalen Absorption)
LC	<i>Liquid chromatography</i> (Flüssigchromatographie)
LD ₅₀	Mittlere letale Dosis

LOD	<i>Limit of detection</i> (Nachweisgrenze)
LOQ	<i>Limit of quantification</i> (Bestimmungsgrenze)
m	Anzahl der Mehrfachmessungen
M	Molarität / mol/L
M8H8	Monoklonaler Antikörper gegen MC-LR
mAk	Monoklonaler Antikörper
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionisation</i> (Matrix-unterstützte Laser-desorptionsionisation)
MC	Microcystin
MC10E7	Monoklonaler Antikörper 10E7 gegen MC-LR
MC10E7H	Rekombinant in <i>Nicotiana</i> hergestellter Antikörper gegen MC-LR
MC-LF	Microcystin-Leucin-Phenylalanin
MC-LR	Microcystin-Leucin-Arginin
MC-LW	Microcystin-Leucin-Tryptophan
MC-RR	Microcystin-Arginin-Arginin
MCscFv2	ScFv gegen MC-LR produziert in <i>P. pastoris</i>
MCscFv2EL	ScFv gegen MC-LR produziert in <i>P. pastoris</i> mit erweitertem Linker
MDA-MB-435	Melanomzellen
Mdha	<i>N</i> -Methyldehydroalanin
MeOH	Methanol
min	Minute
MIPs	<i>Molecularly imprinted polymers</i> (molekular geprägte Polymere)
MMPB	<i>Erythro</i> -2-Methyl-3-methoxy-4-phenylbuttersäure
MS	Massenspektrometrie
MTP	Mikrotiterplatte
n	Anzahl der Messpunkte einer Kalibrierung

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Nationales Zentrum für Biotechnologieinformation)
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanz)
NOAEL	<i>No observed adverse effect level</i> (Toxinkonzentration, bei der im Organismus keine Wirkung beobachtbar ist)
OVA	Ovalbumin
p	Steigungsparameter
P20	Tensid P20 der Firma GE Healthcare
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDA	Photodioden-Array-Detektor
PEG	Polyethylenglykol
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>p</i> -NPP	<i>Para</i> -Nitrophenylphosphat
PP1, 2A, 2B, 2C	Serin-/Threonin-spezifische Protein-Phosphatase 1, 2A, 2B, 2C
PPIA	<i>Protein Phosphatase Inhibition Assay</i> (Protein-Phosphatase Inhibitions Assay)
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVX	<i>Potato virus X</i> (Kartoffel-X-Virus)
R	Universelle Gaskonstante / J/mol·K
rAk	Rekombinanter Antikörper
REM	Rasterelektronenmikroskop
RP	<i>Reversed phase</i> (Umkehrphase)
rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	<i>Reverse transcription</i> -PCR (Reverse Transkriptase-PCR)
RU	<i>Refractive units</i>
SATP	<i>N</i> -Succinimidyl- <i>S</i> -acetylthiopropionat
S	Entropie / J/mol·K
s	Standardabweichung
scFv	<i>Single-chain fragment variable</i> (einkettiges variables Fragment)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SPE	<i>Solid phase extraction</i> (Festphasenextraktion)
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i> (Oberflächenplasmonenresonanz)
T	Absolute Temperatur / K
TBSV	<i>Tomato bushy stunt virus</i> (Tomatenzwergbuschvirus)
T-DNA	Transfer-DNA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEOS	Tetraethylorthosilikat (Tetraethoxysilan)
TFA	Trifluoressigsäure
Ti-Plasmid	Tumor induzierendes Plasmid
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TMOS	Tetramethylorthosilikat (Tetramethoxysilan)
TMV	Tabakmosaikvirus
TOF	<i>Time of flight</i> (Flugzeitanalysator)
TOPA	<i>Trace organic pollutant analyzer</i> (Analysegerät für die Bestimmung von organischen Spurenstoffen)
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
UV	Ultraviolettes Licht
V _H	<i>Variable heavy chain</i> (variable Teil der schweren Kette)
Vis	<i>Visible light</i> (sichtbares Licht)

V _L	<i>Variable light chain</i> (variable Teil der leichten Kette)
v/v	Volumen/Volumen-Verhältnis
w/v	Masse/Volumen-Verhältnis
w/w	Masse/Masse-Verhältnis
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
ZKÜ	Zellkulturüberstand

VIII Literaturverzeichnis

Aktoris K., U. Förstermann, F. Hofmann, K. Starke, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München, **2013**.

Almquist K. C., M. D. McLean, Y. Niu, G. Byrne, F. C. Olea-Popelka, C. Murrant, J. Barclay, J. C. Hall, Expression of an anti-botulinum toxin A neutralizing single-chain Fv recombinant antibody in transgenic tobacco, *Vaccine*, **2006**, *24(12)*, 2079–2086.

Amtsblatt der EU, <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015L0412&from=HR>, aufgerufen am 16.06.2016, 16:40 Uhr.

An J., W. W. Carmichael, Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins, *Toxicon*, **1994**, *32(12)*, 1495–1507.

Arakawa T., Y. Kita, J. F. Carpenter, Protein-solvent interactions in pharmaceutical formulations, *Pharmaceut. Res.*, **1991**, *8(3)*, 285–291.

Axén R., J. Porath, S. Ernback, Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides, *Nature*, **1967**, *214*, 1302–1304.

Baker P. D., L. D. Fabbro, A guide to the identification of common blue-green algae (cyanoprokaryotes) in Australian freshwaters, Cooperative Research Centre for Freshwater Ecology CRCFE, Thurgoona, **1999**.

Barta A., K. Sommergruber, D. Thompson, K. Hartmuth, M. Matzke, A. Matzke, The expression of a nopaline synthase-human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue, *Plant. Mol. Biol.*, **1986**, *6(5)*, 347–357.

Bayerisches Landesamt für Umwelt, Toxinbildende Cyanobakterien (Blualge) in bayerischen Gewässern-Massenentwicklung, Gefährdungspotential, wasserwirtschaftlicher Bezug, Augsburg, **2006**.

Benfer A. Herstellung eines Adsorbens für proteingebundene Toxine durch Modifikation von PA6-Mikrofiltrationsmembranen, Dissertation, Bergische Universität Wuppertal, **2003**.

- Benito** A., F. Valero, J. Lafuente, Uses of β -galactosidase tag in on-line monitoring production of fusion proteins and gene expression in *Escherichia coli*, *Enzyme Microb. Technol.*, **1993**, *15(1)*, 66–71.
- Berg** J. M., J. L. Tymoczko, L. Stryer, Stryer Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2010**.
- Better** M., C. P. Chang, R. R. Robinson, A. H. Horwitz, *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment, *Science*, **1988**, *240(4855)*, 1041–1043.
- Bock** R., Genetic engineering of the chloroplast: novel tools and new applications, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2014**, *26*, 7–13.
- Borrebaeck** C. A. K., Antibodies in diagnostics-from immunoassays to protein chips, *Immunol. Today*, **2000**, *21(8)*, 379–382.
- Brandt** P., Transgene Pflanzen: Herstellung, Anwendung, Risiken und Richtlinien, Birkhäuser Verlag AG, Berlin, **2004**.
- Brandtzaeg** P., Secretory IgA: designed for anti-microbial defense, *Front. Immunol.*, **2013**, *4(222)*, 1–17.
- Buckley**, A. M., M. Greenblatt, The sol-gel preparation of silica gels, *J. Chem. Educ.*, **1994**, *71(7)*, 599–602.
- Burnet** F. M., The clonal selection theory of acquired immunity, *Yale J. Biol. Med.*, **1960**, *32(6)*, 480.
- Burns** C., W. U. Spindelmann, S. Puckett, G. E. Pacey, Solution ionic strength on gold nanoparticle solution color transition, *Talanta*, **2006**, *69(4)*, 873–876.
- Campbell** D. H., E. Luescher, L. S. Lerman, Immunologic Adsorbents: I. Isolation of antibody by means of a cellulose-protein antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1951**, *37*, 575–578.
- Carmichael** W. W., V. Baesley, D. L. Bunner, J. N. Eloff, I. Falconer, P. Gorham, K. Harada, T. Krishnamurthy, M. J. Yu, R. E. Moore, K. Rinehardt, M. Runnegar, O. M. Skulberg, M. Watanabe, Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae), *Toxicon*, **1988**, *26(11)*, 971–973.

Carmichael W. W., The toxins of cyanobacteria, *Sci. Am.*, **1994**, 270, 64–72.

Cervino C., Entwicklung von immunanalytischen, chromatographischen und massenspektrometrischen Methoden zur Bestimmung von Aflatoxin in Lebensmitteln, Dissertation, Technische Universität München, **2008**.

Chaudhuri J., F. W. Alt, Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair, *Nat. Rev. Immunol.*, **2004**, 4(7), 541–552.

