

**Entwicklung eines immunologischen Testsystems
zur Detektion des marinen Biotoxins
Domoinsäure**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Melissa Faust
geb. in Bad Schwalbach

Mainz, August 2009

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.2010

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Marine Algentoxine: Eine Übersicht	1
1.2 Domoinsäure	6
1.2.1 Vorkommen.....	6
1.2.2 Wirkung.....	8
1.2.3 Biosynthese von Domoinsäure	11
1.2.4 Gesetzlicher Grenzwert von Domoinsäure	13
1.2.5 Analytische Erfassung von ASP-Toxinen	14
1.2.5.1 Bioassays.....	14
1.2.5.1.1 Maus-Bioassay.....	14
1.2.5.1.2 Rezeptor-Bindungsassay.....	15
1.2.5.2 Immunologische Assays	16
1.2.5.3 Chemische Verfahren.....	17
1.2.5.3.1 Dünnschichtchromatographie	17
1.2.5.3.2 Flüssigkeitschromatographie (LC).....	18
1.2.5.3.3 Kapillarelektrophorese (CE).....	19
2 ZIELSETZUNG	20
3 MATERIAL	21
3.1 Material	21
3.1.1 Chemikalien	21
3.1.2 Geräte.....	23
3.1.3 Antikörper und Enzyme	24
3.1.4 Puffer und Medien	24
3.1.5 Kits.....	26
3.1.6 Verbrauchsmaterialien.....	26
3.2 Versuchstiere.....	27
4 METHODEN	28
4.1 Synthese von Domoinsäure-Konjugaten.....	28
4.1.1. Synthese	28
4.1.1.1 Kopplung von Domoinsäure an Trägerproteine	28
4.1.1.2 Biotinylierung von Domoinsäure	32
4.1.2 Charakterisierung	33
4.1.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
4.1.2.2 Färbung der SDS-Polyacrylamidgele mit Coomassie	35
4.1.2.3 Western Blot	36
4.1.2.4 Dot Blot	38
4.1.2.5 UV-Spektroskopie	38
4.2 Herstellung polyklonaler Antikörper	39
4.2.1 Immunisierung und Serumzubereitung.....	39
4.2.2 Titerbestimmung des Immunsersums mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	40

4.2.3 Schachbrett-Titration	41
4.2.4 Aufreinigung polyklonaler Antikörper.....	43
4.2.5 Charakterisierung aufgereinigter polyklonaler Antikörper mittels ELISA.....	45
4.3 Herstellung monoklonaler Antikörper	46
4.3.1 Immunisierung.....	46
4.3.2 Zellfusion.....	47
4.3.3 Anzucht der Hybridomzellen	48
4.3.4 Subklonierung	49
4.3.5 Subklassentypisierung monoklonaler Antikörper	49
4.3.6 Aufreinigung und Konzentrierung monoklonaler Antikörper	49
4.3.7 Charakterisierung aufgereinigter monoklonaler Antikörper mittels ELISA	51
4.4 Assay zur Detektion von Domoinsäure	52
4.4.1 Assay zur Detektion von Domoinsäure mit OVA-DO	52
4.4.1.1 Kompetitions-ELISA mit OVA-DO	52
4.4.1.2 Sandwich-ELISA mit OVA-DO	53
4.4.1.3 Kompetitiver Sandwich-ELISA mit OVA-DO	55
4.4.1.4 Filtrationsplatten-ELISA mit OVA-DO	56
4.4.2 Assay zur Detektion von Domoinsäure mit Biotin-DO	59
4.4.2.1 Schicht-ELISA mit Biotin-DO	59
4.4.2.2 Filtrationsplatten-ELISA mit Biotin-DO	60
4.4.2.3 Kontrollreaktion zur Kompetiton in Filtrationsplatte	61
4.4.3 Testen der Methanolverträglichkeit	61
4.4.3.1 Methanolkompatibilität der Antigen-Antikörper-Reaktion	61
4.4.3.2 Methanolkompatibilität der Detektionsassays.....	61
4.4.4 Herstellung der <i>Mytilus</i> -Extrakte	62
4.4.4.1 <i>Mytilus edulis</i>	62
4.4.4.2 <i>Mytilus galloprovincialis</i>	62
5 ERGEBNISSE	64
5.1 Charakterisierung der Biotoxin-Konjugate	64
5.1.1 Charakterisierung der Biotoxin-Konjugate mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	64
5.1.2 Charakterisierung der Biotoxin-Konjugate mittels Dot Blot.....	66
5.1.2.1 Biotin-DO	66
5.1.2.2 OVA-DO.....	67
5.1.2.3 Trypsin-Inhibitor-DO	68
5.1.2.4 Casein-DO	69
5.1.3 Charakterisierung der Biotoxin-Konjugate mittels ELISA	69
5.1.3.1 Biotin-DO	70
5.1.3.2 Trypsin-Inhibitor-DO, OVA-DO, Casein-DO	71
5.1.4 Charakterisierung der Biotoxin-Konjugate mittels UV-Spektroskopie	72
5.2 Charakterisierung polyklonaler Antikörper	75
5.2.1 Titerbestimmung des anti-DO-Immunserums	75
5.2.2 Schachbrett-Titration	75
5.2.3 Aufreinigung polyklonaler Antikörper.....	76
5.3 Charakterisierung monoklonaler Antikörper.....	78
5.3.1 Überprüfen der Subklone im ELISA	78
5.3.2 Subklassentypisierung monoklonaler Antikörper	79
5.3.3 Aufreinigung monoklonaler Antikörper im ELISA	80
5.4 Assay zur Detektion von Domoinsäure	82
5.4.1 Assay zur Detektion von Domoinsäure mit OVA-DO	82

5.4.1.1	Kompetitions-ELISA mit OVA-DO	82
5.4.1.2	Sandwich-ELISA mit OVA-DO	83
5.4.1.3	Kompetitiver Sandwich-ELISA mit OVA-DO	84
5.4.1.4	Filtrationsplatten-ELISA mit OVA-DO	86
5.4.2	Assay zur Detektion von Domoinsäure mit Biotin-DO	90
5.4.2.1	Schicht-ELISA mit Biotin-DO	90
5.4.2.2	Filtrationsplatten-ELISA mit Biotin-DO	91
5.4.2.3	Kontrollreaktion zur Kompetition in Filtrationsplatte	95
5.4.3	Testen der Methanolkompatibilität	97
5.4.3.1	Methanolkompatibilität der Antigen-Antikörper-Reaktion	97
5.4.3.2	Methanolkompatibilität des Detektionsassays	98
6	DISKUSSION.....	101
6.1	Antikörpergewinnung.....	101
6.2	Synthese und Charakterisierung der Domoinsäure-Konjugate	102
6.3	Überprüfung der Grundlagen für den Detektionsassay.....	106
6.3.1	Kompetitions-ELISA	106
6.3.2	Sandwich-ELISA / Schicht-ELISA	106
6.3.3	Kompetitiver Sandwich-ELISA	107
6.3.4	Methanolkompatibilität	107
6.3.4.1	Methanolkompatibilität der Antigen-Antikörper-Reaktion	107
6.3.4.2	Methanolkompatibilität der Detektionsassays.....	108
6.4	Assay zur Detektion von Domoinsäure	109
6.4.1	Assay zur Detektion von Domoinsäure mit OVA-DO	109
6.4.2	Assay zur Detektion von Domoinsäure mit Biotin-DO	112
6.4.3	OVA-DO und Biotin-DO im Vergleich	114
6.5	Ausblick	116
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	117
8	ANHANG	120
8.1	Abbildungsverzeichnis	120
8.2	Tabellenverzeichnis	122
8.3	Abkürzungsverzeichnis	122
8.4	Literaturverzeichnis	126

1 EINLEITUNG

1.1 Marine Algentoxine: Eine Übersicht

Viele marine Organismen produzieren toxisch wirkende Substanzen (Müller *et al.*, 1997). Unter diesen sind marine Algentoxine für eine Reihe von Lebensmittelvergiftungen verantwortlich. Sie werden über die Nahrungskette weitergegeben und vom Menschen über den Verzehr von Meeresfrüchten und Fischen aufgenommen. In den USA werden 20% der Lebensmittelvergiftungen durch Meeresfrüchte und Fisch verursacht, von denen wiederum die Hälfte auf das Vorhandensein von marinen Algentoxinen zurückzuführen ist (Ahmed, 1991). In einigen Fällen werden die Toxine als Aerosole aufgenommen, was ebenfalls zu Erkrankungen führen kann.

Neben ihren Effekten auf den Menschen sind marine Toxine jedoch auch für das Sterben von Fischen, Schalentieren, marinen Säugern, Vögeln und anderen von der marinen Nahrungskette abhängigen Tieren verantwortlich. Hierbei wurden bisher hauptsächlich akute Vergiftungen beobachtet, wohingegen der Einfluss geringer, aber dauerhafter Toxin-Dosen auf die Gesundheit des Menschen und der Tiere bisher kaum untersucht wurde (Landsberg, 1996; Landsberg *et al.*, 1999; Burkholder, 1998; Edmunds, 1999).

Die Produzenten der Toxine sind einzellige Algen, die unter geeigneten Bedingungen aggregieren und dann hohe Zelldichten bilden. Dieses Phänomen ist auch als „Algenblüte“ bekannt. Diese wurde früher als „rote Tide“ bezeichnet, da es bei den Blüten einer *Euglena*-Art sowie des Cyanobakteriums *Oscillatoria rubescens* zu einer augenscheinlichen Rotfärbung des Wassers kommt. Lediglich 2% (60-80 Arten) der geschätzten 3400-4000 Phytoplanktonarten sind toxisch (Smayda, 1997). Für den Menschen gefährlich werden sie erst, wenn es zur Bildung der Algenblüte kommt, da vorher die Konzentration der Toxine zu gering ist. Man spricht dann von einer schädlichen Algenblüte (*harmful algal bloom, HAB*).

In den vergangenen vierzig Jahren hat sich das Vorkommen schädlicher oder

toxischer Algenblüten sowohl in seiner Häufigkeit als auch in seiner geographischen Ausbreitung erhöht (Anderson, 1989; Hallegraeff, 1993; Smayda, 1990). Anthropogene Einflüsse spielen hierbei eine bedeutende, wenn auch nicht alleinige Rolle. So z.B. gelangen nicht einheimische Arten im Ballastwasser von Frachtschiffen in fremde Gewässer, Schalentiere werden umgesiedelt, die zunehmende Eutrophierung der Gewässer verursacht lokale und regionale Veränderungen der Umwelt. Darüber hinaus tragen Klimaschwankungen und die durch Treibhausgase begünstigte globale Erderwärmung zu Störung der Gleichgewichte bestehender Ökosysteme bei. Letztendlich tragen aber auch die zunehmende wissenschaftliche Erkenntnis über schädliche und toxische Phytoplanktonarten und deren Vielfalt sowie ein zunehmendes Problembewusstsein zu einem augenscheinlich erhöhten Auftreten schädlicher und toxischer Algenblüten bei.

Zwei Gruppen von Algen produzieren Toxine, die für den Menschen schädlich sind: Die Dinoflagellaten und die Diatomeen. Zooplankton, herbivore Fische und filtrierende Schalentiere wie Muscheln nehmen diese Algen auf, speichern die darin enthaltenen Toxine in ihren eigenen Geweben (Müller *et al.*, 2007) und geben diese direkt oder indirekt über die Nahrungskette an den Menschen weiter. Die resultierenden Lebensmittelvergiftungen werden in fünf Klassen unterteilt: PSP (*paralytic shellfish poisoning*), NSP (*neurotoxic shellfish poisoning*), DSP (*diarrhetic shellfish poisoning*), CFP (*ciguatera fish poisoning*) und ASP (*amnesic shellfish poisoning*).

Tab. 1 gibt einen Überblick über die verursachenden Toxine, deren Produzenten, die primären Überträger innerhalb der Nahrungskette sowie die pharmakologischen Angriffspunkte der Toxine. Die Gifte sind hitzestabil, so dass ihre Toxizität durch Garen der Meeresfrüchte bzw. Fische nicht herabgesetzt wird (Van Dolah, 2000).

Vergiftungs- erscheinung	Toxine	Produzenten	Überträger	Angriffspunkt
PSP <i>paralytic shellfish poisoning</i>	Saxitoxine	<i>Alexandrium spp.</i> <i>Gymnodinium spp.</i> <i>Pyrodinium spp.</i>	Schalentiere	spannungabhängiger Natriumkanal
NSP <i>neurotoxic shellfish poisoning</i>	Brevetoxine	<i>Gymnodinium breve</i>	Schalentiere	spannungabhängiger Natriumkanal
CFP <i>ciguatera fish poisoning</i>	Ciguatoxine	<i>Gambierdiscus toxicus</i>	Fisch	spannungabhängiger Natriumkanal
DSP <i>diarrhetic shellfish poisoning</i>	Dinophysistoxine Okadasäure	<i>Dinophysis spp.</i> <i>Prorocentrum spp.</i>	Schalentiere	Ser/Thr-Proteinphosphatase
ASP <i>amnesic shellfish poisoning</i>	Domoinsäure	<i>Pseudo-nitzschia spp.</i>	Schalentiere	Glutamatrezeptor

Tab. 1: Übersicht über die von marinen Algentoxinen ausgelösten Vergiftungserscheinungen

Paralytic shellfish poisoning wird durch den Verzehr von mit Saxitoxinen kontaminierten Muscheln hervorgerufen. Produziert werden die Saxitoxine von Dinoflagellaten der Gattungen *Alexandrium*, *Gymnodinium* und *Pyrodinium*. Weltweit treten jährlich etwa 2000 Fälle von PSP auf, von denen 15% tödlich verlaufen (Hallegraeff, 1993). Zusätzlich zu den Vergiftungserscheinungen beim Menschen wurde auch schon über tödliche Saxitoxin-Vergiftungen von Vögeln und Buckelwalen berichtet (Nisbet, 1983; Geraci *et al.*, 1989).

Die Saxitoxine binden an spannungsabhängige Natriumkanäle der Membranen sowohl von Nerven- als auch von Muskelzellen; sie blockieren dadurch den Durchtritt von Natriumionen und somit die Aktivität der Neuronen und Muskeln (Van Dolah, 2000). Dies führt innerhalb kurzer Zeit ($\leq 1h$) zunächst zu Kribbeln und Taubheitsgefühlen in den Extremitäten und den perioralen Bereichen, Schläfrigkeit, Verlust der motorischen Kontrolle und im Extremfall zu

respiratorischer Lähmung. Die LD₅₀ der Saxitoxine liegt bei 10 µg/kg bei intraperitonealer, 263 µg/kg bei oraler Verabreichung (Sinclair *et al.*, 2001).

Neurotoxic shellfish poisoning wird hauptsächlich durch den Verzehr von mit Brevetoxinen kontaminierten Muscheln hervorgerufen. Produziert werden die Brevetoxine von Dinoflagellaten der Art *Gymnodinium breve*. Zusätzlich zu dem Weg über die Nahrungskette werden Brevetoxine auch über die Atemluft als Aerosole aufgenommen und können bei entsprechender Konzentration ein *neurotoxic shellfish poisoning* hervorrufen, ohne dass die betroffene Person Meeresfrüchte oder Fisch verzehrt hat. Aufgrund mangelnden mechanischen Schutzes von *Gymnodinium breve* brechen diese einzelligen Algen in turbulenten Gewässern oder auch während der Passage der Kiemen von Fischen relativ leicht auf, weshalb die Brevetoxine zum einen an der Wasseroberfläche als Aerosole freigesetzt werden, zum anderen während der Algenblüte für das Massensterben von Fischen verantwortlich sind (Van Dolah, 2000).

Die Brevetoxine binden an spannungsabhängige Natriumkanäle (Poli *et al.*, 1986), jedoch an einer anderen Stelle als die Saxitoxine. Dies zeigt den gegenteiligen Effekt, der in einem übersteigerten Ionenfluß resultiert. Das NSP äußert sich in Übelkeit, Kribbeln und Taubheitsgefühle der perioralen Bereiche, Verlust der motorischen Kontrolle sowie starken Muskelschmerzen. Anders als durch Saxitoxine sind bisher allerdings keine durch Brevetoxine verursachten tödlichen Vergiftungen beim Menschen beobachtet worden. Die LD₅₀ der Brevetoxine liegt bei 200 µg/kg (Van Dolah, 2000).

Ciguatera fish poisoning wird durch den Verzehr von mit Ciguatoxinen kontaminiertem Fisch hervorgerufen. Dinoflagellaten der Art *Gambierdiscus toxicus* produzieren eine Vorstufe der Ciguatoxine. *Gambierdiscus toxicus* wächst als Epiphyt auf fadenförmigen Makroalgen und wird so von herbivoren Fischen und Invertebraten aufgenommen. Die chemischen Vorläufer werden zu Ciguatoxinen biotransformiert (Lewis *et al.*, 1993) und auf den höheren Ebenen der Nahrungskette akkumuliert. Vor allem große carnivore Fische wie

Barrakudas, Schnapper, Zackenbarsche und Makrelen, aber auch einige kleinere herbivore Fische enthalten größere Mengen an Ciguatoxinen. Jährlich treten etwas 50000 Fälle von CFP auf, von denen aber nur sehr wenige tödlich enden (Van Dolah, 2000).

Die Ciguatoxine binden wie die Brevetoxine an spannungsabhängige Natriumkanäle (Dechraoui *et al.*, 1999), was in einem übersteigerten Ionenfluß resultiert. Die Symptomatik umschließt im Allgemeinen gastrointestinale Störungen (Übelkeit, Erbrechen, Durchfall) in den ersten Stunden nach Aufnahme des Toxins, im weiteren Verlauf können sehr unterschiedliche Symptome wie Taubheitsgefühle in den Extremitäten und den perioralen Bereiche, gestörtes Temperaturempfinden, Muskel- und Gelenkschmerzen, Kopfschmerzen, Juckreiz, Tachykardie, Bluthochdruck, beeinträchtigt Sehvermögen und Lähmungen hinzukommen. Auf die Phase der akuten Vergiftung folgt meist eine chronische Phase, die Wochen, Monate und sehr selten sogar Jahre andauern kann (Freudenthal, 1990). Die LD₅₀ der Ciguatoxine liegt bei 0,25-4 µg/kg (Hirama *et al.*, 2001).