Chen K., W. Xu, M. Wilson, B. He, N. W. Miller, E. Bengtén, E.-S. Edholm, P. A. Santini, P. Rath, A. Chiu, M. Cattalini, J. Litzman, J. B. Bussel, B. Huang, A. Meini, K. Riesbeck, C. Cunningham-Rundles, A. Plebani, A. Cerutti, Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, pro-inflammatory and B cell-stimulating programs in basophils, *Nat. Immunol.*, **2009**, 10(8), 889–898.

Chianella I., S. A. Piletsky, I. E. Tothill, B. Chen, A. P. F. Turner, MIP-based solid phase extraction cartridges combined with MIP-based sensors for the detection of microcystin-LR, *Biosens. Bioelectron.*, **2003**, 18(2–3), 119–127.

Cho M.-J., C. D. Ha, P. G. Lemaux, Production of transgenic tall fescue and red fescue plants by particle bombardment of nature seed-derived highly regenerative tissues, *Plant Cell Rep.*, 2000, 19(11), 1084–1089.

Chorus I., J. Clasen, J. Fastner, Biologische Aspekte der Wassernutzung und Wasserqualität, Stehende Gewässer, In: Höll Wasser: Nutzung im Kreislauf: Hygiene, Analyse und Bewertung (R. Nießner, Hrsg.), Walter de Gruyter & Co. KG, Berlin/New York, **2010a**.

Chorus I., J. Fastner, J. Pietsch, Biologische Aspekte der Wassernutzung und Wasserqualität, Cyanobakterientoxine, In: Höll Wasser: Nutzung im Kreislauf: Hygiene, Analyse und Bewertung (R. Nießner, Hrsg.), Walter de Gruyter & Co. KG, Berlin/New York, **2010b**.

Cichna M., Knopp, D., Niessner, R., Immunoaffinity chromatography of polycyclic aromatic hydrocarbons in columns prepared by the sol-gel method, *Anal. Chim. Acta.*, **1997a**, 339(3), 241–250.

Cichna M., Knopp, D., Niessner, R., Optimization of the selectivity of pyrene immunoaffinity columns prepared by the sol-gel method, *Chem. Mater.*, **1997b**, 9(11), 2640–2646.

- Cichna-Markl M.**, Selective sample preparation with bioaffinity columns prepared by the sol-gel-method, *J. Chromatogr. A*, **2006**, *1124(1–2)*, 167–180.
- Colwell R. R.**, Polyphasic taxonomy of genus vibrio: numerical taxonomy of *vibrio cholerae*, *vibrio parahaemolyticus*, and related *vibrio* species. *J. Bacteriol.*, **1970**, *104(1)*, 410–433.
- Conrad U.**, U. Fiedler, Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity, *Plant Mol. Biol.*, **1998**, *38(1)*, 101–109.
- Cook D.**, G. Newcombe, Removal of microcystin variants with powdered activated carbon, *Water Sci. Technol.*, **2002**, *2(5-6)*, 201–207.
- Coradin T.**, P. J. Lopez, Biogenic silica patterning: simple chemistry or subtle biology? *Chembiochem.*, **2003**, *4(4)*, 251–259.
- Craig M.**, H. A. Luu, T. L. McCready, D. Williams, R. J. Andersen, C. F. Holmes, Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporin and microcystins with type-1 and type-2A protein phosphatases, *Biochem. Cell Biol.*, **1996**, *74(4)*, 569–578.
- Cregg J.M.**, I. Tolstorukov I, A. Kusari, J. Sunga, K. Madden, T. Chappell, Expression in the yeast *Pichia pastoris*, *Method. Enzymol.*, **2009**, *463*, 169–189.
- Cruse J. M.**, R. E. Lewis, Atlas of immunology, CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, **2010**.
- Cruz de la A. A.**, T. J. Lynch, D. D. Dionysiou, The effect of sample matrices on Immunoassays to detect microcystin-LR in water, *J. Environ. Prot.*, **2012**, *3(10)*, 1275–1285.
- Cui L.**, H. Peng, R. Zhang, Y. Chen, L. Zhao, K. Tang, Recombinant hHscFv-RC-RNase protein derived from transgenic tobacco acts as a bifunctional molecular complex against thepatocellular carcinoma, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **2012**, *59(5)*, 323–329.
- Dahlem A. M.**, Structure/toxicity relationships and fate of low molecular weight peptide toxins from cyanobacteria, Dissertation, University of Illinois, **1989**.

Degelmann P., Egger, S., Jürgling, H. Müller, J., Niessner, R., Knopp, D., Determination of sulfonylurea herbicides in water and food samples using sol-gel glass-based immunoaffinity extraction and LC-UV/DAD or LC-MS/MS, *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54(6)*, 2003–2011.

De Neve M., M. De Loose, A. Jacobs, H. Van Houdt, B. Kaluza, U. Weidle, M. Van Montagu, A. Depicker, Assembly of an antibody and its derived antibody fragment in *Nicotiana* and *Arabidopsis*, *Transgenic Res.*, **1993**, *2(4)*, 227–237.

De Wildt R. M., C. R. Mundy, B. D. Gorick, I. M. Tomlinson, Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions, *Nat. Biotechnol.*, **2000**, *18(9)*, 989–994.

De Zoeten G. A., J. R. Penswick, M. A. Horisberger, P. Ahl, M. Schultze, T. Hohn, The expression, localization, and effect of a human interferon in plants, *Virology*, **1989**, *172(1)*, 213–222.

Denizli A., Y. Arica, Protein A-immobilized microporous polyhydroxyethylmethacrylate affinity membranes for selective sorption of human-immunoglobulin-G from human plasma, *J. Biomater. Sci.*, **2000**, *11(4)*, 367–382.

Dillenberg H. O., M. K., Dehnel, Toxic water bloom in Saskatchewan, *Can. Med. Assoc. J.*, **1959**, *83(22)*, 1151–1154.

Ding Y. J., R. Mutharasan, Highly sensitive and rapid detection of microcystin-LR in source and finished water samples using cantilever sensors, *Environ. Sci. Technol.*, **2011**, *45(4)*, 1490–1496.

Di Noia J. M., M. S. Neuberger, Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation, *Annu. Rev. Biochem.*, **2007**, *76*, 1–22.

Dorfmueller S., Molekulares Farming, Transgene Pflanzen als Arzneimittelproduzenten, mensch+umwelt spezial (GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, GmbH in der Helmholtz-Gemeinschaft, Hrsg.), **2004/2005**, 32–38.

Dower S. K., R. A. Dwek, A novel method for mapping antibody combining sites by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Int. J. Biol. Macromol.*, **1979**, *1(3)*, 119–122.

Drake P. M. W., D. Chargelegue, N. D. Vine, C. J. van Dolleweerd, P. Obregon, J. K.-C. Ma, Transgenic plants expressing antibodies: a model for phytoremediation, *FASEB J.*, **2002**, *16(14)*, 1855–1860.

Drake P. M. W., T. Barbi, M. R. Drever, C. J. van Dolleweerd, A. J. R. Porter, J. K.-C. Ma, Generation of transgenic plants expressing antibodies to the environmental pollutant microcystin-LR, *FASEB J.*, **2010**, *24(3)*, 882–890.

Düring K., S. Hippe, F. Kreuzaler, J. Schell, Synthesis and self-assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic *Nicotiana tabacum*, *Plant Mol. Biol.*, **1990**, *15(2)*, 281–293.

Edwards C., 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 Sp.*, **1993**, *7(8)*, 714–721.

Eikenberg A., Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern zur Detektion von Microcystinen, Diplomarbeit, Universität Stuttgart, **2000**.

Erhard M., H. von Döhren, P. Jungblut, Rapid typing and elucidation of new secondary metabolites of intact cyanobacteria using MALDI-TOF mass spectrometry, *Nat. Biotechnol.*, **1997**, *15(9)*, 906–909.

Eriksson J. E., D. Toivola, J. A. O. Meriluoto, H. Karaki, Y. G. Han, D. Hartshorne, Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1990**, *173(3)*, 1347–1353.

Ewald M., F. Fechner, G. Gauglitz, A multi-analyte biosensor for the simultaneous label-free detection of pathogens and biomarkers in point-of-need animal testing, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2015**, *407(14)*, 4005–4013.

Falconer I. R., Algal toxins and human health. In: Quality and treatment of drinking water II, The handbook of environmental chemistry (J. Hrubec, Hrsg.), Springer-Verlag GmbH, Berlin Heidelberg, **1998**.

Fastner J., M. Erhard, W. W. Carmichael, F. Sun, K. L. Rinehart, H. Röncke, I. Chorus, Characterization and diversity of microcystins in natural blooms and strains of the genera *Microcystis* and *Planktothrix* from German freshwaters, *Arch. Hydrobiol.*, **1999**, 145(2), 147–163.

Fastner J., M. Erhard, H. Döhren, Determination of oligopeptide diversity within natural population of *Microcystis spp.* (cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2001**, 67(11), 5069–5076.

Fawell J. K., H. A. James, Report No. FR 0434/DoE 3728, United Kingdom, **1994**.

Findlay J. W. A., R. F. Dillard, Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays, *AAPS J.*, **2007**, 9(2), E260–E267.

Firek S., J. Draper, M. R. Owen, A. Gandecha, B. Cockburn, G. C. Whitelam, Secretion of a functional single-chain Fv protein in transgenic tobacco plants and cell suspension cultures, *Plant Mol. Biol.*, **1993**, 23(4), 861–870.

Fischer C., https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/ea/Cyanobacteria_Aggregation2.jpg, **2014**, aufgerufen am 16.06.2016, 09:12 Uhr.

Fischer R., N. Emans, Molecular farming of pharmaceutical proteins, *Transgenic Res.*, **2000a**, 9(4-5), 279–299, discussion 277.

Fischer W. J., B. C. Hitzfeld, F. Tencalla, J. E. Eriksson, A. Mikhailov, D. R. Dietrich, Microcystin-LR toxicodynamics, induced pathology, and immunohistochemical localization in liver of blue-green algae exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Toxicol. Sci.*, **2000b**, 54(2), 365–373

Fischer W. J., S. Alheimer, V. Cattori, P. J. Meier, D. R. Dietrich, B. Hagenbuch, Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2005**, 203(3), 257–263.

Frens G., Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions, *Nature Phys. Sci.*, **1973**, 241, 20–22.

Frenzel A., M. Hust, T. Schirrmann, Expression of recombinant antibodies, *Front. Immunol.*, **2013**, *4(217)*, 1–20.

Francis G., Poisonous Australian Lake, *Nature*, **1878**, *18(444)*, 11–12.

Freire E., O. L. Mayorga, M. Straume, Isothermal titration calorimetry, *Anal. Chem.*, **1990**, *62(18)*, 950A–959A.

GE Healthcare, Handbook: Affinity chromatography, principles and methods, Uppsala, **2007**.

Gibbs M. J., G. F. Weiller, Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, *96(14)*, 8022–8027.

Giritch A., S. Marillonnet, C. Engler, G. van Eldik, J. Botterman, V. Klimyuk, Y. Gleba, Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**, *103(40)*, 14701–14706.

Goldberg J., 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*, **1995**, *376(6543)*, 745–753.

Goldstein D. A., J. A. Thomas, Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants, *Q. J. Med.*, **2004**, *94(11)*, 705–716.

Guo X., Surface plasmon resonance based biosensor technique: a review, *J. Biophotonics*, **2012**, *5(7)*, 483–501.

Hack R., E. Märklbauer, G. Terplan, Production and characterization of monoclonal antibodies to the macrocyclic trichothecene roridin A, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1988**, *54(9)*, 2328–2330.

Harada K.-I., K. Ogawa, K. Matsuura, H. Murata, M. Suzuki, M. F. Watanabe, Y. Itezono, N. Nakayama, Structural determination of geometrical isomers of microcystin-LR and -RR from cyanobacteria by two dimensional NMR spectroscopic techniques, *Chem. Res. Toxicol.*, **1990**, *3(5)*, 473–481.

Harada K.-I., F. Kondo, L. Lawton, Laboratory analysis of cyanobacteria, In: Toxic cyanobacteria in water-a guide to their public health consequences, monitoring and management (I. Chorus, J. Bartram, Hrsg.), E & FN Spon, London New York, **1999**.

Harriman W., H. Völk, N. Defranoux, M. Wabl, Immunoglobulin class switch recombination, *Annu. Rev. Immunol.*, **1993**, *11*, 361–384.

Harwood N. E., F. D. Batista, Early events in B cell activation, *Annu. Rev. Immunol.*, **2010**, *28*, 185–210.

Heifetz P. B., Genetic engineering of the chloroplast, *Biochimie*, **2000**, *82(6-7)*, 655–666.

Heresztyn T., B. C. Nicholson, Determination of cyanobacterial hepatotoxins directly in water using a protein phosphatase inhibition assay, *Water Res.*, **2001**, *35(13)*, 3049–3056.

Herranz S., M. D. Marazuela, M. C. Moreno-Bondi, Automated portable array biosensor for multisample microcystin analysis in freshwater samples, *Biosens. Bioelectron.*, **2012**, *33(1)*, 50–55.

Hiatt A., R. Cafferkey, K. Bowdish, Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, **1989**, *342(6245)*, 76–78.

Hodnik V., G. Anderluh, Toxin detection by surface plasmon resonance, *Sensors*, **2009**, *9(3)*, 1339–1354.

Hoekema A., P. R. Hirsch, P. J. J. Hooykaas, R. A. Schilperoort, A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid, *Nature*, **1983**, *303(5913)*, 179–180.

Hofstee B. H. J., Immobilization of enzymes through noncovalent binding to substituted agaroses, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **1973**, *53(4)*, 1137–1144.

Horsman J., M. D. McLean, F. C. Olea-Popelka, J. C. Hall, Picloram resistance in transgenic tobacco expressing an anti-picloram scFv antibody is due to reduced translocation, *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, *55(1)*, 106–112.

Horwitz A. H., C. P. Chang, M. Better, K. E. Hellstrom, R. R. Robinson. Secretion of functional antibody and Fab fragment from yeast cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**, *85*(22), 8678–8682.

Hrudey S., M. Burch, M. Drikas, R. Gregory, Remedial measures In: Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health significance, monitoring and management (I. Chorus, J. Bartram, Hrsg.), E & FN Spon, London New York, **1999**.

Hu P., C. Z. Huang, Y. F. Li, J. Ling, Y. L. Liu, L. R. Fei, J. P. Xie, Magnetic particle-based sandwich sensor with DNA-modified carbon nanotubes as recognition elements for detection of DNA hybridization, *Anal. Chem.*, **2008**, *80*(5), 1819–1823.

Huang X, M. A. El-Sayed, Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy, *J. Adv. Res.*, **2010a**, *1*(1), 13–28.

Huang Z., W. Phoolcharoen, H. Lai, K. Piensook, G. Cardineau, L. Zeitlin, K. J. Whaley, C. J. Arntzen, H. S. Mason, Q. Chen, High-level rapid production of full-size monoclonal antibodies in plants by a single-vector DNA replicon system, *Biotechnol. Bioeng.*, **2010b**, *106*(1), 9–17.

Huisman L., Slow sand filtration, In: World Health Organisation (W. E. Wood, Ed.), Genf, **1974**.

Hyndman D., T. G. Flynn, G. Lever, R. Burrell, Protein immobilization to alumina supports: I. characterization of alumina-organophosphate ligand interactions and use in the attachment of papain, *Biotechnol. Bioeng.*, **1992**, *40*(11), 1319–1327.

IARC, Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. In: World Health Organization (WHO) International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, **2010**.

Iller R. K., The chemistry of silica: solubility, polymerization, colloid and surface properties and biochemistry of silica: solubility, polymerization, colloid and surface properties and biochemistry, John Wiley & Sons, Chichester, **1979**.

ISO 20179, http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=34098, **2005**, aufgerufen am 21.06.2016, 17:55 Uhr.

IUPAC Compendium of Chemical Terminology-Gold Book, A. D. McNaught, A. Wilkinson, Blackwell Scientific Publications, Oxford, **1997**.

Jain P. K., K. S. Lee, I. H. El-Sayed, M. A. El-Sayed, Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine, *J. Phys. Chem. B*, **2006**, *110*(14), 7238–7248.

Jeong K. J., S. H. Jang, N. Velmurugan, Recombinant antibodies: engineering and production in yeast and bacterial hosts, *Biotechnol. J.*, **2011**, *6*(1), 16–27.

Jin W., Brennan, J. D., Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials. *Anal. Chim. Acta*, **2002**, *461*(1), 1–36.

Jochimsen E. M., W. W. Carmichael, J. S. An, D. M. Cardo, S. T. Cooksen, C. E. Holmes, M. B. Antunes, D. A. de Melo Filho, T. M. Lyra, V. S. Barreto, S. M. Azevedo, W. R. Jarvis, Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil, *New Engl. J. Med.*, **1998**, *338*(13), 873–878.

Johnston M. F. M., H. N. Eisen, Cross-reactions between 2,4-dinitrophenyl and menadione (vitamin K3) and the general problem of antibody specificity, *J. Immunol.*, **1976**, *117*(4), 1189–1196.

Jolley M. E., Fluorescence polarization immunoassay for the determination of therapeutic drug levels in human plasma, *J. Anal. Toxicol.*, **1981**, *5*(5), 236–240.

Jungwirth P., P. S. Cremer, Beyond Hofmeister, *Nat. Chem.*, **2014**, *6*(4), 261–263.

Kabat E. A., T. T. Wu, Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites, *J. Immunol.*, **1991**, *147*(5), 1709–1719.

Karsunke X. Y. Z, Entwicklung immunanalytischer Methoden zur Detektion niedermolekularer toxischer Verbindungen in Lebensmitteln, Dissertation, Technische Universität München, **2011**.

Kaufmann S. H. E., Basiswissen Immunologie, Springer-Verlag GmbH, Berlin Heidelberg, **2014**.