Diarrhetic shellfish poisoning wird ausgelöst durch Okadasäure und deren Derivate, den Dinophysistoxinen. Diese Verbindungen werden von Dinoflagellaten der Gattungen *Dinophysis spp.* und *Prorocentrum spp.* synthetisiert (Yasumoto *et al.*, 1979; Yasumoto *et al.*, 1980; Quilliam *et al.*, 1993; Lawrence *et al.*, 1998). Die Mikroalgen liegen an fadenförmige Algen assoziiert vor, die wiederum auf Muschelschalen wachsen.

Okadasäure und Dinophysistoxine sind Inhibitoren intrazellulärer Ser/Thr-Proteinphosphatasen (Wiens *et al.*, 2003). Diese Enzyme sind Komponenten von Signalkaskaden in eukaryotischen Zellen, über welche verschiedene Ionenhaushalts-, Neurotransmissions-, Zellzyklus- und Stoffwechselprozesse reguliert werden (Wera *et al.*, 1995). Gastrointestinale DSP-Symptome wie Erbrechen und Durchfall sind auf die Hyperphosphorylierung von Ionenkanälen der intestinalen Epithelien zurückzuführen (Cohen *et al.*, 1995) und gehen mit großen Flüssigkeitsverlusten einher. Bei entsprechender Behandlung verläuft

eine akute *DSP*-Vergiftung vergleichsweise harmlos. Allerdings haben sich Okadasäure und ihre Derivate als Tumorpromotoren herausgestellt (Suganuma *et al.*, 1988; Fujiki *et al.*, 1988), was die Frage aufwirft, in welchem Maßstab sie bei dauerhafter Exposition in geringen Dosen der Gesundheit des Menschen und der Tiere schaden. Die LD_{50} der Okadasäure liegt bei 192 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (intraperitoneal in Mäusen) (Yasumoto *et al.*, 1984).

Amnesic shellfish poisoning wird von Domoinsäure (DO) und deren Isomeren verursacht. Diese werden im Folgenden unter dem Begriff ASP-Toxine zusammengefasst und von verschiedenen *Pseudo-nitzschia*-Arten synthetisiert. Somit ist das ASP die einzige beim Menschen bekannte Vergiftung, die von Diatomeen ausgelöst wird. Diese Diatomeen werden von Muscheln wie *Mytilus edulis* filtriert und über deren Verzehr wird das enthaltene Gift an den Menschen weitergegeben. Als ASP-Symptome treten Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Krämpfe, Kopfschmerzen, Schwindel, Orientierungslosigkeit, epileptischen Anfälle sowie der Verlust des Kurzzeit-Gedächtnisses auf. Vom letzterem leitet sich die Bezeichnung dieser Vergiftungserscheinung ab. Auf die Entstehung der Symptome wird im folgenden Abschnitt 1.2.2 eingegangen. Die LD_{50} der Domoinsäure liegt bei 4 mg/kg (intraperitoneal in Mäusen, bei gastrointestinaler Aufnahme liegt sie höher, s. 1.2.2) (Iverson *et al.*, 1989).

1.2 Domoinsäure

1.2.1 Vorkommen

Im Winter 1987 traten bei Menschen, welche aus den Gewässern um Prince Edward Islands, Kanada, stammende Muscheln aßen, erhebliche Vergiftungserscheinungen auf. Dabei wurde die Diatomee *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseriis* als Toxinproduzent entdeckt (Wright, 1989).

Inzwischen sind mindestens sieben *Pseudo-nitzschia*-Arten als Domoinsäureproduzenten bekannt (Van Dolah, 2000). Sie zählen zur Familie der Bacillariophyceae (Diatomeae, Kieselalgen), Ordnung Pennales. Die Diatomeae

sind mit über 10.000 Arten in 200 Gattungen eine Gruppe äußerst formenreicher, teilweise zu Bändern und Fächern vereinigter kokkaler Einzeller. Als einzigartiges Merkmal besitzen sie zwei innerhalb der äußeren Plasmenschicht gelagerte Silikatschalen. Die ältesten Vertreter sind seit dem Jura bekannt.

Weltweit stellen die Diatomeen rund ein Viertel der pflanzlichen Biomasse. Die im Süßwasser und im Meer vorkommenden, mikroskopisch kleinen Einzeller sind die bedeutendsten Biomasse- und Sauerstoffproduzenten. Durch Photosynthese wandeln sie das Treibhausgas Kohlendioxid in organische Substanz um und spielen damit eine entscheidende Rolle im globalen Kohlenstoffkreislauf. Wenn die Einzeller sterben, bleiben die aus Kieselerde (Siliziumdioxid) bestehenden Zellwände erhalten und sinken auf den Meeres- oder Seeboden und bilden eine Ablagerung, die als Kieselgur oder Diatomeenerde bezeichnet wird.

Der Wissenschaft liefern die Schalen fossiler Kieselalgen wertvolle Informationen über vergangene Umwelt- und Klimabedingungen und dienen als Leitfossilien zur erdgeschichtlichen Datierung von Bodenschichten (Anonym 2005 b). Die Industrie nutzt Kieselgur in der Technik und Medizin; so dient es u. a. zur Herstellung von Filtersystemen, als Schleif- und Poliermittel z.B. in Zahnpasta, als Trägermaterial für chromatographische Systeme und Katalysatoren; wird Nitroglycerin mit Kieselgur gemischt, entsteht das stoßunempfindliche Dynamit.

Pseudo-nitzschia-Arten sind weltweit verbreitet und kommen in allen Meeren vor. Optimales Wachstum und Photosynthesebedingungen finden sie zwischen 15°C und 20°C. Jedoch wurden schon Algenblüten bei Wassertemperaturen von 3°C beobachtet (Van Apeldoorn *et al.*, 1999). Viel wichtiger als die Wassertemperatur scheint ausreichender Nährstoffgehalt und Licht im Wasser zu sein (Fryxell *et al.*, 1997). Schalentiere akkumulieren Domoinsäure entweder durch direkte Filtration der Algenzellen oder durch Aufnahme kontaminierter Organismen. Bei Aufnahme dieser Schalentiere mit der Nahrung kommt es dann zu Vergiftungserscheinungen.

Amnesic shellfish poisoning-Ausbrüche treten insbesondere in den Regionen um Australien und Kalifornien auf. Ihr Auftreten mehrt sich aber auch in Europa- so

konnten Mitte bis Ende der neunziger Jahre mehrere ASP-Ausbrüche in den Niederlanden, in Dänemark, in Portugal, in Spanien und in England beobachtet werden (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

Nicht nur der Mensch ist von Domoinsäure-Vergiftungen betroffen. Das Toxin wurde z.B. auch als Ursache des Massensterbens von Pelikanen und Kormoranen in der Bucht von Monterey, Kalifornien, im Jahre 1991 und des Massensterbens von Seelöwen in der gleichen Region im Jahre 1998 identifiziert (Fritz *et al.*, 1992; Work *et al.*, 1993; Guiland, 1999). In beiden Fällen war die Diatomee *Pseudo-nitzschia australis* Produzent des Toxins und Sardellen waren die Überträger.

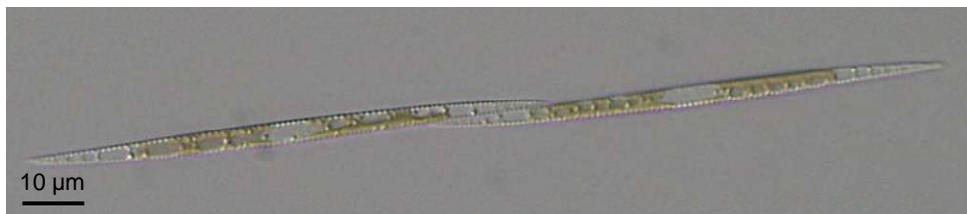


Abb. 1: Pseudo-nitzschia pungens
Quelle: Hasle (1995)

1.2.2 Wirkung

Wie in 1.1 beschrieben, treten als ASP-Symptome Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Krämpfe, Kopfschmerzen, Schwindel, Orientierungslosigkeit, epileptische Anfälle und der Verlust des Kurzzeit-Gedächtnisses auf. Bei konstitutionell schwachen Personen kann die Vergiftung tödlich enden.

Domoinsäure ist eine Tricarbonsäure, die aufgrund der ungesättigten Seitenkette in 4-Position, an der sich zusätzlich eine Carboxylgruppe befindet, mit 100fach höherer Affinität als Glutamat an ionotrope Glutamatrezeptoren bindet. Hierbei greift DO vor allem die hippocampalen und die umliegenden Bereiche an, welche v.a. für das Erinnerungsvermögen zuständig sind (Peng *et al.*, 1994; Hampson *et al.*, 1998). Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Zentralnervensystem. Seine Wirkungsweise ist ebenso vielfältig wie es die molekularen Strukturen der durch Glutamat aktivierbaren Rezeptoren sind. Das

glutamaterge System nimmt modulierenden Einfluss auf nahezu sämtliche Neurotransmittersysteme. Zudem spielt Glutamat in wichtigen zentralnervösen Prozessen wie der hippokampalen Langzeitpotenzierung, einem zellulären Modell für Lernen und Gedächtnis eine zentrale Rolle.

In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass eine an sich physiologische Substanz wie Glutamat in an sich physiologischen Dosen neurotoxisch wirken kann. Gibt man Glutamat zu Zellkulturen von Neuronen, so sterben die Zellen in kurzer Zeit ab. In vivo kann man Kainsäure injizieren, um selektiv Neurone abzutöten. Dabei ist nicht die Kainsäure direkt wirksam, vielmehr erst die durch Kainsäure aus glutamatergen Neuronen freigesetzte Glutaminsäure. Diese zytotoxische Wirkung wird durch NMDA(N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren vermittelt, die durch Glutamatagonisten wie Kainsäure und Domoinsäure besetzt werden (Dingermann *et al.*, 2002). NMDA-Rezeptoren sind durch langsame Kinetik und hohe Ca^{2+} -Permeabilität gekennzeichnet. Domoinsäure greift vor allem die hippokampalen und die umliegenden Bereiche, wie den entorhinaler Kortex (EC) und die Amygdala an (Strain *et al.*, 1991). Für die Abspeicherung von Erfahrungen scheinen der Hippokampus und der entorhinale Cortex, als „Tor zum Gedächtnis“ von besonderer Wichtigkeit zu sein. So sind Patienten mit bilateralen Schädigungen des Hippokampus und des EC nicht in der Lage, Neues zu erlernen. Interessanter Weise können sie sich aber an Gedächtnisinhalte, die vor der Schädigung erworben wurden, zum Teil erinnern. Daraus ist zu schließen, dass der Hippokampus-EC-Komplex für den Prozess des Speicherns von Informationen von entscheidender Bedeutung ist, aber keinen endgültigen, sondern nur eine Art Zwischenspeicher für Gedächtnisinhalte darstellt. Offenbar wird die Domoinsäure am Kainat-Rezeptor nicht nur stärker fixiert sondern auch schwer wieder abgelöst, was dazu führt, dass die Rezeptoren wesentlich langsamer desensibilisieren als bei Kainat (Hampson *et al.*, 1998). Als Folge hiervon kommt es zu einer Überstimulation mit exzitatorischen Transmittern (Glutamat) und sekundär zu einer Überschwemmung der Neurone mit Ca^{2+} - Ionen. Dies führt zu Hirnläsionen und

Gedächtnisverlust, zusätzlich wurde programmierter Zelltod (Apoptose) beschrieben (Giordano *et al.*, 2007).

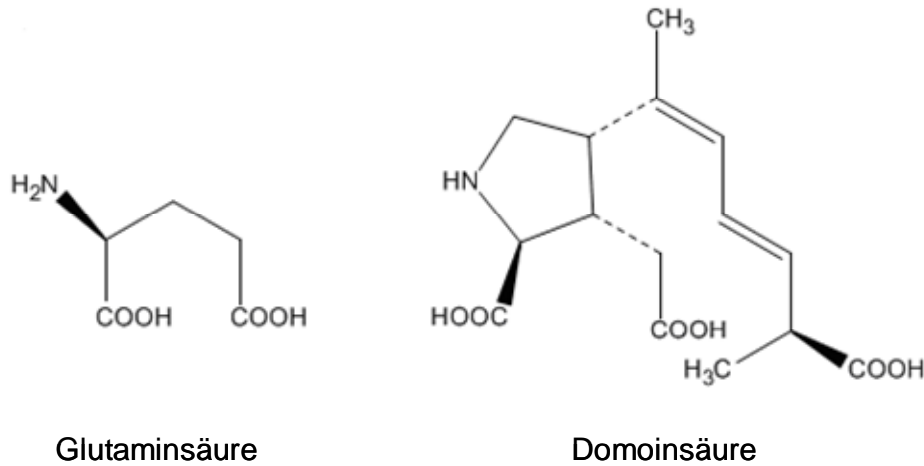


Abb. 2: Strukturanalogie von Domoinsäure und Glutaminsäure

Neben den beschriebenen pharmakologischen Wirkungen ist bemerkenswert, dass die tatsächliche Giftigkeit der Domoinsäure nach oraler Aufnahme weit unter der potentiellen Toxizität liegt. Dies liegt an ihrer Toxikokinetik: Geringe Anteile der DO werden im Darm absorbiert, sie passiert nur in geringem Maße die Blut-Hirn-Schranke und besitzt außerdem eine kurze Halbwertszeit in den meisten Gewebekompartimenten (Liston, 1990; Ramsdell, 2007; Iverson *et al.*, 1994; Preston *et al.*, 1991; Wright *et al.*, 1990; Iverson *et al.*, 1990). So kommt es, dass die LD₅₀ bei intraperitonealer Injektion bei Mäusen bei 4 mg/kg liegt, bei oraler Gabe hingegen bei 35-70 mg/kg (Iverson *et al.*, 1989). Im ASP-Ausbruch in Kanada 1987 allerdings erwiesen sich bereits Dosen von 1-5 mg/kg als toxisch, was auf eine unterschiedliche ASP-Anfälligkeit von Menschen und Nagetieren schließen lässt. Weiterhin zeigten sich ältere Menschen und Personen mit eingeschränkter Nierenfunktion als besonders anfällig (Preston *et al.*, 1991).

1.2.3 Biosynthese von Domoinsäure

Bei den toxischen *Pseudo-nitzschia*-Blüten handelt es sich um ein periodisch wiederkehrendes Phänomen. Um den Schutz vor ASP-Ausbrüchen zu erhöhen, ist es notwendig zu untersuchen, ob eine saisonale und/oder räumliche Vorhersage dieser Blüten möglich ist. Auch wenn berichtet wurde, dass *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseries* bei niedrigen wie auch bei hohen Temperaturen bis zu 30°C überleben kann, so liegt ihre optimale Wachstumstemperatur zwischen 15-20 °C (Villac *et al.*, 1993a). Dennoch sind die artspezifischen Blüten von *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseries* im späten Herbst oder Winter bei einer vorherrschenden Wassertemperatur von -1°C bis 3°C aufgetreten. Dies beweist, dass die Temperatur allein nicht der auslösende Faktor für die Entstehung von Algenblüten sein kann (Van Apeldoorn *et al.*, 1999). Auftrieb von kaltem Wasser mit hohen Stickstoffkonzentrationen, wie es in der Bucht von Monterey, Kalifornien, anzutreffen ist, kann sich positiv auf das Wachstum von *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseries* auswirken (Villac *et al.*, 1993b), allerdings ist der genaue Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Domoinsäureproduktion der genannten Kieselalgen und den ökologischen Bedingungen vor Ort nicht geklärt. Bates *et al.* (1991) haben gezeigt, dass die Verfügbarkeit von extrazellulärem Nitrat oder anderen Stickstoffquellen und die Gegenwart von Licht die Voraussetzungen sind für die DO-Synthese bzw. für die Wachstumsrate von *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseries*. Nährstoffbedingter Stress wurde ebenfalls als ursächliche Größe für das Auslösen einer DO-Synthese in Zusammenhang gebracht. Die Produktion von Domoinsäure konnte um den Faktor 3 gesteigert werden, sobald im Versuch das Wachstum verlangsamt und die Aufnahme von Silikat und Phosphat vermindert wurde (Van Apeldoorn *et al.*, 1999). Pan *et al.* (1998) haben gezeigt, dass sich die DO-Syntheserate erhöht, wenn die Zufuhr von Silizium, Phosphor, Vitaminen und Spurenelementen gesenkt wird. Eine Begrenzung der Verfügbarkeit dieser Nährstoffe kann zum einen den Primärstoffwechsel vermindern, zum anderen die Bereitstellung von Zwischenprodukten und Cofaktoren sowie die Expression von Genen, die in die DO-Synthese involviert sind, begünstigen.

Subba Rao *et al.* (1998) wiederum haben dargestellt, dass Kulturen von *Pseudonitzschia pungens* f. *multiseriis* nach Anreicherung mit Lithium (385,6 mM) wesentlich höhere Konzentrationen von DO (230 fg/Zelle) aufwiesen, allerdings bei gleichbleibender Menge an Stickstoff, Silizium bzw. Phosphor.