Kawamura O., S. Sato, H. Kajii, S. Nagayama, K. Ohtani, J. Chiba, Y. Ueno, A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin a based on monoclonal antibodies, *Toxicol.*, **1989**, 27(8), 887–897.

Kaya K., T. Sano, A photodetoxification mechanism of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by ultraviolet irradiation, *Chem. Res. Toxicol.*, **1998**, 11(3), 159–163.

Kaya K., T. Sano, Total microcystin determination using *erythro*-2-methyl-3-(methoxy-d₃)-4phenylbutyric acid (MMPB-d₃) as the internal standard, *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 386(1–2), 107–112.

Kempken F., R. Kempken, Gentechnik bei Pflanzen- Chancen und Risiken, Springer Verlag GmbH, Berlin Heidelberg, **2012**.

Kindt T. J., R. A. Goldsby, B. A. Osborne, J. Kuby, Kuby Immunology, W. H. Freeman, Yew York, **2007**.

Klein T. M., E. D. Wolf, R. Ru, J. C. Sanford, High-velocity microprojectiles for delivering nucleic-acids into living cells, *Nature*, **1987**, 327, 70–73.

Köhler G., C. Milstein, Continuous cultures of fused cells secreting antibody predefined specificity, *Nature*, **1975**, 256, 495–497.

Kondo F., 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, *Nat. Toxins*, **1995**, 3(1), 41–49.

Kondo F., H. Matsumoto, S. Yamada, N. Ishikawa, E. Ito, S. Nagata, Y. Ueno, M. Suzuki, K.-I. Harada, Detection and identification of metabolites of microcystins formed *in vivo* in mouse and rat livers, *Chem. Res. Toxicol.*, **1996**, 9(8), 1355–1359.

Krebber A., S. Bornhauser, J. Burmester, A. Honegger, J. Willuda, H. R. Bosshard, A. Plückthun, Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system, *J. Immunol. Methods*, **1997**, *201(1)*, 35–55.

Krupadam R. J., G. P. Patel, R. Balasubramanian, Removal of cyanotoxins from surface water resources using reusable molecularly imprinted polymer adsorbents, *Environ. Sci. Pollut. Sci.*, **2012**, *19(5)*, 1841–1851.

Kuiper-Goodman T., 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.), E & FN Spon, London, **1999**.

Laemmli U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **1970**, *227(5259)*, 680–685.

Larrick J. W., L. Danielsson, C. A. Brenner, M. Abrahamson, K. E. Fry, C. A. Borrebaeck, Rapid cloning of rearranged immunoglobulin genes from human hybridoma cells using mixed primers and the polymerase chain reaction, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **1989**, *160(3)*, 1250–1256.

La-Salette R., M. M. Oliviera, C. A. Palmeira, J. Almeida, F. P. Peixoto, Mitochondria a key role in microcystin-LR kidney intoxication, *J. Appl. Toxicol.*, **2008**, *28(1)*, 55–62.

Lawton L. A., C. Edwards, G. A. Codd, Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters, *Analyst*, **1994**, *119(7)*, 1525–1530.

Lewis E. A., K. P. Murphy, Isothermal titration calorimetry, In: Protein-ligand interactions: Methods in Molecular biology (M. A. Williams, T. Daviter, Hrsg.), Humana Press, New York City, **2005**.

Li X., L. Xu, W. Zhou, Q. Zhao, Y. Wang, Chronic exposure to microcystin-LR affected mitochondrial DNA maintenance and caused pathological changes of lung tissue in mice, *Environ. Pollut.*, **2016**, *210*, 48–56.

Li X., Q. Zhao, W. Zhou, L. Xu, Y. Wang, Effects of chronic exposure to microcystin-LR on hepatocyte mitochondrial DNA replication in mice, *Environ. Sci. Technol.*, **2015**, 49(7), 4665–4672.

Li Z., C. J. Woo, M. D. Iglesias-Ussel, D. Ronai, M. D. Scharff, The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination, *Genes Dev.*, **2001**, 18(1), 1–11.

Liénard D., C. Sourrouille, V. Gomord, L. Faye, Pharming and transgenic plants, *Biotechnol. Annu. Rev.*, **2007**, 13, 115–147.

Ligler F. S., K. E. Sapsford, J. P. Golden, L. C. Shriver-Lake, C. R. Taitt, M. A. Dyer, S. Barone, C. J. Myatt, The array biosensor: portable, automated systems, *Anal. Sci.*, **2007**, 23(1), 5–10.

Litman D. J., T. M. Hanlon, E. F. Ullman, Enzyme channeling immunoassay: a new homogeneous enzyme immunoassay technique, *Anal. Biochem.*, **1980**, 106(1), 223–229.

Livage J., T. Coradin, C. Roux, Encapsulation of biomolecules in silica gels, *J. Phys.: Condens. Matter*, **2001**, 13(33), R673–R691.

Long F., M. He, A. N. Zhu, H. C. Shi, Portable optical immunosensor for highly sensitive detection of microcystin-LR in water samples, *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, 24(8), 2346–2351.

Lottspeich F., J. W. Engels, Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag: Springer Spektrum, Heidelberg Wiesbaden, **2012**.

Loyprasert S., P. Thavarungkul, P. Asawatreratanakul, B. Wongkittisuksa, C. Limsakul, P. Kanatharana, Label-free capacitive immunosensor for microcystin-LR using self-assembled thiourea monolayer incorporated with Ag nanoparticles on gold electrode, *Biosens. Bioelectron.*, **2008**, 24(1), 78–86.

Luuc R., 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.), E & FN Spon, London New York, **1999**.

Luttmann W., K. Bratke, M. Küppner, D. Myrtek, *Der Experimentator: Immunologie*, Springer Spektrum, Heidelberg Wiesbaden, **2014**.

Ma W., W. Chen, R. Qiao, C. Liu, C. Yang, Z. Li, D. Xu, C. Peng, Z. Jin, C. Xu, S. Zhu, L. Wang, Rapid and sensitive detection of microcystin by immunosensor based on nuclear magnetic resonance, *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, *25(1)*, 240–243.

MacCallum R. M., A. C. Martin, J. M. Thornton, Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography, *J. Mol. Biol.*, **1996**, *262(5)*, 732–745.

Martin C., K. Sivonen, U. Matern, R. Dierstein, J. Weckesser, Rapid purification of the peptide toxins microcystin-LR and nodularin, *FEMS Microbiol. Lett.*, **1990**, *56(1–2)*, 1–5.

Märtlbauer E., M. Gareis, G. Terplan, Enzyme immunoassay for the macrocyclic trichothecene roridin A: Production, properties, and use of rabbit antibodies, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1988**, *54(1)*, 225–230.

Mbukwa E. A., T. A. M. Msagati, B. B. Mamba, Preparation of guanidinium terminus-molecularly imprinted polymers for selective recognition and solid-phase extraction (SPE) of [arginine]-microcystins, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2013**, *405(12)*, 4253–4267.

McElhiney J., L. A. Lawton, Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2005**, *203(3)*, 219–230.

Meriluoto J., Chromatography of microcystins, *Anal. Chim. Acta*, **1997**, *352(1–3)*, 277–298.

Moollan R. W., B. Rae, A. Verbeek, Some comments on the determination of microcystin toxins in waters by high performance liquid chromatography, *Analyst*, **1996**, *121(2)*, 233–238.

Murata H., H. Shoji, M. Oshikata, K.-I. Harada, M. Suzuki, F. Kondo, H. Goto, High-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection of derivatized microcystins, *J. Chrom. A*, **1995**, *693(2)*, 263–270.

Murphy C. J., A. M. Gole, J. W. Stone, P. N. Sisco, A. M. Alkilany, E. C. Goldsmith, S. C. Baxter, Gold nanoparticles: beyond toxicity to cellular imaging, *Acc. Chem. Res.*, **2008**, *41(12)*, 1721–1730.

NASA Earth Observatory, <http://earthobservatory.nasa.gov/IOTD/view.php?id=86327>, **2015**, aufgerufen am 11.05.2016, 13:45 Uhr.

Nicholson B. C., J. Rositano, M. D. Burch, Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine, *Water Res.*, **1994**, 28(6), 1297–1303..

Nolen T. G., P. M. Johnson, C. E. Kicklighter, T. Capo, Ink secretion by the marine snail *Aplysia californica* enhances its ability to escape from a natural predator, *J. Comp. Physiol. A*, **1995**, 176(2), 239–254.

Ojanperä I., A. Pelander, E. Vuori, K. Himberg, M. Waris, K. Niinivaara, Detection of cyanobacterial hepatotoxins by TLC, *J. Planar. Chromatogr.*, **1995**, 8(1), 69–72.

Ott J. L. W. W. Carmichael, LC/ESI/MS method development for the analysis of hepatotoxic cyclic peptide microcystins in animal tissues, *Toxicon*, **2006**, 47(7), 734–741.

Pearson L., T. Mihali, M. Moffitt, R. Kellermann, B. Neilan, On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin, *Mar. Drugs*, **2010**, 8(5), 1650–1680.

Pelander A., I. Ojanperä, 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.*, **1996**, 30(46), 1464–1470.

Pereira S. R., V. M. Vasconcelos, A. Antunes, Computational study of the covalent bonding of microcystins to cysteine residues—a reaction involved in the inhibition of the PPP family of protein phosphatases, *FEBS J.*, **2013**, 280 (2), 674–680.

Phillips D. C., Protein crystallography 1971: coming of age, *Cold Spring Harb. Sym. Quant. Biol.*, **1972**, 36, 589–592.

Pietsch J., K. Bornmann, W. Schmidt, Relevance of intra and extracellular cyanotoxins for drinking water treatment, *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, **2002**, 30(1), 7–15.

Porter R. R., The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.*, **1959**, 73(1), 119–127.

Potgieter T. I, S. D. Kersey, M. R. Mallem, A. C. Nylen, M. d'Anjou, Antibody expression kinetics in glycoengineered *Pichia pastoris*, *Biotechnol. Bioeng.*, **2010**, *106(6)*, 918–927.

Pouria S., A. de Andrade, J. Barbosa, R. L. Cavalcanti, V. T. Barreto, C. J. Ward, W. Preiser, G. K. Poon, G. H. Neild, G. A. Codd, Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil, *The Lancet*, **1998**, *352(9121)*, 21–26.

Praefcke G. J. K., C. Herrmann, Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) zur Charakterisierung biomolekularer Wechselwirkungen, *Biospektrum*, **2005**, *1*, 44–47.

Ramirez N., P. Oramas, M. Ayala, M. Rodríguez, M. Pérez, J. Gavilondo, Expression and long-term stability of a recombinant single-chain Fv antibody fragment in transgenic *Nicotiana tabacum* seeds, *Biotechnol. Lett.*, **2001**, *23(1)*, 47–49.

Reverberi R., L. Reverberi, Factors affecting the antigen-antibody reaction, *Blood Transfus.*, **2007**, *5(4)*, 227–240.

Rinehart K. L., K.-I. Harada, M. Namikoshi, C. Chen, C. A. Harvis, M. H. G. Munro, J. W. Blunt, P. E. Mulligan, V. R. Beasley, A. M. Dahlem, W. W. Carmichael, Nodularin, Microcystin, and the configuration of Adda, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 8557–8558.

Rinehart K. L., M. Namikoshi, B. W. Choi, Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria), *J. Appl. Phycol.*, **1994**, *6(2)*, 159–176.

Roggero P., M. Ciuffo, E. Benvenuto, R. Franconi, The expression of a single-chain Fv antibody fragment in different plant hosts and tissues by using potato virus X as a vector, *Protein Expr. Purif.*, **2001**, *22(1)*, 70–74.

Roller M., Risikoabschätzung für die Exposition gegenüber Blaualgen (Cyanobakterien) und ihren Toxinen in Badegewässern, Gutachten erstellt für das Niedersächsische Ministerium für Frauen, Arbeit und Soziales, Hannover, **2000**.

Ruberti F., A. Cattaneo, A. Bradbury, The use of the RACE method to clone hybridoma cDNA when V region primers fail, *J. Immunol. Methods*, **1994**, *173(1)*, 33–39.

Sagadevan S., M. Periasamy, Recent trends in nanobiosensors and their applications – a review, *Rev. Adv. Mater. Sci.*, **2014**, *36(1)*, 62–69.

Sainsbury F., M. Sack, J. Stadlmann, H. Quendler, R. Fischer, G. P. Lomonossoff, Rapid transient production in plants by replicating and non-replicating vectors yields high quality functional anti-HIV antibody, *PLoS One*, **2010**, *5(11)*, e13976.

Sanchez-Baracaldo P., P. K. Hayes, C. E., Blank, Morphological and habitat evolution in the cyanobacteria using a compartmentalization approach, *Geobiol.*, **2005**, *3(3)*, 145–165.

Sano T., K. Nohara, F. Shiraishi, K. Kaya, A method for micro-determination of total microcystin content in water blooms of cyanobacteria (blue-green algae), *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **1992**, *49(3)*, 163–170.

Sapsford K. E., W. R. Algar, L. Berti, K. Boeneman Gemmill, B. J. Casey, E. Oh, M. H. Stewart, I. L. Medintz, Functionalizing nanoparticles with biological molecules: developing chemistries that facilitate nanotechnology. *Chem. Rev.*, **2013**, *113(3)*, 1904–2074.

Schedl M., G. Wilharm, S. Achatz, A. Kettrup, R. Niessner, D. Knopp, Monitoring polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in human urine: extraction and purification with a sol-gel glass immunosorbent, *Anal. Chem.*, **2001**, *73(23)*, 5669–5676.

Schillberg S., S. Zimmermann, A. Voss, R. Fischer, Apoplastic and cytosolic expression of full-size antibodies and antibody fragments in *Nicotiana tabacum*, *Transgenic Res.*, **1999**, *8(4)*, 255–263.

Schouten A., J. Roosien, F. A. van Engelen, G. A. de Jong, A. W. Borst-Vrensens, J. F. Zilverentant, D. Bosch, W. J. Stiekema, F. J. Gommers, A. Schots, J. Bakker, The C-terminal KDEL sequence increases the expression level of a single-chain antibody designed to be targeted to both the cytosol and the secretory pathway in transgenic tobacco, *Plant Mol. Biol.*, **1996**, *30(4)*, 781–793.

Shankaran D. R., K. V. Gobi, N. Miura, Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest, *Sensor. Actuat. B-Chem.*, **2007**, *121(1)*, 158–177.

Shawwa A. R., D. W. Smith, Kinetics of microcystin-LR oxidation by ozone, *Ozone-Sci. Eng.*, **2001**, *23(2)*, 161–170.

Sijmons P. C., B. M. M. Dekker, B. Schrammeijer, T. C. Verwoerd, P. J. M. van den Elzen, A. Hoekema, Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants, *Nat. Bioechnol.*, **1990**, 8(3), 217–221.

Sing K. S. W., D. H. Everett, R. A. W. Haul, L. Moscou, R. A. Pierotti, J. Roquerol, T. Siemieniewska, Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity, *Pure. Appl. Chem.*, **1985**, 57(4), 603–619.

Sivonen K., G. Jones, Cyanobacterial toxins, In: Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management (I. Chorus, J. Bartram, Hrsg.), World Health Organization/E & FN Spoon, London, **1999**,

Skerra A., A. Plückthun, Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*, *Science*, **1988**, 240(4855), 1038–1041.

Skerra A., A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments, *Gene*, **1994**, 141(1), 79–84.

Skulberg O. M., W. W. Carmichael, G. A. Codd, R. Skulberg, Taxonomy of toxic cyanophyceae (cyanobacteria), In: Algal toxins in seafood and drinking water (I. R. Falconer, Hrsg), Academic Press, San Diego, **1993**.

Smith M. C., T. C. Furman, T. D. Ingolia, C. Pidgeon, Chelating peptide-immobilized metal ion affinity chromatography: a new concept in affinity chromatography for recombinant proteins, *J. Biol. Chem.*, **1988**, 263(15), 7211–7215.

Solomon B., Y. Levin, Adsorption of amyloglucosidase on inorganic carriers, *Biotech. Bioeng.*, **1975**, 17(9), 1323–1333.

Spiegel H., S. Schillberg, M. Sack, A. Holzem, J. Nähring, M. Monecke, Y.-C. Liao, R. Fischer, Accumulation of antibody fusion proteins in the cytoplasm and ER of plant cells, *Plant Sci.*, **1999**, 149(1), 63–71.

Stanier R. Y., G. Cohen-Bazire, Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria, *Annu. Rev. Microbiol.*, **1977**, 31, 225–274.

Starkenstein E., Ferment action and the influence upon it of neutral salts, *Biochem. Z.*, **1910**, *24*, 210–218.

Stoger E., J. K.-C. Ma, R. Fischer, P. Christou, Showing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2005**, *16*(2), 167–173.

Stöger E., C. Vaquero, E. Torres, M. Sack, L. Nicholson, J. Drossard, S. Williams, D. Keen, Y. Perrin, P. Christou, R. Fischer, Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies, *Plant Mol. Biol.*, **2000**, *42*(4), 583–590.

Teixeira M. R., M. J. Rosa, Microcystins removal by nanofiltration membranes, *Sep. Purif. Technol.*, **2005**, *46*(3), 192–201.

Terman D. S., Preparation of protein A immobilized on collodion-coated charcoal and plasma perfusion system for treatment of cancer, *Methods Enzymol.*, **1988**, *137*, 496–515.

Terpe K., Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2006**, *72*(2), 211–222.