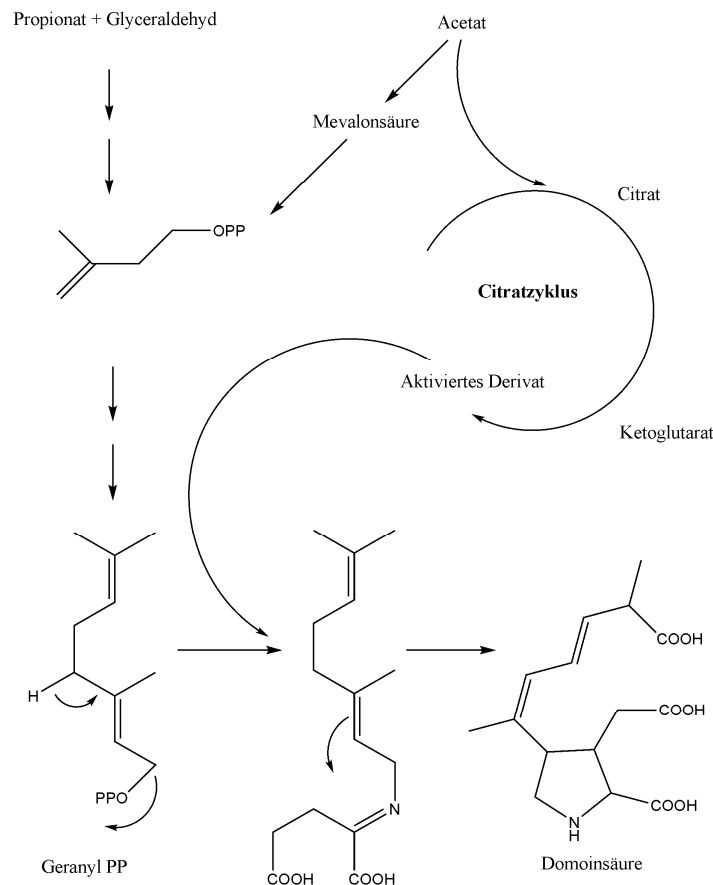


Abb. 3: Biosynthese von Domoinsäure

Quelle: Ramsey *et al.* (1998)

Versuche zur Aufklärung der Domoinsäuresynthese mit radioaktiv markiertem Acetat haben den Beweis erbracht, dass das Neurotoxin Domoinsäure durch Kondensation einer Isoprenoideinheit mit einem aktivierten Zwischenprodukt aus dem Citratzyklus, wahrscheinlich α -Ketoglutarat und anschließendem Prolin-Ringschluss entsteht (Douglas *et al.*, 1992; Ramsey *et al.*, 1998) (s. Abb.3). Dabei wird angenommen, dass die Biosynthese der beiden Derivate in unterschiedlichen Zellkompartimenten abläuft- während der Citratzyklus in den

Mitochondrien stattfindet, werden die Isoprenoideinheiten in den Chloroplasten bereitgestellt. (Ramsey *et al.*, 1998). Der gesamte Mechanismus ist allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt.

1.2.4 Gesetzlicher Grenzwert von Domoinsäure

Auch wenn die Mehrheit der ASP-Ausbrüche bisher in Nordamerika und Australien beobachtet wurde und z.B. in deutschen Küstengebieten seit 1988 gar keine ASP-Toxin bildenden Algenblüten mehr beobachtet wurden, ist die Gefahr von toxischen Algenblüten mit allen ihren Auswirkungen auf Tier und Mensch ein globales Problem. Durch den Import von Fisch und Meeresfrüchten, ob als Frischware oder Konserven, können Phykotoxinvergiftungen in allen Teilen der Erde auftreten. Um das gesundheitliche, ökologische und wirtschaftliche Risiko einer toxischen Algenblüte zu minimieren und letztendlich dem Verbraucher unbedenkliche Lebensmittel zu garantieren, hat das wissenschaftliche Komitee für Ozeanforschung (SCOR) und das *Intergovernmental Oceanographic Commission* (IOC) der UNESCO gemeinsam mit der *North Pacific Marine Science Organisation* (PICES) und dem *International Council for the Exploration of the Sea* (ICES) 1999 ein wissenschaftliches Programm über schädliche Algen (GEOHAB) aufgelegt. Unter anderem wird eine Datenbank über das weltweite Auftreten toxischer Algenblüten geführt, zudem werden mehr als hundert Wissenschaftler pro Jahr über den neuesten Stand der Forschung weitergebildet. Das oberste Ziel dieses Forschungsprogramms ist die Entwicklung eines Überwachungssystems, welches die Vorhersage von schädlichen Algenblüten ermöglicht und dadurch die Auswirkungen auf die Gesundheit der Menschen und der Meeresbewohner ebenso wie die verheerenden Folgen für die Wirtschaft und Gesellschaft der einzelnen Länder auf ein Mindestmaß reduziert (Fernández *et al.*, 2003). Zum Schutz des Verbrauchers wurde bereits 1991 durch die Richtlinie 91/492/EWG des EU-Rates zur Festlegung von Hygienevorschriften für die Erzeugung und Vermarktung von lebenden Muscheln die Regelung zur Kontrolle bestimmter Biotoxine in Muscheln eingerichtet. Die Untersuchungspflichten bezüglich der

marinen Biotoxine wurden in der Verordnung 2004/853/EG differenziert formuliert. Seitdem darf in allen essbaren Teilen lebender Muscheln der Gehalt an Domoinsäure 20 mg pro kg Muschelfleisch nicht überschreiten (Van Egmond *et al.*, 1992; Anonym 2004). Diese Höchstmengenregelung gilt gleichermaßen in der Europäischen Union im Allgemeinen wie in Deutschland im Speziellen (Anonym, 2005 a).

1.2.5 Analytische Erfassung von ASP-Toxinen

Die Einhaltung der gesetzlichen Regelung zum Schutz der Gesundheit durch Kontrollen und Überwachungsprogramme sowie das Voranschreiten der Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Algentoxine erfordern entsprechende analytische Methoden, mit denen diese Toxine eindeutig quantifiziert werden können. Hierzu steht eine Vielzahl unterschiedlicher Bestimmungsmethoden zur Verfügung, für deren Beurteilung die Einteilung in sogenannte Bioassays, immunologische und chemische Verfahren von Vorteil ist.

1.2.5.1 Bioassays

1.2.5.1.1 Maus-Bioassay

Dieses von der *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) für PSP-Toxine standardisierte und bereits 1937 entwickelte Verfahren bildet heute noch das Basistestsystem zum Nachweis von Toxinen innerhalb vieler Überwachungsprogramme. Es ist ebenfalls geeignet zur Detektion von DO bis zu einer Konzentration von 40 mg/kg Muschelgewebe. Hierbei injiziert man Mäusen intraperitoneal Muschelextrakte und misst die Zeit bis zum Tod der Versuchstiere. Parallel hierzu wird die Kalibrierung mit einer Standardlösung durchgeführt. Bei logarithmischem Auftrag der Dosis gegen den reziproken Wert der Zeit ergibt sich eine lineare Abhängigkeit. Bei diesem biologischen Test wird jedoch nur ein Wert für die Gesamtoxizität einer Probe in MU (Mouse units) · kg⁻¹ erhalten. 1 MU ist als die Menge an Toxin definiert, die ausreicht, um eine 20 g schwere männliche Maus innerhalb von 15 min nach intraperitonealer Injektion von 1 ml Muschenextrakt zu töten (Luckas, 1995). Diese Durchführung wurde

routinemäßig angewendet, als die Giftigkeit der ASP-Toxine erstmals in Kanada identifiziert werden konnte. Allerdings musste zur besseren Differenzierung zwischen der klassischen Symptomatik einer PSP-Vergiftung und der einer Intoxikation mit DO die Zeit bis zum Tod des Tieres von 15 min auf bis zu 4 h ausgedehnt werden. Die Nachweisgrenze des Maus-Bioassays liegt über dem in der Verordnung 2004/853/EG festgelegten Grenzwert von 20 mg/kg Muschelgewebe und ist laut Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) als Standard-Referenzmethode für die routinemäßige Analyse von Algentoxinen in Muscheln nicht geeignet. Dagegen schreibt die Europäische Kommission als Referenzmethode den Maus-Bioassay vor. In seiner Stellungnahme begründet das BfR die Unzuverlässigkeit dieses Testsystems anhand von wissenschaftlichen Untersuchungen und weist auf die schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Toxinanalysen in Abhängigkeit des verwendeten Mäusestamms, des Geschlechts und Gewichts der Tiere, zwischen den einzelnen Laboratorien der Mitgliedsstaaten ausdrücklich hin. Das BfR spricht sich gegenüber der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit EFSA (*European Food Safety Authority*) dafür aus, die Kombination aus der Flüssigkeitschromatographie mit der Massenspektrometrie, die sogenannte LC/MS-Methode als Referenzmethode zu etablieren, weil sie den Verbraucherschutz verbessert und gleichzeitig zum Tierschutz beiträgt (Anonym, 2005 b). Für die routinemäßige Erfassung von ASP-Toxinen wurde der AOAC Maus-Bioassay bereits von der sehr viel empfindlicheren LC/MS-Methode abgelöst (Cembella *et al.*, 1995).

1.2.5.1.2 Rezeptor-Bindungsassay

Bei diesem Verfahren konkurriert radioaktiv markierte Kainsäure mit Domoinsäure um die Bindungsstellen eines Glutamatrezeptors. Vorläufige Testergebnisse mit Extrakten von *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseriis* deuteten auf qualitativ gute Korrelation mit einer Kombination aus 9-(Fluorenylmethyl)chloroformiat-Derivatisierung und der HPLC hin (Van Dolah *et al.*, 1994). Die Nachweisgrenze und die Selektivität konnten durch die Entfernung

von endogenem Glutamat im Muschelgewebe als potentiellem Störfaktor durch Einsatz von Glutamatdecarboxylase in der Probenvorereitung optimiert werden. Der Rezeptor-Bindungsassay von Van Dolah *et al.* (1997) ist für die Analyse von DO aus Meerwasserextrakten von Algen und den DO-Nachweis in Schalentieren geeignet.

1.2.5.2 Immunologische Assays

Die Entwicklung der Prinzipien des Enzymimmunoassays (EIA), dessen erste Darstellung durch Engvall und Perlman 1971 erfolgte und „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) genannt wird, ist durch seine Einfachheit, Vielseitigkeit und Sensitivität entscheidend vorangetrieben worden. Für den ELISA werden aus Versuchstieren, die zuvor mit der zu untersuchenden Substanz immunisiert wurden, Antikörper gewonnen. Die spezifischen Antikörper gegen DO werden aus mit einem Peptid-DO-Konjugat immunisierten Kaninchen erhalten. Im Testsystem wird je nach Aufbau die Vertiefungen einer Polyvinylchlorid- oder Polystyrol-Mikrotiterplatte mit Antikörper oder Antigen beschichtet (Kemeny, 1994). Die Plastikoberfläche bindet zwar weder die Antikörper noch die Antigene kovalent, sondern über passive Adsorption- dies erfolgt jedoch mit erstaunlicher Stabilität. In einer bestimmten Abfolge werden die Vertiefungen dann weiter mit Antikörpern, Antigen und enzymkonjugierten Antikörpern beschichtet. Der Nachweis des Antigens erfolgt über eine enzymatische Chromogenumwandlung. Das lösliche und farblose Chromogen wird zu einem löslichen, gefärbten und quantifizierbaren Farbstoff umgesetzt- im Gegensatz zur Immunhistochemie, bei der der entstehende Farbstoff unlöslich wird. Alle Reaktionen des ELISA finden mit einem immobilisierten Partner statt, was die Trennung von gebundenen und nicht gebundenen Reagenzien erheblich erleichtert (Lottspeich *et al.*, 1998). Die Quantifizierung des farbigen Reaktionsproduktes erfolgt spektralphotometrisch. Beim ELISA besteht allerdings die Gefahr, dass stringente Wasch- und Inkubationsschritte einen Teil des adsorbierten Antigens oder Antikörpers wieder ablösen. Auch gibt es Antigene wie die DO, die sich nicht ohne weiteres an die Mikrotiterplatten

adsorbieren lassen, sondern zuerst an ein Trägermolekül gebunden werden müssen.

1.2.5.3 Chemische Verfahren

Um Aussagen über die individuellen Toxinkomponenten eines Extrakts bzw. einer Lösung zu treffen, sind speziell die chromatographischen Verfahren geeignet. Diese erlauben es, einzelne Verbindungen eindeutig und mit hoher Empfindlichkeit nachzuweisen. Die Chromatographie kann als Trennmethode definiert werden, in der eine gelöste Substanzmischung mit Hilfe eines Flüssigkeitsstromes über eine stationäre Phase geleitet und dabei in die einzelnen Bestandteile der Mischung aufgetrennt wird. Bei der Flüssigkeitschromatographie unterscheidet man abhängig von verwendeten Trägermaterial Säulen-, Papier- und Dünnschichtchromatographie. Wegen der vielseitigen Einsatzmöglichkeiten, der Automatisierbarkeit und der höheren Nachweisempfindlichkeit hat sich die Säulenchromatographie in den letzten Jahrzehnten durchgesetzt (Lottspeich *et al.*, 1998).

1.2.5.3.1 Dünnschichtchromatographie

DO kann mittels Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden, da dieses Toxin unter UV-Licht eine schwache Löschung und nach Besprühen der Platte mit einer 1%igen Ninhydrinlösung eine charakteristische gelbe Färbung zeigt (Quilliam *et al.*, 1998). Ein Nachteil dieses Verfahrens besteht in seiner Störanfälligkeit bei Anwesenheit anderer Aminosäuren und ist daher als Standardmethode zur Untersuchung von Rohextrakten nicht geeignet. Erfolgt jedoch eine Probenvorbereitung bestehend aus einer Festphasenextraktion (SPE) kombiniert mit einer Anionenaustauscherkartusche können mittels eindimensionaler Dünnschichtchromatographie Nachweisgrenzen von 0,5 mg DO erreicht werden, was einer Bestimmungsgrenze von 10 mg DO/g Muschelgewebe entspricht. Die Detektion erfolgt visuell durch Besprühen der Platte mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz (Wright *et al.*, 1995).

1.2.5.3.2 Flüssigkeitschromatographie (LC)

Die hochdruckflüssigkeitschromatographischen (HPLC) Methoden zur Bestimmung von ASP-Toxinen basieren aufgrund des ionischen Charakters der DO und ihrer Isomere auf dem Prinzip der Ionenaustauschchromatographie. Die Detektion erfolgt mittels UV-Spektroskopie, da DO eine starke Absorption bei 242 nm zeigt. Die Nachweisgrenze des LC/UV-Verfahrens liegt bei 10-80 ng DO/ml und ist abhängig von der Empfindlichkeit des Detektors. Die Nachweisgrenze im Muschelgewebe wird im Wesentlichen durch die Art der Extraktion und die Vorreinigung der Proben bestimmt. In der von Lawrence 1995 entwickelten Methode wird DO aus homogenisiertem Muschelgewebe durch Kochen der Proben für 5 min mit 0,1 M HCl gewonnen, ähnlich der von der AOAC für den Maus-Bioassay zum Nachweis von PSP-Toxinen vorgeschlagenen Extraktion. Die Proben werden anschließend unter Kühlung zentrifugiert. Die Absorption eines Aliquots aus dem Überstand der Proben kann nach Verdünnung mittels isokratischer LC/UV bei 242 nm analysiert werden. Bei der Analyse von wässrig/methanolischen Rohextrakten, die nicht vorgereinigt werden, liegt die Bestimmungsgrenze bei 1 mg DO/g Muschelgewebe (Lawrence *et al.*, 1989a). Bei Anwesenheit von Tryptophan und dessen Derivaten sind falsch positive Ergebnisse bei Rohextrakten nicht selten, da diese Substanzen, die oft in beträchtlichen Mengen in Muschelgewebe vorkommen, mit gleicher Geschwindigkeit eluieren. In diesem Fall kann ein Diodenarray-Spektrometer zum Vergleich herangezogen werden. Eine sehr empfindliche Methode basiert auf der Reaktion von DO mit 9-Fluorenylmethylchloroformiat zum Fluorenylmethoxycarbonyl-Derivat (FMOC), die Analyse erfolgt nach LC-Trennung mittels fluorimetrischer Detektion und eignet sich zur Untersuchung von Phytoplankton und Meerwasser. Die Derivate absorbieren bei 260 nm und fluoreszieren bei 305 nm. Bei diesem Verfahren liegt die Nachweisgrenze bei 15 pg DO/ml Meerwasser (Pocklington *et al.*, 1990). Dieses Testsystem wurde an die Anforderung für die Untersuchung von Muschelextrakten angeglichen (Wright *et al.*, 1995).

2002 konnte eine übergreifende Studie zur Bewertung der neuen gekoppelten Anwendung der Flüssigkeitschromatographie mit der substanzspezifischen Massenspektrometrie, der LC/MS, durchgeführt werden. Die acht teilnehmenden Labore haben übereinstimmende Ergebnisse für die zu analysierenden Toxine bis zu einer Nachweisgrenze von <5 ng DO/ml erhalten, was einer Bestimmungsgrenze von 0,05 mg DO/ kg Muschelfleisch entspricht (Holland *et al.*, 2003).

1.2.5.3.3 Kapillarelektrophorese (CE)

Das Trennprinzip der Elektrophorese beruht auf der unterschiedlichen Migration von geladenen Teilchen in Abhängigkeit vom pH-Wert in einem elektrischen Feld. Bei der Kapillarzonenelektrophorese (CZE) findet die Trennung in engporigen Quarzkapillaren (25-100 µm) mit einer Länge von 0,2-2 m statt. Die Kapillare ist mit einem einheitlichen Elektrolytsystem gefüllt, um den Stromtransport zu gewährleisten und um eine einheitliche Feldstärke sowie einen konstanten pH-Wert aufrecht zu erhalten. Wird eine Spannung von 20-30 kV angelegt, bewegen sich die Komponenten der Probe entsprechend ihrer Mobilitätsunterschiede, d.h. in Abhängigkeit von ihrer Größe und Ladung durch die Trennkapillare und können anschließend detektiert werden (UV-Absorption, Fluoreszenz). Nguyen *et al.* berichteten 1990 über eine Nachweisgrenze von 2 mg DO/ g eines behandelten Extraktes aus Muschelgewebe, die mit Hilfe der CE erreicht werden konnte. Die Nachweisgrenze im feuchten Gewebe liegt bei 10 mg DO/ g. Domoinsäure konnte dabei innerhalb von 10 min von den restlichen Inhaltsstoffen des Extraktes abgetrennt werden. Ein weiterer Vorteil dieses Testsystems besteht in den kleinen Probenvolumina; die CE setzt 3-15 nl Proben voraus und findet daher auch bei beschränktem Probenumfang Anwendung.

2 ZIELSETZUNG

Aufgenommen über den Verzehr von Muscheln kann das marine Algentoxin Domoinsäure lebensbedrohliche Vergiftungen auslösen. In Anbetracht der aufwändigen bzw. ethisch fragwürdigen gängigen Testsysteme wie Flüssigkeitschromatographie und Maus-Bioassay (s. 1.2.5) erscheint die Etablierung einer alternativen Methode zum Nachweis des Biotoxins erstrebenswert.