Thill G.P., G. R. Davis, C. Stillman, G. Holtz, R. Brierly, M. Engel, R. Buckholtz, J. Kenney, S. Provow, T. Vedvick, R. S. Siegel, Positive and negative effects of multicopy integrated expression vectors on protein expression in *Pichia pastoris*. In: Proceedings of the Sixth International Symposium on the Genetics of Microorganisms (H. Heslot, J. Davies, J. Florent, L. Bobichon, G. Durand, L. Penasse, Eds.), Société Française de Microbiologie, Paris, **1990**.

Thommes M., K. Kaneko, A. V. Neimark, J. P. Olivier, F. Rodriguez-Reinoso, J. Rouquerol, K. S. W. Sing, Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report), *Pure. Appl. Chem.*, **2015**, *87*(9–10), 1051–1069.

Thust M., M. J. Schoning, P. Schroth, Ü. Malkoc, C. I. Dicker, A. Steffen, P. Kordos, H. Lüth, Enzyme immobilization on planar and porous silicon substrates for biosensor applications, *J. Mol. Catal. B*, **1999**, *7*(1–4), 77–83.

Tisdale E. S., Epidemic of intestinal disorders in Charleston, W. Va., occurring simultaneously with unprecedented water supply conditions, *Am. J. Public Health*, **1931**, *21*(2), 198–200.

- Tonegawa S.**, Somatic generation of antibody diversity, *Nature*, **1983**, 302(5909), 575–581.
- Tran M.**, C. Van, D. J. Barrera, P. L. Pettersson, C. D. Peinado, J. Bui, S. P. Mayfield. Production of unique immunotoxin cancer therapeutics in algal chloroplasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2013**, 110(1), E15–E22.
- Tschofen M.**, D. Knopp, E. Hood, E. Stöger, Plant molecular farming: much more than medicines, *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **2016**, 9(1), 271–294.
- Tsuji K.**, 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*, **1995**, 33(12), 1619–1631.
- Tsutsumi T.**, 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.*, **2000**, 38(7), 593–597.
- Turner P. C.**, A. J. Gammie, K. Hollinrake, G. A. Codd, Pneumonia associated with contact with cyanobacteria, *Brit. Med. J.*, **1990**, 300(6737), 1440–1441.
- Turniansky A.**, D. Avenir, A. Bronshtein, N. Aharonson, M. Altstein, Sol-gel entrapment of monoclonal anti-atrazine antibodies, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **1996**, 7(1), 135–143.
- Ueno Y.**, Y. Makita, S. Nagata, T. Tsutsumi, F. Yoshida, S.-I. 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.*, **1999**, 14 (1), 45–55.
- Umweltbundesamt**, Empfehlung zum Schutz von Badenden vor Cyanobakterien-Toxinen, *Bundesgesundheitsbl.* Springer, **2015**, 58 (8), 908–920.
- Utkilen H.**, 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.), E & FN Spon, London New York, **1999**.
- Van-Deemter J. J.**, F. J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography, *Chem. Eng. Sci.*, **1995**, 50(24), 3869–3882.

Verch T., V. Yusibov, H. Koprowski, Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector, *J. Immunol. Methods*, **1998**, *220*(1–2), 69–75.

Verwoerd T. C., P. A. Paridon, A. J. J. van Ooyen, J. W. M. van Lent, A. Hoekema, J. Pen, Stable accumulation of *Aspergillus niger* phytase in transgenic tobacco leaves. *Plant Physiol.*, **1995**, *109*(4), 1199–1205.

Vinogradova T., M. Danaher, A. Baxter, M. Moloney, D. Victory, S. A. Haughey, Rapid surface plasmon resonance immune biosensor assay for microcystin toxins in blue-green algae food supplements, *Talanta*, **2011**, *84*(3), 638–643.

Visser P. M, B. W. Ibelings, R. M. Luuc, Autumnal sedimentation of *Microcystis* spp as result of an increase in carbohydrate ballast at reduced temperature, *J. Plankton Res.*, **1995**, *17*(5), 919–933.

Wang X., R. Niessner, D. Knopp, Magnetic bead-based colorimetric immunoassay for aflatoxin B1 using gold nanoparticles, *Sensors*, **2014**, *14*(11), 21535–21548.

Wang X., R. Niessner, D. Knopp, Controlled growth of immunogold for amplified optical detection of aflatoxin B1, *Analyst*, **2015**, *140*(5), 1453–1458.

Ward D. M., R. W. Castenholz, S. R. Miller, Cyanobacteria in geothermal habitats, In: Ecology of cyanobacteria II: Their diversity in space and time (B. A. Whitton, Ed.), Springer Science+Business Media B.V., Dordrecht, **2012**.

Waugh D. S., Making the most of affinity tags, *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*(6), 316–320.

Weigle W. O., Immunochemical properties of hemocyanin, *Immunochemistry*, **1964**, *1*(4), 295–303.

Wehr J. D., R. G. Sheath, J. P. Kociolek, Freshwater algae of North America-Ecology and classification, Elsevier, Amsterdam, **2015**.

Weiss Y., A. Shulman, I. Ben Shir, E. Keinan, S. Wolf, Herbicide-resistance conferred by expression of a catalytic antibody in *Arabidopsis thaliana*, *Nature Biotechnol.*, **2006**, *24*(6), 713–717.

Weller, M. G., Strukturelle und kinetische Untersuchungen zur Entwicklung und Optimierung von Hapten-Enzymimmunoassays (ELISAs) am Beispiel der Bestimmung von Triazinherbiziden, Dissertation, Technische Universität München, **1992**.

WHO Water, Sanitation and Health - Guidelines for Drinking Water Quality, Health Criteria and other Supporting Information, **1996**, 940-949, und Nachtrag von **1998**, 281-283 (World Health Organization Hrsg.), Genf **1996** und Nachtrag **1998**.

Wieland T., S. Lutz, Expression rekombinanter Proteine, In: Molekulare Biotechnologie-Konzepte, Methoden und Anwendungen (M. Wink, Hrsg.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2011**.

Xia Y. T., J. Zhang, L. Jiang, A novel dendritic surfactant for enhanced microcystin-LR detection by double amplification in a quartz microbalance biosensor, *Coll. Surf. B Biointerfaces*, **2011**, *86(1)*, 81–86.

Xu P., X.-X. Zhang, C. Miao, Z. Fu, Z. Li, G. Zhang, M. Zheng, Y. Liu, L. Yang, T. Wang, Promotion of melanoma cell invasion and tumor metastasis by microcystin-LR via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway, *Environ. Sci. Technol.*, **2013**, *47(15)*, 8801–8808.

Yan F., A. Erdem, B. Meric, K. Kerman, M. Ozsoz, O. A. Sadik, Electrochemical DNA biosensor for the detection of specific gene related to *Microcystis* species, *Electrochem. Commun.*, **2001**, *3(5)*, 224–228.

Yu H.-W., A. Jang, L. H. Kim, S.-J. Kim, I. S. Kim, Bead-based competitive fluorescence immunoassay for sensitive and rapid diagnosis of cyanotoxin risk in drinking water, *Environ. Sci. Technol.*, **2011**, *45(18)*, 7804–7811.

Zabetakis K., W. E. Ghann, S. Kumar, M.-C. Daniel, Effect of high gold salt concentrations on the size and polydispersity of gold nanoparticles prepared by an extended Turkevich-Frens method, *Gold Bull.*, **2012**, *45(4)*, 203–211.

Zachariou M., Affinity chromatography: methods and protocols, Humana Press, Totowa, **2008**.

Zeck A., A. Eikenberg, M. G. Weller, R. Niessner, Highly sensitive immunoassay based on a monoclonal antibody specific for [4-arginine]microcystins, *Anal. Chim. Acta*, **2001**, *441(1)*, 1–13.

Zhao H. M., J. Tian, X. Quan, A graphene and multienzyme functionalized carbon nanosphere-based electrochemical immunosensor for microcystin-LR detection. *Coll. Surf. B Biointerfaces*, **2013**, *103*, 38–44.

Ziegler A., G. H. Cowan, L. Torrance, H. A. Ross, H. V. Davies, Facile assessment of cDNA constructs for expression of functional antibodies in plants using the potato virus X vector, *Mol. Breeding*, **2000**, *6(3)*, 327–335.

Ziegler M., S. R. Thomas, K. J. Danna, Accumulation of thermostable endo-1,4-b-D-glucanase in the apoplast of *Arabidopsis thaliana* leaves, *Mol. Breeding*, **2000**, *6*, 37–46.

Zilberg B., Gastroenteritis in Salisbury European children-a five year study, *Centr. Afr. J. Med.*, **1966**, *12(9)*, 164–168.

Zotina T., O. Köster, F. Jüttner, Photoheterotrophy and light-dependent uptake of organic and organic nitrogenous compounds by *Planktothrix rubescens* under low irradiance, *Freshwater Biol.*, **2003**, *48(10)*, 1859–1872.

Zühlke J., D. Knopp, R. Niessner, Sol-gel glass as a new support matrix in immunoaffinity chromatography, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1995**, *352(7)*, 654–659.

Zurawell R. W., H. Chen, J. M. Burke, E. E. Prepas, Hepatotoxic cyanobacteria: A review of the biological importance of microcystins in freshwater environments, *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.*, **2005**, *8(1)*, 1–37.

IX Anhang

Geräte

BET

PMI Automated BET Sorptomatic 1900 Series (Thermo Scientific, Waltham, USA)

ELISA

Auslesegerät Synergy HT (BioTek, Bad Friedrichshall)

Schüttler Easyshaker EAS 2/4 (SLT, Crailsheim)

Schüttler MS1 Minishaker (IKA Labortechnik, Staufen)

Waschautomat ELx 405 Select (BioTek, Bad Friedrichshall)

Isotherme Titrationskalorimetrie

MicrocalTM PEAQ-ITC (Malvern Instruments GmbH, Lappersdorf)

LC/MS

Exactive (Thermo Scientific, Bremen)

Säulenofen HotDog 5090 (ProLab, Reinach, Schweiz)

Spritzenpumpe Fusion HT (ThermoScientific, Bremen)

Surveyor Autosampler PlusLite (Finnigan, Bremen)

Surveyor MS PumpPlus (Finnigan, Bremen)

MALDI-TOF

Ultraflex TOF/TOF, N₂-Laser, 337 nm, positiv Modus (Bruker-Daltonics, Bremen)

Microflex LT System (Bruker, Bremen)

Oberflächenplasmonenresonanz

Biacore X100 (GE Healthcare, Freiburg)

Rasterelektronenmikroskop

SIGMA VP 300 (Carl Zeiss AG, Oberkochen)

Transmissionselektronenmikroskop

JEM100CX (JEOL, Tokyo, Japan)

Sonstiges

Gefriertrocknung Alpha 1–4 LSC (Christ, Osterode am Harz)

pH/Leitfähigkeits-Messgerät Multi 3401 (WTW, Weilheim)

Pipette Eppendorf® Research plus, 0,5 µl–10 µL (Eppendorf AG, Hamburg)

Pipette Eppendorf® Research plus, 100–1000 µL (Eppendorf AG, Hamburg)

Pipette Eppendorf® Research plus, 20–200 µL (Eppendorf AG, Hamburg)

Pipette Eppendorf® Research pro, Multi-Kanal 30–300 µL (Eppendorf AG, Hamburg)

Pipette Eppendorf® Research, 1–5 mL (Eppendorf AG, Hamburg)

Reinstwasseranlage Milli-Q plus 185 (Millipore, Schwalbach)

Rührer (MR 3002 S, Heidolph, Kelheim)

Rührer, Electronicrührer Multipoint HP (Variomag, Port Orange, USA)

Säule für MS-Messungen: Hypersil Gold, Partikelgröße: 3 µm, Porengröße: 17,5 nm, Dimension: 2,16 x 100 mm (25003-102130, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

Schlauchpumpe, MS regelo, (Ismatec, Wertheim)

Trockenschrank 20–250 °C (Mettler, Büchenbach)

Überkopfschüttler Reax 2 (Heidolph, Schwabach)

Ultraschallbad Sonorex Super RK106 (Bandelin, Berlin)

UV/Vis-Spektrometer Specord 250 Plus (Analytik Jena, Jena)

Vortexer TopMix FB1 5024 (Fisher Scientific, Schwerte)

Vortexer TopMix Fisherbrand 15024 (Novodirect, Kehl)

Waage Mettler AT261 Delta Range (Mettler-Toledo, Giessen)

Waage Mettler PM4600 Delta Range (Mettler-Toledo, Giessen)

Zentrifuge, Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Hamburg)

Software

Biacore X100 Control Software 1.1 und Evaluation Software 1.1 (GE Healthcare, Freiburg)

ChemBioDraw Ultra 13 (PerkinElmer, Waltham, USA)

Exactive Tune (ThermoScientific, Bremen)

Excel (Microsoft, Redmond, USA)

Fusion Instrument Control (Perkin Elmer, Waltham, USA)

Gen5 (BioTek, Bad Friedrichshall)

Origin 7G (OriginLab Corporation, Northampton, USA)

Xcalibur (Thermo Scientific, Bremen)

Antikörper und Antigene

Albumin aus Rinderserum, lyophilisiert, ≥ 96 % (A3059, Sigma Aldrich, Steinheim)

Gamma-Globulin aus Rinderserum, lyophilisiert, ≥ 98 % (Serva Feinbiochemica, Heidelberg)

Leucin-Enkephalinacetat (Hydrat) (L9133, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Microcystin-LF ALX-350-081-M001 (Enzo Life Science, Lörrach)

Microcystin-LR ALX-350-012-M001 (Enzo Life Science, Lörrach)

Microcystin-LW ALX-350-080-M001 (Enzo Life Science, Lörrach)

Microcystin-RR ALX-350-043-M001 (Enzo Life Science, Lörrach)

Monoklonaler Antikörper gegen MC-LR, Klon MC10E7, Protein G gereinigt (Squarix Biotechnology, Marl)

Monoklonaler Antikörper gegen MC-LR, Klon MC10E7, GAM gereinigt (Squarix Biotechnology, Marl)

Monoklonaler Antikörper gegen PolyHistidin, HRP-markiert, Klon HIS-1, (A7058, Sigma Aldrich, Steinheim)

Monoklonaler Antikörper gegen c-Myc, HRP-markiert, Klon 9E10, (11814150001, Sigma Aldrich, Steinheim)

Pferd Anti-Maus Antikörper IgG, HRP-markiert, affinitätsgereinigt (PI-2000, Laboratories, Vector Burlingame, USA)

Rekombinanter Antikörper gegen MC-LR produziert in *Nicotiana benthamiana*, Klon MC10E7H, (Universität für Bodenkultur, Wien, Österreich)

Rekombinanter Antikörper gegen MC-LR produziert in *Nicotiana tabacum*, Klon MC10E7H, (Universität für Bodenkultur, Wien, Österreich)

Rekombinanter Antikörper gegen MC-LR produziert in *Pichia pastoris*, Klon MCscFv2, (Universität für Bodenkultur, Wien, Österreich)

Rekombinanter Antikörper gegen MC-LR produziert in *Pichia pastoris*, Klon MCscFv2EL, (Universität für Bodenkultur, Wien, Österreich)

Ziege Anti-Human IgG (Fc spezifisch), HRP-markiert, (A0170, Sigma Aldrich, Steinheim)

Verbrauchsmaterialien

Biacore X100:

- BIA Maintenance Kit (BR-1006-66, GE Healthcare, Freiburg)

- HBS-EP⁺ Puffer (BR-1008-26, GE Healthcare, Freiburg)

- Plastik-Vials PP, 1,5 mL (BR-1002-87, GE Healthcare, Freiburg)

- Rubber Caps (BR-1004-11, GE Healthcare, Freiburg)

- Sensor Chip CM5 (BR-1000-14, GE Healthcare, Freiburg)

Dialyse-Caps, Slide-A-Lyzer, Mini Dialysis Units (69580, Thermo Scientific, Bremen)

Einmalspritze, 1 mL (H.999.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Einmalspritze, 10 mL (0058.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Einmalspritze, 5 mL (0057.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Einmal-Kanüle, 0.90 x 40 mm (C721.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Einmal-Kanüle, 0.80 x 120 mm (C630.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Extraktionskartuschen, Oasis® HLB 1cc, 30 mg (WAT094225, Waters, Schborn)

Faltenfilter, Ø 185 mm (HK37.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Glasmikrofaserfilter, Ø 40 mm (WHA1822047, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Größenausschlusschromatographiesäulen, PD Mini TrapTM, Sephadex G-25, (28-9180-07, GE Healthcare, Freiburg)

Handschuhe, Nitril (P778.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Kurzgewindefläschchen ND9 für MS-Messungen (LC06.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Küvetten, halbmikro (Y195.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Mikroeingänge, für MS-Messungen (LC07.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Mikrotiterplatten, 96-well, flacher Boden, hohe Bindungskapazität (655061, Greiner bio-one, Frickenhausen)

Mikrotiterplatten, 96-well, flacher Boden, niedrige Bindungskapazität (655201, Greiner bio-one, Frickenhausen)

Multi-Reaktionsgefäße 0,65 mL (7060.1, Roth, Karlsruhe)

Parafilm (H666.1, Roth, Karlsruhe)

Pasteurpipetten (4522, Roth, Karlsruhe)

Pipettenspitzen:

- Mikrospitzen, 0,1–10 µL (K138.1, Carl Roth, Karlsruhe)
- Pipettenspitzen, 0,5–5 mL (Brand, Wertheim)
- Pipettenspitzen blau, 100–1000 µL (2679.1, Carl Roth, Karlsruhe)
- Universalspitzen, 1–200 µL (B007.1, Carl Roth, Karlsruhe)
- Pipettenspitzen, 1–350 µL (KP90.99, Carl Roth, Karlsruhe)

Probefläschchen, 4 mL (E155.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Reaktionsgefäße 1,5 mL (4190.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Rollrandgläser, 10 mL (X655.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Rollrandgläser, 20 mL (X657.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Säulenexperimente:

- Fritten, PTFE, LiChrolut® (1.19891.0001, Merck, Darmstadt)
- Glassäulen, LiChrolut®, 3 mL, (1.19878, Merck, Darmstadt)
- Tygon®-Schlauch R3607, ID 1,85 mm, Wall: 0,86 mm (SC0068, Ismatec, Wertheim)

- Tygon®-Standardschlauch, ID 1,6 mm, AD 3,2 mm, (YL.81.1, Carl Roth, Karlsruhe)

- Verbindungsstücke, Luer-Anschluss, (CT62.1, Carl Roth, Karlsruhe)

- Verbindungsstücke, Schlauchverbinder, (CT33.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Schraubkappen mit Bohrung, ND9, für MS-Messungen (LC14.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Verschlussfilm für Mikrotiterplatten (EN76.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Zentrifugenröhrchen PP, 50 mL, unsteril (AN78.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Zentrifugenröhrchen PP, 15 mL, unsteril (AN76.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Zentrifugensäule (89896, Thermo Scientific, Rockford, USA)

Chemikalien

3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES, 09324, Fluka, Buchs, Schweiz)

3-(Ethyliminomethylidenamino)-*N,N*-dimethyl-propan-1-amin (EDC, 195804, Sigma-Aldrich, Steinheim)

5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure) (Ellmans-Reagenz, P8130, Sigma-Aldrich, Steinheim)

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES, H3375, Sigma-Aldrich, Steinheim)

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB, T2885, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Aceton, *Laboratory Reagent* (179973, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Acetonitril, *CHROMASOLV'R Plus, for HPLC*, (ACN, 34998, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Ameisensäure, *p.a. for MS* (94318, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Ammoniumhydroxid, 28 % NH₃ in H₂O, ≥99,99 % (338818, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Ascorbinsäure (95219, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Calciumchlorid (CaCl₂, C1016, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Casein (C5890, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB, 9161.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Diaminopolyethylenglykol, M~2000 g/mol (XTJ 502, Huntsman, Rotterdam, Niederlande)

Dikaliumhydrogenphosphat (K₂HPO₄, 60220, Sigma-Aldrich, Steinheim)

- Dinatriumphosphat (Dihydrat) ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.06329, Merck, Darmstadt)
- Dimethylsulfoxid, trocken (41647, Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Eisen(III)chlorid (Hexahydrat) ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 31232, Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Eisen(II)sulfat (Heptahydrat) ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 215422, Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Essigsäure (320099, Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Ethanol, *CHROMASOLV'R Plus, for HPLC, absolute* (34852, Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Ethanolamin (0342.1, Carl Roth, Karlsruhe)
- Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (Dihydrat) (EDTA, E-5134, Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Glutardialdehyd, 25 % in H_2O (820603, Merck, Darmstadt)
- Glycerol (G5516, Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Glycin (33226, Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Huminsäure Natriumsalz (7824, Carl Roth, Karlsruhe)
- Hydroxylaminhydrochlorid ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, 104619, Merck, Darmstadt)
- Kaliumcarbonat (K_2CO_3 , 1.04928, Merck, Darmstadt)
- Kaliumdihydrogencitrat (44415, Alfa Aesar, Karlsruhe),
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4 , 60220, Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Kaliumsorbat (85520, Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Magnesiumchlorid (Hexahydrat) ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2189.2, Carl Roth, Karlsruhe)
- Methanol, *CHROMASOLV'R Plus, for HPLC* (MeOH, 34860, Sigma-Aldrich, Steinheim)
- N,N'*-Dimethylformamid, *zur Analyse* (1.0650.2500, Merck, Darmstadt)
- N*-Hydroxysuccinimid (NHS, 56480, Sigma-Aldrich, Steinheim)
- N*-Succinimidyl-*S*-acethylthio-propionat (SATP, 26100, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig)
- Natriumacetat (trihydrat) ($\text{NaCH}_3\text{OO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 32318, Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Natriumazid (NaN_3 , 438456, Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Natriumcarbonat (Na_2CO_3 , 71628, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Natriumchlorid (NaCl, HN00.1, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Natriumcitrat, wasserfrei (HN13.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Natriumdihydrogenphosphat (dihydrat), ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 6345, Merck, Darmstadt)

Natriumdodecylsulfat (SDS, 71728, Fluka, Buchs)

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3 , 106329, Merck, Darmstadt)

Natriumhydroxid (NaOH, P031.2, Carl Roth, Karlsruhe)

Natriumiodacetat (I9148, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 217263, Sigma-Aldrich, Steinheim)

NHS-aktivierte Agarose Slurry, Pierce, (26200, Thermo Scientific, Bonn)

pH-Pufferlösung, pH 4,01 (9602.1, Carl Roth, Karlsruhe)

pH-Pufferlösung, pH 7,01 (9604.1, Carl Roth, Karlsruhe)

pH-Pufferlösung, pH 10,01 (9606.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Polyethylenglycol-8000 (PEG-8000, 0263.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Salpetersäure, 65 % (HNO_3 , 4989.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Salzsäure, rauchend 37% (HCl, 84422, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Salzsäure, ~4,0 M (HCl, 84435, Fluka, Buchs, Schweiz)

Schwefelsäure, 95–98 % (H_2SO_4 , 435589, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Stickstoff 5.0 (Air Liquide, München)

Tensid P20 (P20, BR-1000-54, GE Healthcare, Uppsala, Schweden)

Tetrachloridogoldsäure (HAuCl_4 , 520918, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Tetramethoxysilan (TMOS, 341436, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Tween 20 (8.17072, Merck, Darmstadt)

Wasser ROTISOLV[®] Ultra LC-MS (HN43.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Wasserstoffperoxid, 30 % (95321, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Pufferlösungen

Für alle Puffer wurde ausschließlich UV-Licht-vorbehandeltes Reinstwasser (dest. H₂O) verwendet (Reinstwasseranlage Milli-Q plus 185, Millipore).

Blocklösung ELISA (1 % Casein)

1 g Casein

PBS, ad 100 mL

Die Suspension wird auf 90 °C erhitzt, anschließend auf RT abgekühlt und durch einen Faltenfilter filtriert.

Coating-Puffer ELISA (pH 9.6)

Na₂CO₃, 1,59 g

NaHCO₃, 2,93 g

NaN₃, 0,2 g

Deionisiertes Wasser, ad 1000 mL

Immobilisierungspuffer SPR (pH 5)

NaCH₃OO, 1,36 g

Deionisiertes Wasser, ad 1000 mL

pH-Wert mit verdünnter Essigsäure einstellen

Phosphatpuffer ELISA (PBS, pH 7,6)

KH₂PO₄, 1,36 g

K₂HPO₄, 12,2 g

NaCl, 8,5 g

Deionisiertes Wasser, ad 1000 mL

Phosphatpuffer Goldnanopartikel (50 mM, pH 7,4)

NaH₂PO₄, 1,14 g

Na₂HPO₄, 5,75 g

Deionisiertes Wasser, ad 1000 mL

Die Phosphatpuffer anderer Molaritäten (10, 25, 100 und 200 mM) wurden jeweils um die Variation des entsprechenden Faktors hergestellt.

Phosphatpuffer Goldnanopartikel (20 mM, pH 8,0)

NaH₂PO₄, 127 mg

Na₂HPO₄, 2,69 g

Deionisiertes Wasser, ad 1000 mL

Phosphatpuffer Goldnanopartikel (50 mM, pH 8,0)

NaH₂PO₄, 318 mg

Na₂HPO₄, 6,72 g

Deionisiertes Wasser, ad 1000 mL

Regenerationspuffer Elution (pH 3,0)

Glycin, 7,51 g

NaCl, 5,84 g

1 g SDS

Deionisiertes Wasser, ad 1000 mL, mit H₂SO₄-Lösung auf pH 3,0 einstellen

Stopplösung ELISA (5% H₂SO₄)

98 % H₂SO₄, 50 mL

Deionisiertes Wasser, ad 1000 mL

Substratlösung ELISA

Substratpuffer, 25 mL

TMB-Stammlösung, 500 µL

H₂O₂ (1%), 100 µL

Substratpuffer ELISA (pH 3.8)

Kaliumdihydrogencitrat, 46,04 g

Kaliumsorbit, 0,10 g

Deionisiertes Wasser, ad 1000 mL

TMB-Stammlösung ELISA

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, 375 mg

DMSO, 30 mL

Waschpufferkonzentrat ELISA

KH_2PO_4 , 8,17 g

K_2HPO_4 , 73,16 g

NaCl , 52,6 g

Tween 20, 30 mL

Deionisiertes Wasser, ad 1000 mL

Waschpuffer ELISA (pH 7.6)

Waschpufferkonzentrat, 42 mL

Deionisiertes Wasser, ad 2500 mL

Waschpuffer Goldnanopartikel (pH 7,4)

NaH_2PO_4 , 114 mg

Na_2HPO_4 , 575 mg

PEG-8000, 1 mL

Deionisiertes Wasser, ad 1000 mL