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Immunoassays zur Detektion von Domoinsäure in Muschelgewebe. Hierfür sollen zunächst polyklonale und monoklonale Antikörper gegen Domoinsäure hergestellt werden. Hierzu müssen als erstes geeignete Biotoxinkonjugate synthetisiert werden, sowohl für die Immunisierung bei der Antikörpergewinnung, als auch für den Einsatz im zu entwickelnden Testsystem selbst. Die Charakterisierung der Konjugation soll mittels Western Blot, Dot Blot und ELISA erfolgen. Als geeignetes Testsystem für die Anwendung der hergestellten Antikörper wird eine spezielle Art von ELISA entwickelt (s. 4.4). Hierbei soll ein synthetisiertes Domoinsäure-Konjugat bekannter Konzentration zusammen mit der auf das Biotoxin zu untersuchenden Lösung in einer Filtrationsplatte inkubiert werden, die zuvor mit dem hergestellten anti-Domoin säure-Antikörper beschichtet wurde. In der Filtrationsplatte sollen das Domoinsäure-Konjugat und die mutmaßlich in der Probe vorhandene Domoinsäure um die Bindestellen am Antikörper konkurrieren. Ungebundenes Biotoxin-Konjugat soll daraufhin durch die Filtrationsplatte gesaugt und in einer herkömmlichen Mikrotiterplatte mittels Sandwich- bzw. Schicht-ELISA detektiert werden. Die in einer zu untersuchenden Probe möglicherweise vorhandene Domoinsäure soll somit indirekt über die Detektion eines kompetitierenden Domoinsäure-Konjugats nachgewiesen werden.

Der Vorteil dieses Testsystems soll in seiner einfachen Handhabung den heute üblichen Standardtests gegenübergestellt werden. Anhand kontaminierter Muschelextrakte (*Mytilus edulis* bzw. *Mytilus galloprovincialis*) soll die Funktionalität des neuen Testsystems gezeigt werden.

3 MATERIAL

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid-Stammlösung: Rotiphorese [®] Gel 40 (19:1)	Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V, <i>fatty acid free from bovine serum</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
Albumin <i>from chicken egg</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniaklösung	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L(+)-Ascorbinsäure	AppliChem, Darmstadt
Avidin (<i>NeutrAvidin[™]</i>)	ThermoFisher Scientific Schwerte
Borsäure	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Casein <i>sodium salt from bovine milk</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chlornaphthol [™] 1-Step	ThermoFisher Scientific, Schwerte
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie Gel Code [®] Blue Stain reagent	ThermoFisher Scientific, Schwerte
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Domoinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol	Roth, Karlsruhe
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat	Roth, Karlsruhe
FID 33 (Trägerpeptid)	Bachem AG, Schweiz
Flüssigstickstoff	Linde, Wiesbaden
Fötales Bovines Serum (FCS, Fötales Kälberserum)	Biochrom, Berlin
Freunds Adjuvans	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glucose D(+) - wasserfrei	Merck, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Guanidin HCl	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe

Kaliumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Kaliumsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Keyhole limpet hemocyanin (KLH)</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Roth, Karlsruhe
Meersalz	Tropic Marin, Wartenberg
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	AppliChem, Darmstadt
Natriumphosphat	Roth, Karlsruhe
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
Nitrotetrazoliumblausulfat (NBT)	Roth, Karlsruhe
2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Phosphatpuffer, salinisch, 10x nach Dulbecco (PBS)	AppliChem, Darmstadt
Polyethylenglykol 6000	Serva, Heidelberg
Protease-Inhibitor-Cocktail <i>Complete-Mini</i>	Roche, Mannheim
Protein A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein-Gelladepuffer <i>Roti[®]-Load 1</i>	Roth, Karlsruhe
Protein-Längenstandard <i>Peq Gold Protein Marker</i>	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Protein-Längenstandard <i>Precision Plus Protein Standards Dual Color</i>	Bio-Rad, München
Roti-Quant	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure	Roth, Karlsruhe
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, <i>Sure Blue ReserveTM</i>	
<i>TMB Microwell Peroxidase Substrate (1-Component)</i>	KPL, Gaithersburg; USA

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin,
TMB Membrane Peroxidase Substrate (1-C)
 Trypsininhibitor from *Glycine max* (soybean)

KPL, Gaithersburg; USA
 Sigma-Aldrich,
 Taufkirchen
 Sigma-Aldrich,
 Taufkirchen

Tween[®]20

3.1.2 Geräte

Blottingkammer für Western Blot

Bio-Rad, München

Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Transfer Cell

Brutschrank Modell 400

Memmert, Schwabach
 Bartolomey, Rheinbach

ELISA-Reader *Titertek Multiskan[®] Plus MK II*

Severin, Sundern

Folienschweißgerät FS 3602

Bosch, Stuttgart

Gefrierschrank -20°C

Nunc, Wiesbaden

Gefrierschrank -80°C *ilShin[®]*

Eppendorf, Hamburg

Heizblock/Schüttler für Reaktionsgefäße

Thermomixer comfort

Kolbenhubpipetten

100 - 1000 µl

Eppendorf, Hamburg

20 - 200 µl

Eppendorf, Hamburg

2 - 20 µl

Gilson, Villiers-Le-Bel;
 Frankreich

0,5 - 10 µl

Eppendorf, Hamburg

Kühlschrank +4°C

Bosch, Stuttgart

Laminar Flow Sterilbank

Slee, Mainz

Magnetrührer *IKA-Combimag RCH*

Ika Werk, Staufen

Mikrowelle *Selection*

Samsung, Schwalbach

pH-Meter *pH330*

WTW, Weilheim

Pistill

Haldenwanger, Berlin

Powersupply für Gelelektrophorese und Western Blot

Bio-Rad, München

Modell PowerPac 300

Proteinelektrophoreseeinheit *Mini-Protean 3 Cell*

Bio-Rad, München

Scanner

Epson Perfection 1250 Photo

Epson, Nagano-Ken;
 Japan

Odyssey Infrared Imaging System

Li-Cor Biotechnology,
 Lincoln; USA

Schüttelinkubator *Modell Kühner*

Braun, Melsungen

Spektrophotometer

Smart SpecTM Plus

Bio-Rad, München

Genequant II

Pharmacia, Freiburg

Ultraschall-Desintegrator

Heinemann,

Schwäbisch Gmünd

Ultraschallbad *Bandelin Sonorex RK 100*

Bender& Hohbein, Zürich;
 Schweiz

Vortexer <i>Reax 2000</i>	Heidolph, Kehlheim
Waage <i>AB 104</i>	Mettler Toledo, Gießen
Waage <i>PT 120</i>	Sartorius, Göttingen
Wasserbad mit Thermostat und Schüttler	Köttermann, Hänigsen
Zählkammer Neubauer	Merck, Darmstadt
Zentrifugen	
<i>Centrifuge 5804 R</i>	Eppendorf, Hamburg
<i>Centrifuge 5415 C</i>	Eppendorf, Hamburg
<i>Biofuge fresco</i>	Heraeus instruments, Hanau
 <i>Mini Centrifuge</i>	National Labnet, Woodbridge; USA

3.1.3 Antikörper und Enzyme

Avidin-gekoppelte HRP <i>ExtrAvidin[®]-Peroxidase</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Primärantikörper polyklonale Antiseren aus Kaninchen anti-DO 387 anti-DO AS 8990	eigene Herstellung Immundiagnostik, Bensheim
monoklonale Antikörper anti-DO VIII D1 E9 E2 F2 <i>Monoclonal Anti-Chicken Egg Albumin (Ovalbumin) antibody produced in mouse</i>	eigene Herstellung Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sekundärantikörper <i>Anti-Rabbit IgG (whole molecule), F(ab')₂ fragment Alkaline Phosphatase antibody produced in goat Goat-Anti-Mouse IgG (subclasses 1+2a+2b+3) Fc Fragment specific-Peroxidase Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-Peroxidase (F(ab')₂-Fragments)</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen Dianova, Hamburg Dianova, Hamburg

3.1.4 Puffer und Medien

Fötale Bovines Serum (FCS, Fötale Kälberserum)	Biochrom, Berlin
<i>HAT Media Supplement (50 x) Hybri-MaxTM</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>HT Media Supplement (50 x) Hybri-MaxTM</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Hybridomed DIF 1000 serumfreies Medium</i>	Biochrom, Berlin

SDS-Laufpuffer

- 25 mM Tris
- 192 mM Glycin
- 0,1% SDS (w/v)

Transferpuffer:

- 25 mM Tris
 - 192 mM Glycin
 - 20% Methanol (v/v)
- pH 8,3

Blockierungslösung für Western- und Dot Blot

- 3% BSA in TBS (w/v)

TBS:

- 10 mM Tris-HCl, 8,0
- 150 mM NaCl

TBST:

- 0,05% Tween 20 in TBS (v/v)

PBS:

- 137 mM NaCl
 - 2,7 mM KCl
 - 9,6 mM Na₂HPO₄
 - 1,8 mM KH₂PO₄
- pH 7,2

PBST:

- 0,05% Tween 20 in PBS (v/v)

Blockierungslösung für ELISA

- 3% BSA in PBS (w/v)

Extraktionspuffer 1:

- 0,5 M NaCl
 - 5 mM Tris
 - 7 mM Na₂SO₄
 - 0,4 mM NaHCO₃
 - 10 mM EDTA
 - Protease Inhibitor Cocktail (ROCHE) 1Tabl./10ml
- pH 7,2

Extraktionspuffer 2:

- TBS pH 7,5
- 1 mM EDTA
- 1% Nonidet-P-40
- 10 mM NaF
- 1 mM Na-Orthovanadat
- Protease Inhibitor Cocktail (ROCHE) 1Tabl./10ml

3.1.5 Kits

<i>EZ-Link™ Biotin-LC-PEO-Amine</i>	Thermofisher Scientific, Schwerte
<i>Pierce® Thiophilic Adsorbtion Kit</i>	Thermofisher Scientific, Schwerte
<i>Protein A Agarose Kit</i>	KPL, Gaithersburg; USA

3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Dialysekassetten	
<i>Slide-A-Lyzer 3.5K MWCO Dialysis Cassettes</i> und	Thermofisher Scientific,
<i>Slide-A-Lyzer 10K MWCO Dialysis Cassettes</i>	Schwerte
Einmalspritzen	Braun, Melsungen
Entsalzungsröhrchen	
<i>Zeba Desalt Spin Columns, 0,5 ml,</i>	
<i>for 30-130 µl samples</i>	
<i>Zeba Desalt Spin Columns, 2 ml,</i>	
<i>for 200-700 µl samples</i>	
<i>Zeba Desalt Spin Columns, 5 ml,</i>	Thermofisher Scientific,
<i>for 500-2000 µl samples</i>	Schwerte
Membranen	
Nitrocellulosemembran <i>Trans Blot</i> , 0,45 µm	Bio-Rad, München
Polyvinylidendifluoridmembran	
<i>Immobilon P</i> , 0,45 µm	Millipore, Schwalbach
Multiwellplatten:	
96-wells BD Falcon™ ProBind	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey; USA
24-wells	Nunc, Wiesbaden
12-wells	Falcon, New Jersey; USA
6-wells	Nunc, Wiesbaden
Multiscreen-HTS-IP Filtrationsplatte mit	Millipore, Schwalbach
<i>Immobilon-P-Membran</i> 0,45 µm	
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	ABGene, Epsom; UK
Petrischalen	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Roth, Karlsruhe

Pipettenspitzen ART mit Filtereinsatz	Eppendorf, Hamburg
Plastikbeutel Plastibrand	Biozym, Hess. Oldendorf
Reaktionsgefäße	Brand, Wertheim
0,5 ml	Eppendorf, Hamburg
1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
2,0 ml	Brand, Wertheim
Sterilfilter 0,45 µm	Whatman, Dassel
Whatman 3 MM-Papier	Whatman, Dassel
Whatman-Papier DE 81	Whatman, Dassel
Zellkulturflaschen	
50 ml	Falcon, New Jersey; USA
250 ml	Falcon, New Jersey; USA
Zellschaber	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugenfiltereinheiten	
<i>Microcon YM-3 Centrifugal Filter Unit</i>	Millipore, Schwalbach
Zentrifugenröhrchen	
10 ml	Greiner, Nürtingen
15 ml	Falcon, New Jersey; USA
50 ml	Falcon, New Jersey; USA

3.2 Versuchstiere

Zur Gewinnung polyklonaler Antikörper dienten weibliche Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer (Charles River Deutschland GmbH, Kisslegg).

Weibliche BALB/c-Mäuse wurden zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern verwendet und ebenfalls von der Charles River Deutschland GmbH, Kisslegg, bezogen. Die für die Herstellung der monoklonalen Antikörper erforderlichen Myelomzellen der Zelllinie NSO P3 x Ag 8.653 (ATCC CRL 1580) wurden von der Firma Immundiagnostik, Bensheim, zur Verfügung gestellt.

Die Exemplare von *Mytilus edulis* wurden im Fischhandel erworben. Die Muscheln der Spezies *Mytilus galloprovincialis* stammten aus dem Adriatischen Meer (Rovinj, Kroatien) und wurden am Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Universität Mainz, bei 14°C in künstlichem Meerwasser gehalten.

4 METHODEN

4.1 Synthese von Domoinsäure-Konjugaten

Zum einen ist die Domoinsäure aufgrund ihrer geringen Molekülgröße nicht geeignet um in der Funktion eines Antigens im Organismus eine Immunantwort auszulösen, zum anderen kann sie nicht auf einer herkömmlichen Mikrotiterplatte oder einer Membran immobilisiert werden. Da zur Entwicklung eines immunologischen Testverfahrens beide Voraussetzungen erfüllt sein müssen, wird die DO an hochmolekulare Trägerproteine bzw. -peptide gekoppelt.

4.1.1. Synthese

4.1.1.1 Kopplung von Domoinsäure an Trägerproteine

Da es sich bei Domoinsäure um eine Tricarbonsäure handelt, besteht die Möglichkeit, das Biotoxin über seine Carboxylgruppen an Trägerproteine zu koppeln. Für diese Kopplungsreaktion wurden die Carboxylgruppen der Carbonsäure bei leicht saurem pH-Wert mit wasserlöslichem 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC), einem Derivat von Carbodiimid, aktiviert. Carbodiimid katalysiert die Bildung einer Amidbindung zwischen einer Carbonsäure und der Aminogruppe z.B. eines Proteins, wobei zunächst aus der Carboxylgruppe ein stark aktives Zwischenprodukt der Ortho-Acylisoharnstoff entsteht, welches schnell mit Nucleophilen reagiert (Tedder *et al.*, 1972). Die Zugabe von N-Hydroxysuccinimid (NHS) dient hierbei zur Stabilisierung des Zwischenproduktes (Staros *et al.*, 1986). Die Kopplungsreaktion in Anwesenheit von EDC/NHS erfolgt in neutralem pH-Bereich unter Verwendung von HEPES-Puffer oder im leicht sauren Milieu mittels MES-Puffer, da H^+ -Ionen die Reaktion des aktiven Esters mit der Aminogruppe katalysieren (s. Abb. 4).

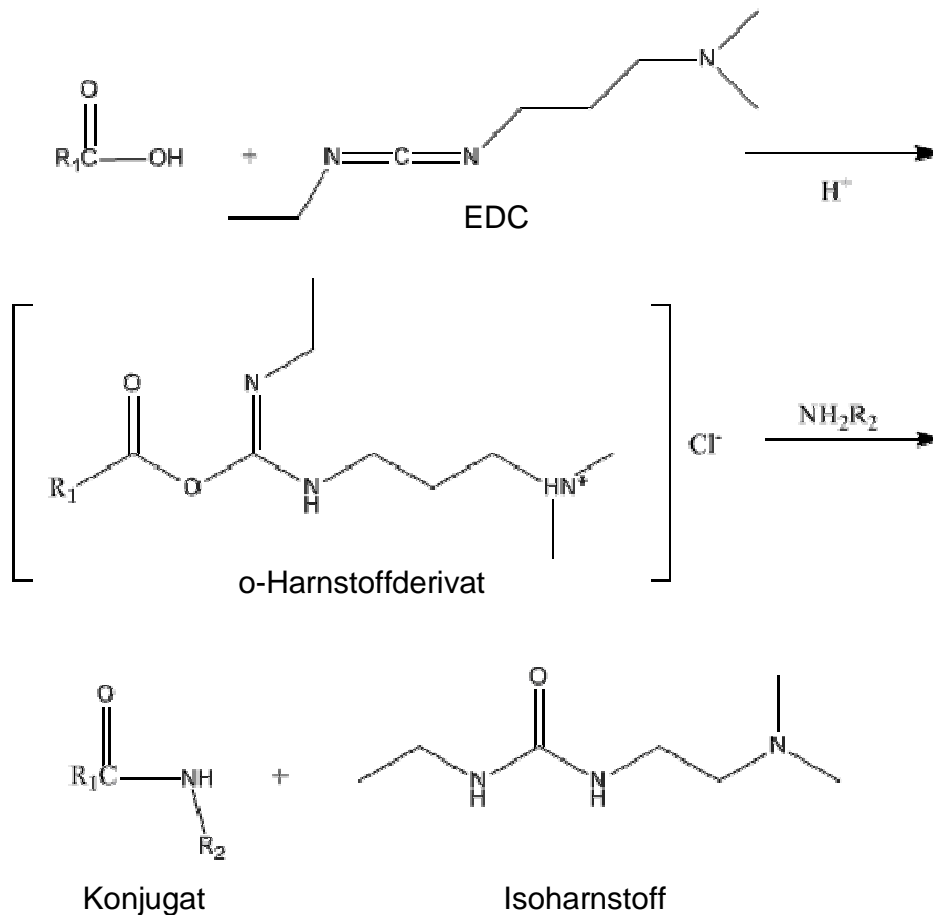


Abb. 4: Kopplungsreaktion unter Einwirkung von EDC/NHS

Die Aktivierung der Carboxylfunktionen erfolgte mit einem hundertfachen Überschuss an EDC, wobei bei der Domainsäure HEPES-Puffer, 10 mM, pH 6,0, als Lösungsmittel diente. Die gelöste DO wurde zunächst mit EDC/NHS gemischt und nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde das Trägerprotein zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz für weitere 2 h bei RT / 650 rpm inkubiert. Um Überschüssiges EDC, eventuell nicht bedundene DO und sonstige niedermolekulare Substanzen zu entfernen, wurden die Produkte mit *Zeba Desalt Spin Columns* (s. 3.1.6) entsalzt und bei 4°C gelagert.

Folgende Trägerproteine wurden für die Kopplungsreaktion eingesetzt:

- Ovalbumin (3.1.1)
- BSA (3.1.1)
- Casein (3.1.1)
- Carboanhydrase (3.1.1)
- Trypsin-Inhibitor (3.1.1)

Für die Herstellung der Antikörper wurden bei der Hapten-Konjugat-Synthese zusätzlich *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) und FID33 (3.1.1) angewendet. Das in dieser Arbeit verwendete KLH stammt aus der Napfschnecke *Megathura crenulata*. Mit einem Molekulargewicht von ca. 8×10^6 Dalton wirkt es in hohem Maße immunogen. Bei FID33 handelt es sich um ein synthetisches Peptid, das aus 33 Aminosäuren aufgebaut ist.

Ansatz Ovalbumin:

- | | |
|--------------------------------------------|-----------|
| - 20 µl DO (1 mg/ml HEPES 10 mM, pH 6,0) | 64 nmol |
| - 60 µl EDC (20 mg/ml HEPES 10 mM, pH 6,0) | 6,3 µmol |
| - 14 µl NHS (50 mg/ml HEPES 10 mM, pH 6,0) | 3,22 µmol |
| - 23 µl OVA (5 mg/ ml HEPES 10 mM, pH 6,0) | 2,6 nmol |

Verhältnis Protein/DO: 1/25

Ansatz BSA:

- | | |
|--------------------------------------------|-----------|
| - 10 µl DO (1 mg/ml HEPES 10 mM, pH 6,0) | 32 nmol |
| - 30 µl EDC (20 mg/ml HEPES 10 mM, pH 6,0) | 3,13 µmol |
| - 7 µl NHS (50 mg/ml HEPES 10 mM, pH 6,0) | 1,61 µmol |
| - 17 µl BSA (5 mg/ml HEPES 10 mM, pH 6,0) | 1,3 nmol |

Verhältnis Protein/DO: 1/25

Ansatz A Casein:

- 10 µl DO (1 mg/ml HEPES 10 mM, pH 6,0) 32 nmol
- 30 µl EDC (20 mg/ml HEPES 10 mM, pH 6,0) 3,13 µmol
- 7 µl NHS (50 mg/ml HEPES 10 mM, pH 6,0) 1,61 µmol
- 12 µl Casein (5 mg/ml HEPES 10 mM, pH 6,0) 2,6 nmol

Verhältnis Protein/DO: 1/12

Ansatz Trypsin-Inhibitor:

- 10 µl DO (10 mg/ml HEPES 10 mM, pH 6,0) 0,322 µmol
- 60 µl EDC/NHS (10 mg EDC;
5,8 mg NHS/ml HEPES 10 mM, pH 6,0) 3,12µmol/3,12µmol
- 104,2 µl HEPES 10 mM, pH 6,0
- 25,8 µl Trypsin-Inhibitor (10 mg/ ml HEPES 10 mM, pH 6,0) 13 nmol

Verhältnis Protein/DO: 1/25

Ansatz KLH:

- 100 µl DO (1 mg/ml HEPES 10 mM, pH 6,0) 0,32 µmol
- 100 µl EDC (60 mg/ml HEPES 10 mM, pH 6,0) 30 µmol
- 70 µl NHS (50 mg/ml HEPES 10 mM, pH 6,0) 16,13 µmol
- 90 µl KLH (10 mg/ml HEPES 10 mM, pH 6,0) 0,107 x 10⁻³ µmol

Verhältnis Protein/DO: 1/3000

Ansatz FID33:

- 60 µl DO (1 mg/ml DMSO) 193 nmol
- 50 µl EDC (20 mg/ml HEPES 10 mM, pH 6,0) 5,22 µmol
- 90 µl HEPES (10 mM, pH 6,0)
- 100 µl FID33 (2 mg/ml DMSO) 50 nmol

Verhältnis Peptid/DO: 1/4

4.1.1.2 Biotinylierung von Domoinsäure

Eine weitere Möglichkeit, niedermolekulare Substanzen wie Domoinsäure zu immobilisieren besteht über ihre Biotinylierung, wobei das Biotoxin zunächst kovalent an Biotin gebunden wird. Anschließend macht man sich die starke spezifische Wechselwirkung zwischen Biotin und Avidin zunutze. Avidin besitzt eine Molmasse von 66000 Da und ist ein aus Hühnereiklar isolierbares, aus vier Untereinheiten zu je 128 Aminosäuren bestehendes, basisches Glykoprotein, das vier Bindungsstellen für Biotin besitzt. Die Komplexe weisen mit $k_{\text{dis}} = 10^{-15}$ M eine der höchsten bekannten biologischen Bindekonstanten auf, so dass die Bindung nahezu irreversiblen Charakter hat (Ibelgaufits, 1993; Lottspeich und *et al.*, 1998). Avidin weist einen isoelektrischen Punkt von ca. 10,5 auf, so dass es bei neutralem pH positiv geladen ist und unspezifisch mit negativ geladenen DNA-Molekülen reagieren kann (Green, 1975). Aus diesem Grund wird NeutrAvidinTM Protein verwendet, das diese Nachteile nicht zeigt, da nach Entfernen der Kohlenhydrat-Seitenketten der isoelektrische Punkt in der Nähe des Neutralpunktes liegt. NeutrAvidinTM Protein besitzt ein Molekulargewicht von 60000 Da, ebenfalls vier Bindungsstellen für Biotin, sowie eine Bindungsaffinität von ca. 14 µg Biotin /mg Protein. Für die Biotinylierungsreaktion der Domoinsäure wurde (+)-Biotinyl-3-6,9-trioxaundecandiamin (*EZ-LinkTM Biotin-LC-PEO-Amine*, 3.1.5) verwendet. Die Länge des Moleküls beträgt 22,9 Å und verbessert die Bindungsaffinität der gegen DO gerichteten Antikörper zu dem auf der Oberfläche des Trägermoleküls präsentierten Antigen (DO) im angestrebten Testsystem. In Abb. 5 ist zu erkennen, dass das Biotinylierungsreagenz ein primäres Amin besitzt. Wie in 4.1.1.1 beschrieben, werden die Carboxylgruppen der Domoinsäure zunächst über 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) aktiviert, um eine Amidbindung mit der Aminogruppe des (+)-Biotinyl-3-6,9-trioxaundecandiamins einzugehen.

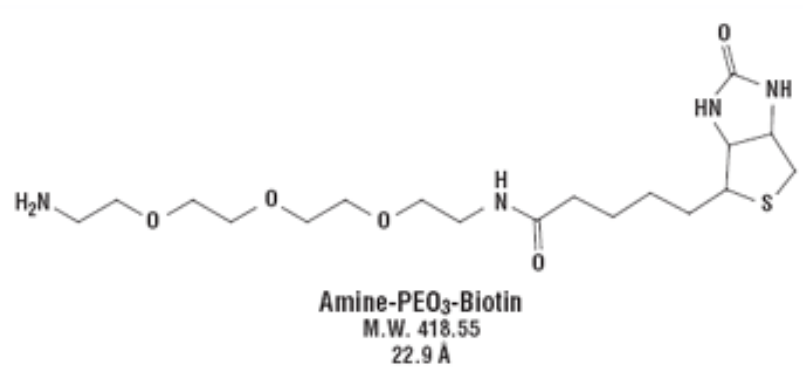


Abb. 5: Strukturformel von (+)-Biotinyl-3-6,9-trioxaundecandiamin

Quelle: Herstellerprotokoll 0750, Thermo Fisher Scientific

Ansatz:

- 130 µl DO (1 mg/ml HEPES 10 mM, pH 7,4)	0,418 µmol
- 40 µl EDC (5 mg/ml MES 0,1 M, pH 5,5)	1µ mol
- 25 µl (+)-Biotinyl-3-6,9-trioxaundecanediamin (50 mM)	1,25 µmol

Der Ansatz wurde für 2 h bei 22°C und 950 rpm inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert.

4.1.2 Charakterisierung

4.1.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine gemäß ihres Molekulargewichts aufgetrennt (Laemmli, 1970). SDS (Sodiumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz, das Proteine denaturiert, indem es stöchiometrisch an das Polypeptid-„Rückgrat“ bindet, Wasserstoffbindungen zerstört, hydrophobe Wechselwirkungen blockiert und für eine partielle Entfaltung des Proteins sorgt. Es entstehen negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit konstantem Ladung-zu-Masse-Verhältnis (1,4 g SDS/g Protein in 1% SDS-Lösungen). Durch β-Mercaptoethanol werden Schwefelbrücken zerstört, Erhitzen der Probe in Gegenwart von SDS vervollständigt die Denaturierung und Beladung der Probe mit dem Detergenz (Berkelman *et al.*, 1998) und unterbindet Protein-Protein-

Wechselwirkungen (Quartärstrukturen). Bei der SDS-Gelelektrophorese wandert der SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld zur Anode. Dabei trennt der Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Stokes-Radius und damit nach ihrem Molekulargewicht auf (Rehm, 2000). Je nach Molekulargewicht der zu untersuchenden Proben wird der Prozentanteil des Acrylamid/Bisacrylamid-Gemischs im Gel verändert. Je höher das Molekulargewicht des Proteins, desto geringer wird die Acrylamidkonzentration gewählt. Die Polymerisierungsreaktion läuft in Anwesenheit von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) ab, wobei letzteres die Bildung freier Radikale, welche die Kettenreaktion initiieren, aus APS katalysiert und so die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht. Die Auftrennung der Proteine erfolgt diskontinuierlich, da auf das Trenngel ein niederprozentiges Sammelgel (6 %) aufgegossen wird.

Zur Herstellung der Gele und für den späteren vertikalen Gellauf wurde das Mini-Protean 3 System (3.1.2) eingesetzt. Je ein Set Glasplatten wurde in der vorbereiteten Gießvorrichtung befestigt. Zunächst wurde das Trenngel hergestellt und zwischen die beiden Glasplatten gegossen. Für die hier untersuchten Proteine wurden 8%, 10%, sowie 12%ige Polyacrylamidgele verwendet (s. Tab. 2). Das gegossene Gel wurde vorsichtig mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Grenzschicht zu erreichen und einen Ausschluss von Luftsauerstoff zu garantieren. Nach ca. 30 min wurde der Alkohol mit einem Saugpapier entfernt und das Sammelgel dazugefügt. Durch Einsetzen eines Kamms wurden Geltaschen für die Proben geformt. Das auspolymerisierte Gel wurde nun senkrecht in die Gelkammer platziert und die Apparatur mit SDS-Laufpuffer beschickt bis die Geltaschen mit Puffer gefüllt waren.

	SAMMELGEL	TRENNGEL		
	6%	8%	10%	12%
Rotiphorese Gel 40 (19:1)	0,75 ml	2 ml	2,5 ml	3 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8.8	-	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
1,0 M Tris/HCl pH 6.8	1,25 ml	-	-	-
Glycerin	-	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
SDS 10% (w/v)	0,05 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Aq. bidest.	2,895 ml	5,1 ml	4,6 ml	4,1 ml
TEMED	0,005 ml	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml
APS 10% (w/v)	0,05 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml

Tab. 2: Pipettierschema für die zur Proteintrennung eingesetzten Polyacrylamidgele

Vor dem Auftragen der Proteinproben wurden diese mit reduzierendem Probenpuffer (Protein-Gelladepuffer 3.1.1) im Verhältnis 4:1 gemischt und im Heizblock bei 95°C denaturiert und anschließend in die Geltaschen einpipettiert. Der verwendete *pre-stained* Proteinmarker (3.1.1) konnte direkt aufgetragen werden. Danach wurden die Laufkammern auf das vorgeschriebene Volumen mit SDS-Laufpuffer ergänzt und eine Spannung von 120–140 Volt angelegt.

SDS-Laufpuffer:

- 25 mM Tris
- 192 mM Glycin
- 0,1% SDS (w/v)

4.1.2.2 Färbung der SDS-Polyacrylamidgele mit Coomassie

Die Detektion der Proteine in Polyacrylamidgelen erfolgte mit Coomassie. Im „GelCode® Blue Stain reagent“ ist der Farbstoff Coomassie G-250 kolloidal gelöst, wodurch er in die Gelmatrix eindringt und spezifisch die darin enthaltenen Proteine färbt. Durch anschließendes Waschen mit H₂O wird nicht proteingebundenes Reagenz entfernt und die Gelmatrix erscheint farblos. Nach der Elektrophorese (4.1.2.1) wurde das in den Gelen befindliche SDS durch 10 minütiges Waschen in H₂O entfernt und mit dem GelCode®-Reagenz 2 h bei RT

inkubiert. Im Anschluss wurde so lange gewaschen, bis die blauen Proteinbanden deutlich auf der farblosen Gelmatrix zu erkennen waren.

4.1.2.3 Western Blot

Beim Western Blot-Verfahren werden gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine (s. 4.1.2.1) quantitativ aus dem Gel auf die Oberfläche einer immobilisierenden Membran transferiert. Auf diese Weise werden die Proteine, deren Trennmuster erhalten bleibt, für den Nachweis mit immunologischen Methoden zugänglich (Towbin *et al.*, 1979).

Der Transfer wurde nach dem *Semi-Dry Blotting* Verfahren im "Sandwich-Aufbau" durchgeführt (Westermeier *et al.*, 1989). Dazu wurde eine dem Gel in der Größe entsprechende PVDF- oder Nitrocellulose-Membran (nach einer kurzen Inkubation der PVDF-Membran in Methanol) in Transferpuffer äquilibriert. Die Membran wurde auf acht Lagen Filterpapier (mit Transferpuffer getränkt und ebenfalls von gleicher Größe) platziert, welche sich bereits auf der Anode befanden. Anschließend wurden das Gel und acht weitere Lagen Filterpapier auf die Membran gelegt. Der Transfer der negativ geladenen Proteine wurde nach dem Aufsetzen der Kathode bei 1 mA/cm² für 72 min (6 min pro % Acrylamid) von Kathode zu Anode durchgeführt.

Zur Überprüfung des Transfers diente der *pre-stained* Proteinmarker (3.1.1). Die Membran wurde ü. N. bei 4°C in einer Blockierungslösung inkubiert, um freie Bindungsstellen abzusättigen. Die Proteindetektion erfolgte auf indirektem Weg durch enzymgekoppelte Sekundärantikörper, die der Erkennung proteinspezifischer Primärantikörper dienten. Dazu wurde am nächsten Tag die Membran dreimal je 5 min mit TBST gewaschen und danach 1 h mit entsprechend verdünntem Primärantikörper unter Schütteln inkubiert. Zur Detektion unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers an die aufgetrennten Proteine verblieb ein Streifen der Membran ohne Behandlung mit dem primären Antikörper im Verdünnungspuffer. Nach einem weiteren Waschschrift (3x 5 min mit TBST) wurde dieser Streifen mit der restlichen Membran einer einstündigen Inkubation mit dem ebenfalls entsprechend

verdünnten Sekundärantikörper unterzogen. Dieser war mit einer Peroxidase gekoppelt, so dass im Anschluss an einen letzten Waschschrift (3x 5 min TBST) die Membran mit dem enzyspezifischen Substrat Tetramethylbenzidin (TMB, 50 µl/cm²) inkubiert und die Proteinbanden anhand einer Violettfärbung detektiert werden konnten.

In einigen Fällen wurden Peroxidase-markierte Antikörper als Primärantikörper eingesetzt, wobei die Inkubation mit Sekundärantikörper entfiel.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen:

Transferpuffer:

- 25 mM Tris
 - 192 mM Glycin
 - 20% Methanol (v/v)
- pH 8,3

Blockierungslösung:

- 3% BSA in TBS (w/v)

TBS:

- 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
- 150 mM NaCl

TBST:

- 0,05% Tween 20 in TBS (v/v)

Antikörper-Verdünnungspuffer:

- 0,3% BSA/TBS (w/v)

4.1.2.4 Dot Blot

Das Dot Blot-Verfahrens folgt im Prinzip jenem des Western Blots, jedoch werden hierbei die zu detektierenden Proteine direkt auf die Membran aufgebracht. Der Verzicht der Gelelektrophorese und des elektrischen Transfers aus dem Gel auf die Membran bietet sich an, wenn kein Proteingemisch, sondern nur eine Art von Protein immunologisch untersucht wird.

Eine Nitrocellulosemembran wurde in Transferpuffer äquilibriert und auf einem in Transferpuffer getränkten Filterpapier platziert. Die Proteinlösungen wurden, wenn nötig in mehreren Schritten (max. je 2 µl), auf die Membran getropft und diese anschließend 30 min bei RT auf dem Filterpapier in Quadripermschalen[®] bei geschlossenem Deckel inkubiert. Nach Entfernung der Filterpapiere folgte eine Inkubation der Membran in Blockierungslösung für 1 h bei RT. Im Anschluss wurde die Membran analog zum Western Blot (s. 4.1.2.3) behandelt.

4.1.2.5 UV-Spektroskopie

Viele organische Moleküle können sichtbares Licht absorbieren. Diese Moleküle erscheinen dann farbig, da die Strahlung des sichtbaren Lichts dem Auge nur dann weiß erscheint, wenn sie alle möglichen Wellenlängen aus diesem Bereich des Spektrums (ca. 400 nm-800 nm Wellenlänge) enthält. In den Molekülen können durch Energie des sichtbaren Lichts Elektronen in energiereichere Molekülorbitale angehoben werden. Für eine solche Anregung ist meist eine größere Energie als die des sichtbaren Lichts notwendig (Dominik *et al.*, 1996). Die Wellenlängen liegen dann im Bereich des sog. ultravioletten Lichts (ca. 100 nm-400 nm Wellenlänge). In der Analytik spielen UV/VIS-spektroskopische Bestimmungen eine wichtige Rolle (VIS-Spektroskopie abgeleitet von dem englischen Wort *visible* klingt für mich besser). Die meisten Substanzen zeigen Absorptionen im UV/VIS-Bereich und können deshalb durch ihr Spektrum charakterisiert werden. Bei der Konjugation von Molekülen, die chromophore (griech. *farbtragende*) Gruppen besitzen, überlagern sich die einzelnen Absorptionen.

Domoinsäure besitzt ein Absorptionsmaximum bei 242 nm, während das der meisten Proteine basierend auf der Absorption der aromatischen Aminosäurereste bei einer Wellenlänge von 280 nm liegt. Zum Zweck der analytischen Auswertung der synthetisierten Konjugate sollten diese spektrophotometrisch untersucht werden. Zunächst wurden jeweils die Spektren der Einzelsubstanzen (Trägerproteine bzw. Domoinsäure) im Wellenlängenbereich von 200 nm- 300 nm aufgenommen und anschließend mit den Absorptionen der Konjugate im identischen Wellenlängenbereich verglichen.

4.2 Herstellung polyklonaler Antikörper

Polyklonale Antikörper lassen sich durch mehrfache Immunisierung von z. B. Kaninchen erzeugen (Ausubel *et al.*, 1994).

4.2.1 Immunisierung und Serumzubereitung

Zur Immunisierung weiblicher Kaninchen (Weiße Neuseeländer) wurden Biotoxin-Konjugate (s. 4.1.1.2) als Antigen eingesetzt. Nach Abnahme von Blut aus der Ohrvene - zur Herstellung des Präimmunserums - erfolgte die Immunisierung insgesamt dreimal in einem Abstand von je vier Wochen. Die gleichzeitige Verabreichung des Antigens mit Freund's Adjuvans garantierte dabei einen besonders hohen Antikörpertiter, da letzteres sich für eine verlangsamte Freisetzung des Antigens und für eine verstärkte Immunantwort verantwortlich zeigt (Johnston *et al.*, 1991).

Vor der ersten Immunisierung wurden 0,5 ml Antigenlösung (20 ng/µl Biotoxin-Konjugat) mit 0,15 ml Freund's Adjuvans *complete* und 0,35 ml Freund's Adjuvans *incomplete* emulgiert und anschließend an 8 Stellen subkutan injiziert. Jeweils 10 – 12 Tage nach der zweiten bzw. dritten Immunisierung wurde dem Versuchstier zur Überprüfung des Antikörpertiters Blut aus der Ohrvene entnommen (s. 4.2.2). Bei Vorlage eines ausreichenden Titers wurden dem Kaninchen 15 ml Blut abgenommen. Dieses Blut, wie auch das vor der Immunisierung entnommene, wurde zur Serumzubereitung 1 h bei 37°C in kaolinbeschichteten Gefäßen (Kaolin ist ein Kaliumsilikat, welches die

Blutgerinnung fördert) inkubiert. Im Anschluß an eine weitere einstündige Inkubation auf Eis wurde es dann 10 min bei 1450 x g zentrifugiert. Nachfolgend ließ sich das Serum von geronnenen Blutbestandteilen trennen und wurde bei -20°C gelagert.

4.2.2 Titerbestimmung des Immuserums mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Mithilfe des sogenannten ELISA lassen sich spezifische Antikörper oder - je nach Aufbau- auch das Vorhandensein bestimmter Antigene nachweisen

Zur Überprüfung der Immunisierungseffizienz (4.2.1) werden ELISA-Platten mit dem entsprechenden Antigen beschichtet und mit Antiserum - bzw. Präimmuserum als Negativkontrolle - inkubiert. Im Anschluß daran wird gebundener Primärantikörper durch einen weiteren Antikörper detektiert und die gebildeten Komplexe durch eine Farbstoffreaktion des an den Sekundärantikörper gekoppelten Enzyms sichtbar gemacht.

Zum Zweck der Beschichtung von ELISA-Platten wurden je 100 µl Antigenlösung (0,2 µg/ml bzw. 0,02 µg entsprechend 64 pmol DO pro *well*; es wurde OVA-DO in PBS als Antigen verwendet) in die *wells* einer Mikrotiterplatte pipettiert. Nach dreistündiger Inkubation bei RT im Dunkeln wurden nichtgebundene Komponenten durch dreimaliges Waschen mit PBST entfernt. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die *wells* jeweils mit 150 µl 3% BSA (w/v) in PBS für 3 h bei RT inkubiert. Im Anschluss an drei Waschschriffe mit jeweils 150µl PBST wurden für die folgende Antikörperreaktion verschiedene Verdünnungen des Präimmun- und Antiserums in 0,3% BSA/PBS eingesetzt (1:100; 1:200; 1:400 bis 1:12800). Dazu wurden pro *well* 100 µl der jeweiligen Verdünnung für 1 h bei RT inkubiert. Nach drei weiteren Waschschriffen mit jeweils 150 µl PBST wurden in jedes *well* 100 µl des mit Meerrettichperoxidase konjugierten anti-*rabbit*-Sekundärantikörpers gegeben (1:5000 in 0,3% BSA/PBS).

Im Anschluß an eine 60minütige Inkubation bei RT und drei folgenden Waschschriffen mit jeweils 150 µl PBST wurden 100 µl einer gebrauchsfertigen

Substratlösung, Tetramethylbenzidin (TMB), in jedes *well* pipettiert. Die enzymatisch katalysierte Farbreaktion wurde nach Erreichen ausreichender Farbintensität (3-10 min) durch Zugabe von 10 µl 1M H₂SO₄ abgestoppt und bei 450 nm mit Hilfe eines Multiscan-Gerätes ausgewertet.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen:

PBS-Puffer:

- 137 mM NaCl
 - 2,7 mM KCl
 - 9,6 mM Na₂HPO₄
 - 1,8 mM KH₂PO₄
- pH 7,2

PBST:

- 0,05% Tween 20 in PBS (v/v)

4.2.3 Schachbrett-Titration

Zur Bestimmung der optimalen Antigenmenge zur Beschichtung von 96-Loch-Mikrotiterplatten sowie zur Ermittlung der geeigneten Verdünnungen von Antiserum (Präimmunserum dient als Negativkontrolle) und Antigen, wurden die Komponenten durch Schachbrett-Verdünnung gegeneinander titriert (Crowther, 2001). Mittels dieser Methode können maximal 2 Komponenten gegeneinander austitriert werden. Dabei werden die Reagenzien in verschiedenen Richtungen und bei Bedarf über die gesamte Mikrotiterplatte in beliebigen Verdünnungsschritten überprüft. In einem ersten Schritt wird das Antigen in der Richtung A bis H in zunehmender Verdünnung aufgezogen. Anschließend erfolgen mehrere Waschschrte, sowie die Inkubation mit Blockierungslösung, um unspezifische Bindungen, die das Ergebnis verfälschen, zu unterbinden. Danach werden in die Vertiefungen die Verdünnungen der 2. Komponente (Antikörper) in Richtung aufsteigender Zahlen pipettiert. Durch Ausnutzung mehrerer Verdünnungsschritte sowie der Doppelbestimmung ergeben sich

ausreichend Kombinationsmöglichkeiten von Antigen- und Antikörperverdünnung, um die geeigneten Konzentrationen beider Parameter zu finden.

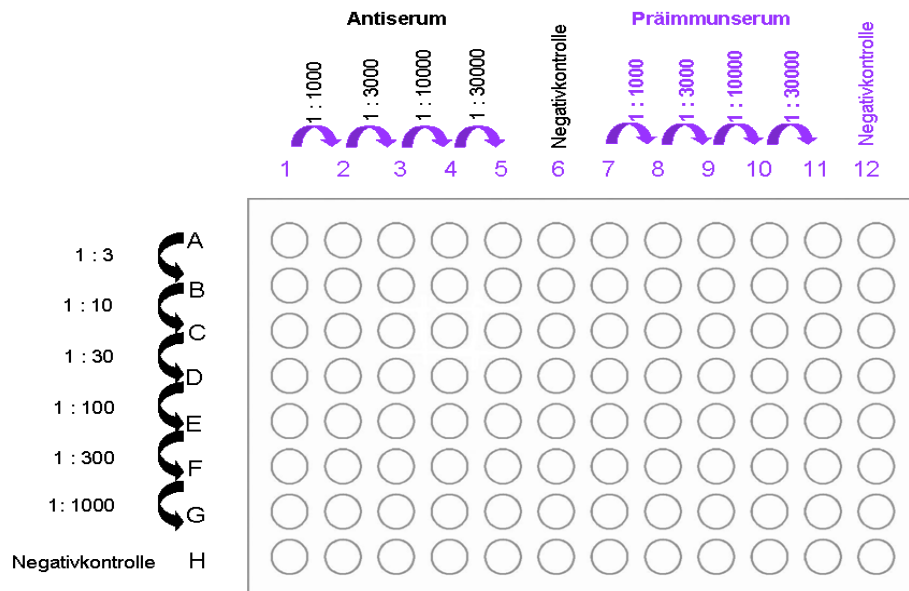


Abb. 6: Schema einer Schachbrett Titration

Durch diese spezielle Art der Verdünnung kann diejenige Kombination der gegeneinander titrierten Reagenzien bestimmt werden, bei der die höchste Extinktion bei gleichzeitig geringer Hintergrundfärbung gemessen wird.

Das Antigen wurde wie in Abb. 6 dargestellt in der Reihe A- G in den angegebenen Verdünnungsschritten in die Vertiefungen der 96-Loch-Mikrotiterplatten aufgezogen (4.2.2.1.2). Reihe H enthält nur den Verdünnungspuffer (HEPES 10 mM, pH 7,0) und entspricht der Negativkontrolle. Aus einer Stammlösung des nach der Immunisierung der Kaninchen gewonnenen Antiserums (Positivserum) wurde mit 0,3% BSA/PBS zunächst eine 1:300, sowie ein 1:1000 Verdünnung und aus diesen die entsprechenden 1:3000, 1:10000 bzw. 1:30000 Verdünnungslösungen hergestellt. Mit dem vor der Immunisierung der Kaninchen erhaltenen Präimmunserum (Negativserum) wurde in derselben Weise verfahren wie mit dem Antiserum. Die Verdünnungen wurden

anschließend in einem Volumen von jeweils 100 µl in die Vertiefungen pipettiert, entsprechend dem Schema in Abb. 9, das Antiserum in die Spalten 1–5, das Präimmunserum in die Spalten 7–11, wobei die Spalten 6 und 12 nur mit dem verwendeten Verdünnungspuffer (0,3% BSA/PBS) als Negativkontrollen befüllt wurden. Nach 2 h Inkubation der Mikrotiterplatten bei RT auf einem Laborschüttler wurden die Seren durch Ausschütten und Ausklopfen der mit der Oberseite nach unten gekehrten Platte auf ein sauberes Tuch entfernt. Daran anschließend erfolgten 3 Waschschrte mit jeweils 150µl PBST-Puffer für 5 min, wobei nach dem letzten Waschschritt der restliche Waschpuffer durch Ausschütten und Ausklopfen der Mikrotiterplatten auf ein sauberes Tuch entfernt wurde. Zur Visualisierung der Qualität der Wechselwirkung zwischen Antigen und Serum wurde mit Meerrettichperoxidase markierter anti-*Rabbit*-Sekundärantikörper (1:10000 in 0,3% BSA/PBS) in die Vertiefung gegeben und für weitere 2 h auf einem Laborschüttler bei RT inkubiert. Nachdem Entfernen der Sekundärantikörperverdünnung wurde der abschließende Waschschritt mit jeweils 150 µl PBST-Puffer 2 x wiederholt und danach die restliche Flüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf ein sauberes Tuch quantitativ beseitigt. Durch Zugabe von jeweils 100 µl Substratlösung Tetramethylbenzidin (TMB) konnte die Farbreaktion gestartet und nach Erreichen ausreichender Intensität durch Zugabe der 1 M H₂SO₄ im Volumen von 10 µl pro Vertiefung diese gestoppt werden. Quantitative Auswertung des Versuchs erfolgte mittels Multiscan-Gerät bei 450 nm.

4.2.4 Aufreinigung polyklonaler Antikörper

Die Affinitätschromatographie ist eine leistungsfähige und generell anwendbare Methode zur Proteinreinigung, die die hohe Affinität vieler Proteine zu bestimmten chemischen Gruppen ausnutzt. Immobilisiertes Protein A wird speziell zur Aufreinigung von Antikörpern verwendet. Protein A ist ein Zellwandprotein des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, welches spezifisch die Fc-Region von Immunglobulinen vieler Säugetierspezies bindet (Stryer 1995).

Kaninchen-IgGs, wie sie in dieser Arbeit zum Einsatz kamen, haben eine besonders hohe Affinität zu Protein A.

Die Protein A-Affinitätschromatographie ist eine einfache und schnelle Aufreinigungsmethode (Binden-Waschen-Eluieren-Neutralisieren), mit der die meisten Non-IgG-Kontaminanten entfernt und sehr gute Reinheiten erzielt werden können. Zu beachten ist hierbei, dass die Wechselwirkung von immobilisiertem Protein A und IgGs stark pH-abhängig ist. Die Bindungskapazität für Protein A ist optimal bei 8,0-9,0 zur Elution der IgGs hingegen wird ein pH von 2,5-5,0 benötigt. Dabei sollte man beachten, dass Antikörper säure-labil sind und ihre Aktivität bei sehr niedrigen pH-Werten verlieren. Es ist also von enormer Bedeutung, den pH-wert nach der Elution wieder zu neutralisieren (Nunc, ProPurTM Protein A Antibody Purification Handbook).

Bestandteile des in dieser Arbeit verwendeten Protein A Agarose Kits (3.1.5):

- Protein A Agarose in 20% Ethanol/PBS

- Wasch-/Bindepuffer
 - 0,10 M Natriumphosphat
 - 0,15 M Natriumchlorid
 - pH 7,4

- Elutionspuffer
 - 0,2 M Glycin
 - pH 3,0

- Lagerungspuffer für gebrauchte Protein A-Agarose
 - 0,01 M Natriumdihydrogenphosphat
 - 0,15 M Natriumchlorid
 - 2,7 mM Kaliumchlorid
 - 20% Ethanol
 - pH 7,4

Laut Herstellervorschrift werden 2 ml Protein A-Agarose-Säulenbettvolumen pro ml Immuns serum verwendet. Die erforderliche Menge an Protein A-Agarose-Matrix wird in der Säule mit 10 Säulenvolumen Wasch-/Bindepuffer äquilibriert; das aufzureinigende Serum wird 1:1 mit Wasch-/Bindepuffer verdünnt auf diese Matrix gegeben. Hierbei binden IgGs an Protein A, während andere Serumproteine durch das Agarosegel wandern und durch Zugabe von 10 Säulenvolumen Wasch-/Bindepuffer entfernt werden. Die IgGs werden mithilfe von vier Säulenvolumen Elutionspuffer in 0,5 ml-Fractionen eluiert. Zur sofortigen Neutralisierung des pH-Wertes werden die Eluate in Gefäßen aufgefangen, in denen sich jeweils 120 µl Bindepuffer (5x konzentriert) befindet. Die Protein A-Agarose wird laut Vorschrift mit Wasch-/Bindepuffer, 70% Ethanol und 6M Guanidin Hydrochlorid gewaschen bzw. regeneriert und in Lagerungspuffer bei 4°C aufbewahrt. Sie kann zur Aufreinigung des gleichen Antikörpers wiederverwendet werden.

1:10-Verdünnungen der Eluate sowie der Waschfraktionen werden bei 280 nm im Spektrophotometer vermessen, um den Proteingehalt zu ermitteln.

Hierbei gilt:

$$c(\text{mg/ml}) = \text{OD}_{280} \times 0,69 \times 10$$

(Nanoprobes, Produktinformation zu Katalog-Nr. 2020S)

4.2.5 Charakterisierung aufgereinigter polyklonaler Antikörper mittels ELISA

Eluate, die laut OD_{280} -Messung (4.2.4) einen Proteingehalt ≥ 1 mg/ml (je nach Gesamtproteingehalt aller Fraktionen auch weniger) aufwiesen, wurden im ELISA (4.2.2) auf ihre Qualität bezüglich spezifischer IgGs untersucht. Je nach Titer des zugrunde liegenden Immunsersums wurden hierfür Eluatverdünnungen von beispielsweise 1:10, 1:100 und 1:1000 eingesetzt sowie das nicht aufgereinigte Serum als Positivkontrolle verwendet.

4.3 Herstellung monoklonaler Antikörper

Zur Produktion monoklonaler Antikörper werden die nur über einen kurzen Zeitraum hinweg lebensfähigen antikörperproduzierenden B-Lymphoblasten aus der Milz einer immunisierten Maus durch Fusion mit Zellen der Myelomzelllinie NSO P3 x Ag 8.653 (ATCC CRL 1580) immortalisiert. Die Myelomzellen besitzen gute Fusionseigenschaften und induzieren eine hohe Syntheserate an monoklonalen Antikörpern. Voraussetzung ist, dass sie selber keine Antikörper produzieren. Sie besitzen einen Enzymdefekt im Reservestoffwechsel bei der Synthese von Nukleinsäuren, der die Selektion erfolgreich fusionierter Hybridomzellen ermöglicht. Der Hauptstoffwechsel wird durch Zusatz von Aminopterin zum Kulturmedium blockiert und die Hybridomzellen können das dem Wachstumsmedium zugesetzte Hypoxanthin und Thymidin mit Hilfe der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) verwenden, da sie durch die Milzzellen die Fähigkeit erlangt haben, diesen Nebenstoffwechselweg zu nutzen. Nicht fusionierte Milzzellen besitzen nur eine geringe Lebensdauer.

4.3.1 Immunisierung

Durch die Applikation immunogenen Materials wird die Entwicklung von Antikörpern bzw. antikörperproduzierender Zellen induziert. Es entwickeln sich bei der Primärantwort zunächst Antikörper der Klasse IgM, durch weitere Immunisierungen erfolgt der Klassenwechsel zur IgG-Produktion, die es dem Organismus ermöglicht, schneller auf das Antigen zu reagieren. Das komplette Freund's Adjuvans ist eine Wasser-in-Öl-Emulsion, die hitzeinaktivierte Mykobakterien (*Mycobacterium tuberculosis*) enthält und somit zu einer Verstärkung der Immunantwort gegen das applizierte Material führt. Dem inkompletten Freund's Adjuvans fehlen diese Bakterien.

Physiologische Kochsalzlösung: 0,9% NaCl in *Aqua dest.*

Immunisierungslösung:	50 µl FID33-DO (4.1.1.1)
	200 µl PBS
	100 µl Freund's Adjuvans <i>complete</i>
	200 µl Freund's Adjuvans <i>incomplete</i>

Weibliche, neun Wochen alte Balb/C-Mäuse wurden zwei- bis dreimal im Abstand von jeweils vier Wochen mit dieser Immunisierungslösung (entsprechend 10 µg Domoinsäure) intraperitoneal gespritzt. Für die darauf folgende letzte Immunisierung wurde das Freund's Adjuvans durch physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl in *Aqua dest.*) ersetzt. Insgesamt wurde mindestens dreimal immunisiert, wobei die letzte Immunisierung drei bis vier Tage vor der Fusion erfolgte.

4.3.2 Zellfusion

Die Milz einer immunisierten Maus enthält ca. 10^8 B-Lymphoblasten. Da man die Milzzellen mit den Myelomzellen in einem Verhältnis von 1:2 mischen möchte, werden 200 ml Myelom-Zellsuspension (mit einer Zelldichte von 10^6 Zellen/ml) eingesetzt.

Die Myelomzellen wurden zwei Wochen vor der geplanten Fusion in Kultur genommen und expandiert. Am Tag der Fusion wurden sie für 10 min bei 400 x g abzentrifugiert, zweimal in 30 ml serumfreiem Medium (*Hybridomed DIF 1000*) gewaschen (d.h. resuspendiert und wieder zentrifugiert) und mit Hilfe eines Coulter Counters ausgezählt.

Der immunisierten Maus wurde die Milz steril entnommen, in ein steriles Gazenet (60 µm Porengröße) gelegt und in eine Petrischale mit serumfreiem Medium gegeben. Die Milz wurde mit einer Kanüle mehrfach angestochen. Durch Ausdrücken des in der Gaze befindlichen Gewebes mit Hilfe einer sterilen Pinzette wurden die Zellen durch das Netz passiert. Anschließend wurden sie zweimal in 30 ml serumfreiem Medium gewaschen (bei 400 x g zentrifugiert und resuspendiert) und die B-Lymphoblasten in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

Um theoretisch zu gewährleisten, dass jeder B-Lymphoblast mit einer Myelomzelle fusionieren kann, sollten die Myelomzellen in leichtem bzw. doppeltem Überschuss vorliegen; d.h. 10^8 Milzzellen wurden mit 2×10^8 Myelomzellen in einem 50ml-Gefäß gemischt. Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 400 x g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Zum Anlösen der Zellmembranen, welches Voraussetzung für eine Zellfusion darstellt, wurde 1 ml auf 37°C vorgewärmtes Polyethylenglykol (PEG) tropfenweise innerhalb einer Minute zugegeben und die Zellen in der Pipette resuspendiert. Über einen Zeitraum von 5 min wurden 3 ml serumfreies Medium tropfenweise zugegeben, um das PEG langsam auszuverdünnen, wobei die Suspension nach jedem Tropfen geschüttelt wurde. Weitere 7 ml serumfreies Medium wurden langsam unter Schütteln dazugegeben. Das Ausverdünnen des PEGs sollte innerhalb von 10–15 min erfolgt sein. Direkt im Anschluss wurden die fusionierten Zellen für 10 min bei 400 x g zentrifugiert und vorsichtig in 290 ml HAT-Medium (s.u.) resuspendiert. Der Ansatz wurde in acht 24-well Platten mit 1,5 ml pro well ausplattiert.

HAT-Medium: - *Hybridomed DIF 1000 serumfreies Medium*

- 10% FCS (fötales Kälberserum)
- Gentamycin 50 µg/ml
- *HAT Media Supplement (50 x) Hybri-MaxTM 1 x*

4.3.3 Anzucht der Hybridomzellen

HT-Medium: - *Hybridomed DIF 1000 serumfreies Medium*

- 10% FCS (fötales Kälberserum)
- Gentamycin 50 µg/ml
- *HT Media Supplement (50 x) Hybri-MaxTM 1 x*

Die ersten beiden Wochen nach der Fusion wurden die wachsenden Klone markiert und jeweils mit HAT-Medium angereichert. Ab der dritten Woche wurde auf HT-Medium gewechselt. Sobald ein Loch zu zwei Dritteln bewachsen war,

wurden die darin befindlichen Klone auf seine Antikörperproduktion mittels ELISA (4.2.2) getestet. Die positiven Klone wurden von der 24-*well* Platte zu den Zellkulturflaschen expandiert.

4.3.4 Subklonierung

Da nach einer Fusion mehr als ein Klon pro Loch gewachsen sein konnte, musste nach dem Expandieren der positiv getesteten Zellen die Kultur subkloniert werden. Dabei wurden die Zellen so ausgezählt und in eine 96-*well* Platte ausplattiert, dass sich nur eine Zelle pro Loch befand, aus der sich dann ein Klon bilden konnte, der nur einen bestimmten Antikörper synthetisierte (Einzelzellaussaat, Limiting-Dilution-Klonierung, Methode nach Coller und Coller, 1983).

4.3.5 Subklassentypisierung monoklonaler Antikörper

Die Subklassentypisierung der monoklonalen Antikörper wurde mit dem ELISA (4.2.2) durchgeführt. Die Platte wurde mit den subklassenspezifischen Antikörpern anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3, anti-IgM und anti-IgA (je 1:1000 in PBS; 50 µl/Loch) beschichtet und nach einem Blockierungsschritt wurden die zu testenden AK-Lösungen aufgetragen. Die Detektion erfolgte mithilfe eines markierten Sekundärantikörpers.

4.3.6 Aufreinigung und Konzentrierung monoklonaler Antikörper

Zur Aufreinigung von monoklonalen Maus-Immunglobulinen eignet sich eine Affinitätschromatographie über thiophile Adsorption (*Pierce[®] Thiophilic Adsorption Kit, T-Gel*, 3.1.5). Hierfür liegt eine Agarosegelmatrix zugrunde, an deren Agarosekügelchen ein Ligand immobilisiert ist, der sowohl eine Sulfon- als auch eine Thioethergruppe besitzt (Abb. 7). Aufgrund dieser Gruppen hat der Ligand eine hohe Bindekapazität für sämtliche Immunglobuline verschiedener Spezies (Thermo Fisher Scientific, 2008). Das System ist daher für die Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Kulturüberständen geeignet, in denen

im Allgemeinen nur eine Immunglobulinklasse vorliegt, nicht aber für die Aufreinigung von Immunsereen, in denen alle Klassen vertreten sind.

Begünstigt wird die Adsorption der Antikörper an den lyotropen, thiophilen Liganden der Agarosekügelchen durch die Anwesenheit des nicht chaotropen Salzes Kaliumsulfat im Bindepuffer. Der Elutionspuffer hingegen enthält kein Kaliumsulfat, was eine Desorption der Antikörper zur Folge hat. Die Antikörper lassen sich folglich ohne pH-Wert Änderung und dementsprechend schonend eluieren, wodurch ihre Aktivität weitgehend erhalten bleibt.

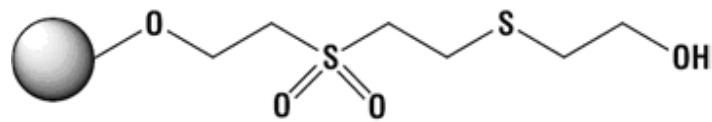


Abb. 7: An Agarosekügelchen immobilisierter Ligand für die thiophile Adsorption von Immunglobulinen

Quelle: Herstellerprotokoll 0409, Thermo Fisher Scientific

Verwendete Puffer:

- Bindepuffer

- 0,5 M Kaliumsulfat
 - 50 mM Natriumphosphat
- pH 8,0

- Elutionspuffer

- 50 mM Natriumphosphat
- pH 8,0

- Lagerungspuffer für gebrauchte Säulen

- 1 M Tris
 - 0,05% Natriumazid
- pH 7,4

Mit 2 ml Agarosebettvolumen werden 15-50 ml Kulturüberstand aufgereinigt. Zunächst werden diesem unter Rühren nach und nach 87 mg Kaliumsulfat pro ml zugefügt, um eine Konzentration von 0,5 M zu erhalten. Der Kulturüberstand wird daraufhin bei 10000 x g und 4°C für 20 min zentrifugiert; der daraus resultierende Überstand wird auf die zuvor mit vier Säulenvolumen Bindepuffer äquilibrierte Agarosematrix in der Säule gegeben. Immunglobuline werden adsorbiert, andere Proteine und Verunreinigungen durch Waschen mit 10 Säulenvolumen Bindepuffer entfernt. Durch Zugabe von fünf Säulenvolumen Elutionspuffer werden die Antikörper in 0,5 ml-Fraktionen eluiert und stehen zur weiteren Verwendung bereit. Das Agarosegel wird laut Herstellerprotokoll mit 8 M Guanidin Hydrochlorid und *Aqua dest.* regeneriert bzw. gewaschen und in Lagerungspuffer bei 4°C aufbewahrt. Es kann zur Aufreinigung des gleichen Antikörpers wiederverwendet werden.

Analog zu den aufgereinigten polyklonalen Antikörpern wird der Proteingehalt der verschiedenen Fraktionen über die OD₂₈₀ ermittelt:

$$\text{mg IgG/ml} = \text{OD}_{280} \times 0,69$$

(Harlow *et al.*, 1988)

4.3.7 Charakterisierung aufgereinigter monoklonaler Antikörper mittels ELISA

Analog zu polyklonalen Antikörpern werden auch monoklonale Antikörper nach der Aufreinigung auf Qualität bzw. erhaltengebliebene Funktionalität im ELISA untersucht (4.2.5). Als Positivkontrolle dient hierbei der nicht aufgereinigte Kulturüberstand, als Negativkontrolle das Nährmedium der Hybridomzellen.

4.4 Assay zur Detektion von Domoinsäure

4.4.1 Assay zur Detektion von Domoinsäure mit OVA-DO

4.4.1.1 Kompetitions-ELISA mit OVA-DO

Zur Überprüfung der für den zu entwickelnden Assay erforderlichen Grundlagen wurde zunächst ein Kompetitions-ELISA durchgeführt, bei dem die Mikrotiterplatte mit einer definierten Menge eines Ovalbumin-Domoinsäure-Konjugat (OVA-DO) beschichtet wurde (s. Abb. 8). Nach einem Blockierungsschritt wurden die *wells* mit dem anti-DO-AK und variierenden Mengen an OVA-DO (stellvertretend für auf proteingebundene DO zu untersuchende Proben) inkubiert. Die Detektion erfolgte über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper.

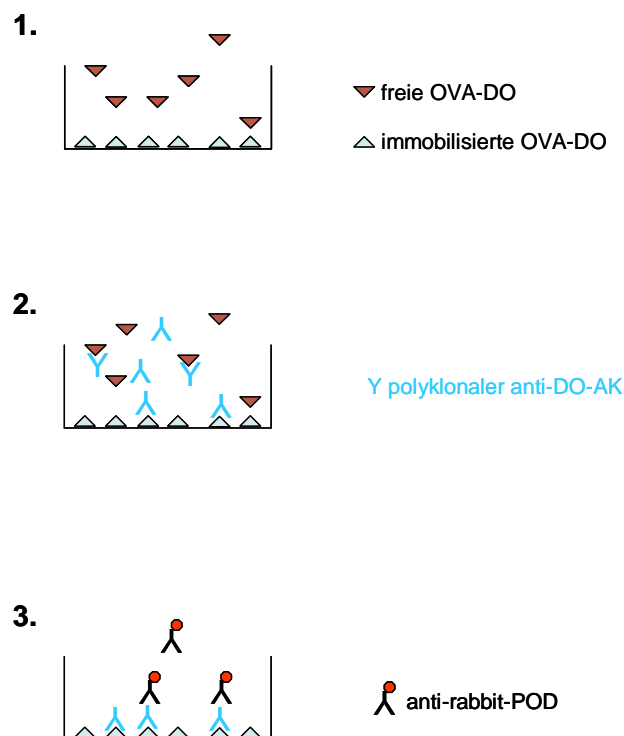


Abb. 8: Schema eines Kompetitions-ELISAs mit OVA-DO

Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen: Pro *well* wurden 87 pmol DO in Form von OVA-DO immobilisiert. Die Inkubation erfolgte in PBS bei RT für 3 h, anschließend wurden die *wells* 3x 5 min mit PBST gewaschen. Freie

Bindungsstellen wurden ü.N. bei 4°C mit 3% BSA/PBS blockiert. Nach erneutem Waschen wurden im nächsten Schritt der anti-DO-AK in den Verdünnungen 1:1000, 1:5000 und 1:10 000 zusammen mit variierenden Mengen an OVA-DO (0-250 pmol/well) in 0,3% BSA/PBS für 1h bei RT inkubiert. Nicht gebundene Komponenten wurden durch dreimaliges Waschen mit PBST entfernt und die Platte wurde mit HRP-gekoppeltem anti-rabbit-Antikörper 1:10000 für 1 h bei RT inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift erfolgte die Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers über TMB. Nach Abstoppen der HRP-katalysierten Reaktion mit 1 M H₂SO₄ wurde die Absorption der Lösungen bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen.

4.4.1.2 Sandwich-ELISA mit OVA-DO

Im sogenannten Sandwich-ELISA wird mit zwei verschiedenen Antikörpern gegen verschiedene Epitope eines Antigens gearbeitet. Genauer gesagt wird eine Mikrotiterplatte mit einer Art von Antikörper beschichtet. Nach einem Blockierungsschritt wird darauf die mutmaßlich das Antigen enthaltende Lösung inkubiert und das Antigen nach erfolgter Bindung an den ersten Antikörper über eine zweite Art von Antikörper detektiert. In Abb. 9 ist derjenige Sandwich-ELISA schematisch dargestellt, der im Rahmen dieser Arbeit als Grundlage für den später folgenden Versuchsaufbau entwickelt wurde.

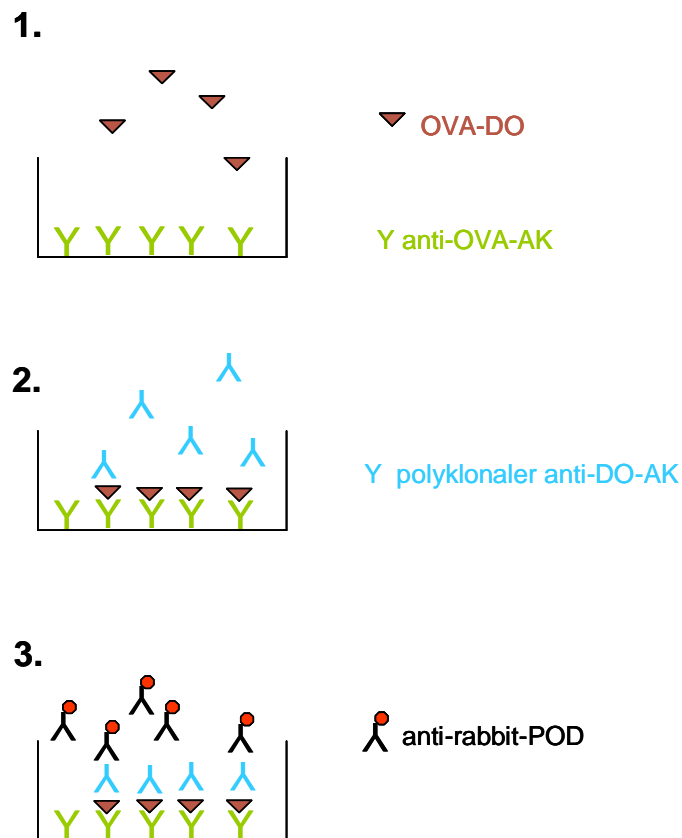


Abb. 9: Schema eines Sandwich-ELISAs mit OVA-DO

Zunächst wurde die Platte mit einem kommerziellen anti-OVA-AK ü.N. bei 4°C in einer Verdünnung von 1:5000 bzw. 1:10000 in PBS beschichtet; dies entsprach 1,96 bzw. 0,98 µg AK/ ml oder 196 bzw. 98 ng AK pro *well* (bei einem Standardvolumen von 100 µl pro *well*). Es wurde 90min bei RT mit 3% BSA/PBS blockiert; anschließend wurde als Antigen OVA-DO in verschiedenen Konzentrationen (0-250 pmol DO/*well*) sowie als Negativkontrolle OVA-haltige Proben inkubiert. Dieser Inkubationsschritt erfolgte für 1 h bei RT in 0,3% BSA/PBS. Nach dreimaligen Waschen mit PBST folgte die Inkubation mit dem polyklonalen anti-DO-AK (1 h RT, 1:1000 in 0,3% BSA/PBS) sowie dessen Detektion über die übliche Vorgangsweise mit HRP-gekoppeltem anti-rabbit-AK und TMB (s.o.).

4.4.1.3 Kompetitiver Sandwich-ELISA mit OVA-DO

Oben beschriebener Sandwich-ELISA wurde um ein kompetitierendes Element, in diesem Falle Trypsin-Inhibitor-DO, erweitert:

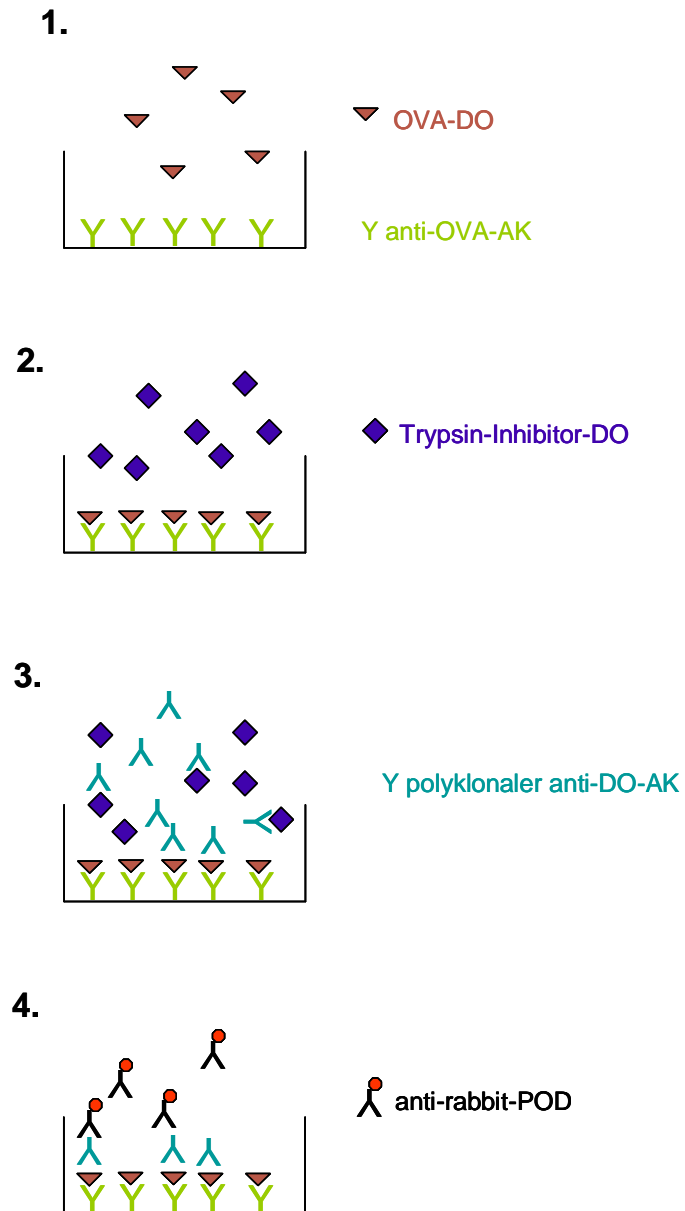


Abb. 10: Schema eines kompetitiven Sandwich-ELISAs mit OVA-DO

Hierfür wurde die Platte nach oben beschriebener Bindung von OVA-DO an den anti-OVA-AK mit Trypsin-Inhibitor-DO in verschiedenen Konzentrationen (0-500 pmol DO/*well*) beschickt. In direktem Anschluss hieran wurde der polyklonale anti-DO-AK in einer Verdünnung von 1:1000 zugegeben und diese Mischung 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde der indirekt an die Platte gebundene anti-DO-AK über den HRP-gekoppelten anti-rabbit-AK und TMB detektiert.

4.4.1.4 Filtrationsplatten-ELISA mit OVA-DO

Nach der Überprüfung bzw. Etablierung der oben beschriebenen Grundlagen wurde der in Abb. 11 schematisch dargestellte ELISA entwickelt.

Die PVDF-Membran der Filtrationsplatte wurde zunächst mit Methanol und Transferpuffer aktiviert und dann mit 25 pmol Protein A/*well* in PBS beschichtet. Nach zweistündiger Inkubation bei RT wurde in einer speziell für diesen ELISA geschaffenen Vorrichtung (s. Abb. 12) Vakuum angelegt und nicht gebundenes Protein A durch die Membran in eine darunter befindliche Mikrotiterplatte gesaugt und verworfen. Nach einmaligen Spülen der Filtrationsplatte mit PBST wurde selbige für 2 h bei RT mit 3% BSA/PBS blockiert. Nicht gebundenes BSA wurde durch oben beschriebenen Vorgang entfernt. Darauf folgte die Bindung von anti-DO-AK an Protein A. Hierfür lag folgende Rechnung zugrunde: Es wurde davon ausgegangen, dass 1ml Serum eines immunisierten Kaninchens 10 mg IgG insgesamt und 1 mg spezifisches IgG enthält. Sollten nun 2,5 pmol (entsprechend 0,375 µg) spezifisches IgG pro *well* immobilisiert werden, entsprach dies 0,375 µl Serum in 100 µl PBS pro *well*. Da 1 mol Protein A theoretisch 2 mol IgG binden, konnte davon ausgegangen werden, dass 25 pmol Protein A in der Lage sein würden, die zugegebenen 25 pmol Gesamt-IgG bzw. 2,5 pmol spezifisches IgG zu binden. Die Inkubation des AK erfolgte ü.N. bei 4°C; evtl. überschüssiger AK und sonstige Serumbestandteile wurden durch Saugen und Spülen mit PBST entfernt.

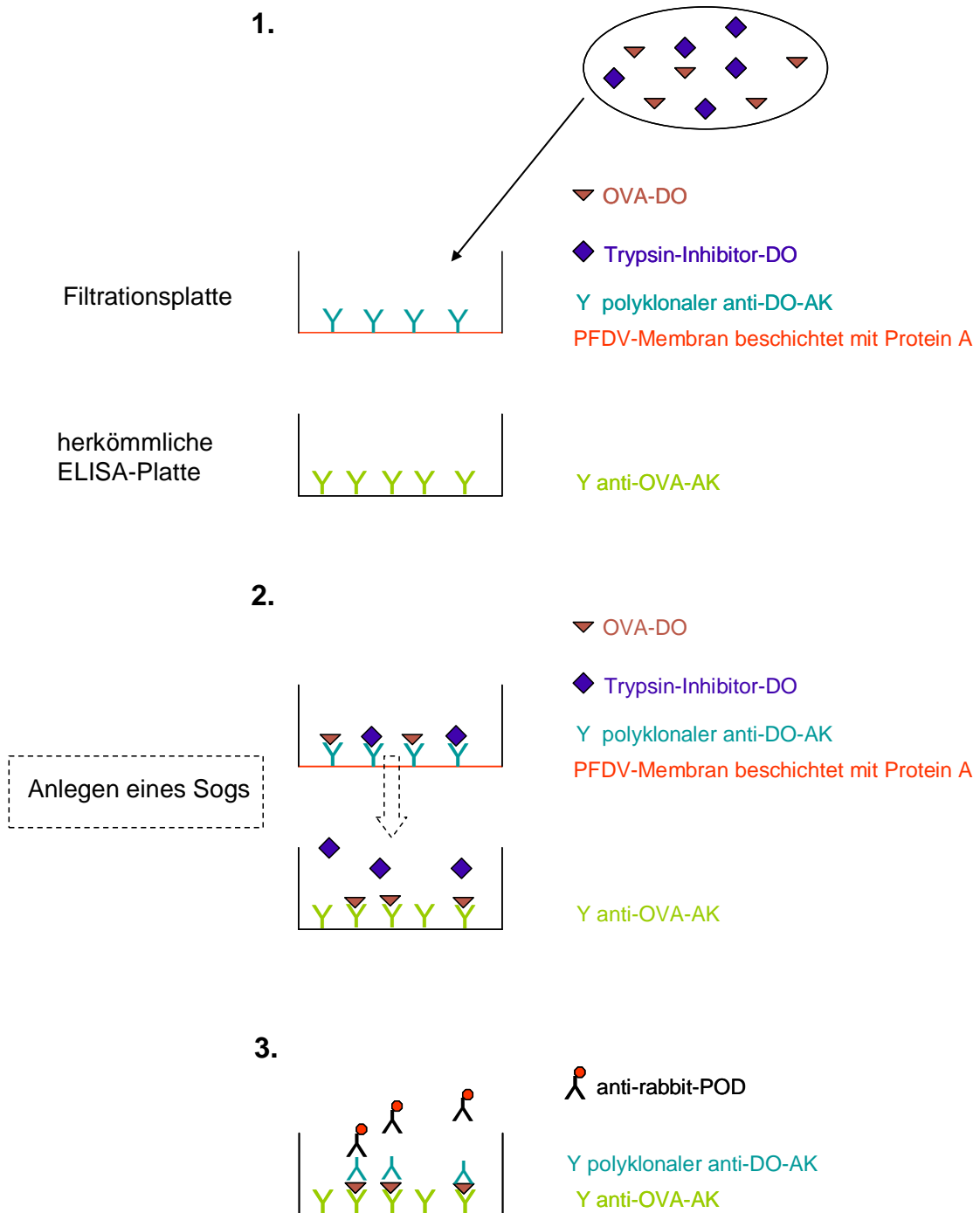


Abb. 11: Schema eines Filtrationsplatten-ELISAs mit OVA-DO

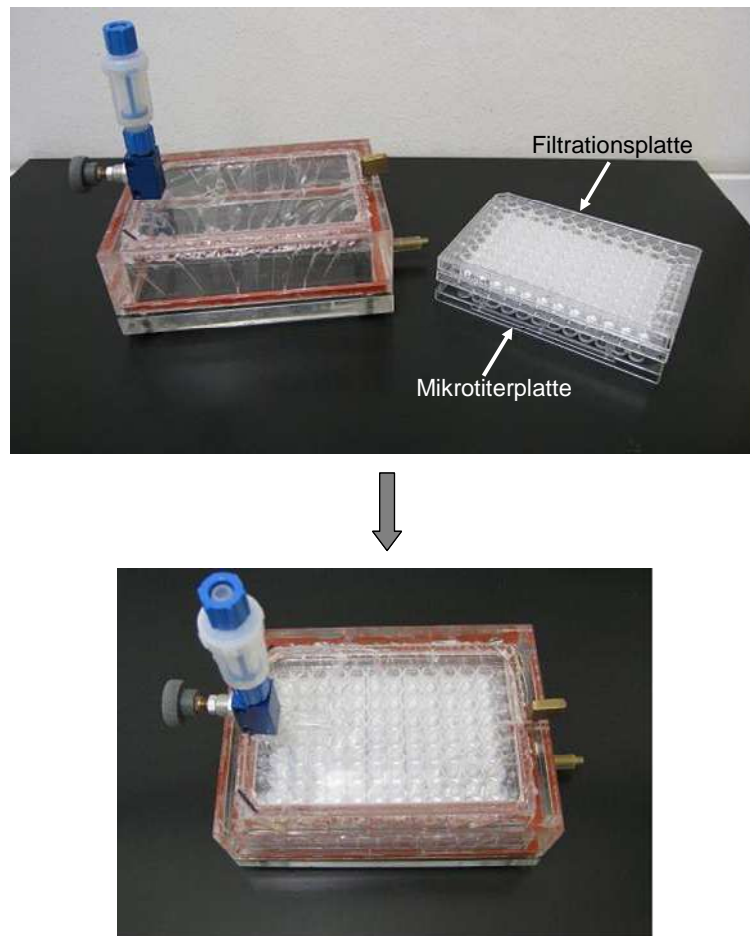


Abb. 12: Vorrichtung zur Durchführung eines Filtrationsplatten-ELISAs

Parallel zu dieser Behandlung der Filtrationsplatte wurde eine herkömmliche Mikrotiterplatte mit anti-OVA-AK beschichtet und blockiert (s. 4.4.1.2).

In der Filtrationsplatte folgte eine einstündige gleichzeitige Inkubation von 300 pmol OVA-DO/well sowie variierenden Mengen an Trypsin-Inhibitor-DO (0-4 nmol DO/well) in PBS bzw. zu untersuchende *Mytilus*-Extrakte in verschiedenen Verdünnungen bei RT. Danach wurden die Proben aus der Filtrationsplatte in die mit anti-OVA-AK beschichtete Mikrotiterplatte gesaugt und dort eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurde die Platte mit polyklonalem anti-DO-AK 1:1000 inkubiert und dieser auf die oben beschriebene Weise mit HRP-gekoppeltem anti-rabbit-AK und TMB detektiert

4.4.2 Assay zur Detektion von Domoinsäure mit Biotin-DO

Alternativ zu den unter 4.4.1 aufgeführten ELISAs wurde Biotin-DO anstelle von OVA-DO und Avidin anstelle des anti-OVA-AK verwendet. Daraus ergaben sich die im Folgenden beschriebenen Versuchsaufbauten.

4.4.2.1 Schicht-ELISA mit Biotin-DO

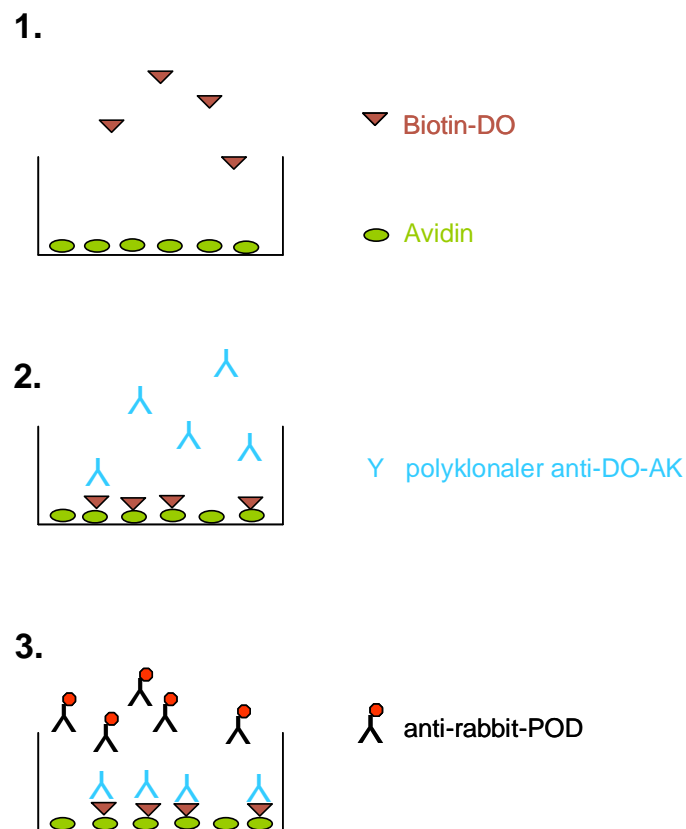


Abb. 13: Schema eines Schicht-ELISAs mit Biotin-DO

Die Mikrotiterplatte wurde mit 12,5 pmol Avidin pro well beschichtet. Als Antigen wurden 0-50 pmol Biotin-DO inkubiert. Die sonstige Vorgehensweise entsprach der unter 4.4.1.2 beschriebenen.

4.4.2.2 Filtrationsplatten-ELISA mit Biotin-DO

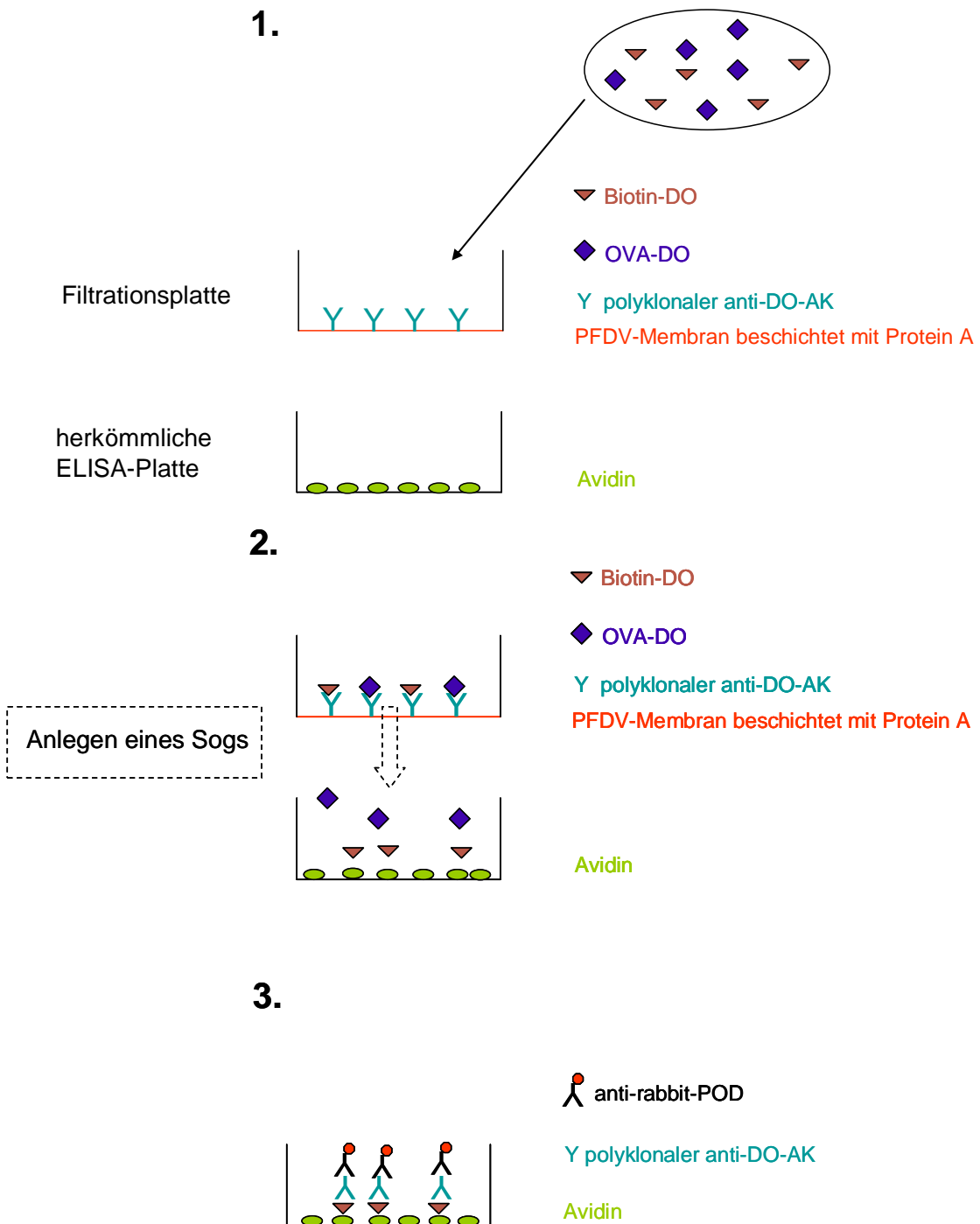


Abb. 14: Schema eines Filtrationsplatten-ELISAs mit Biotin-DO

Auch hierbei wurde die Mikrotiterplatte mit 25 pmol Avidin pro *well* beschichtet. Als kompetetierende Antigene wurden 0,5 pmol Biotin-DO und 0-1 nmol OVA-DO bzw. zu untersuchender Extrakt in verschiedenen Verdünnungen inkubiert. Ansonsten entsprach die Vorgehensweise der unter 4.4.1.4 beschriebenen.

4.4.2.3 Kontrollreaktion zur Kompetiton in Filtrationsplatte

Um eindeutig nachzuweisen, dass der anti-DO-AK auf der Membran der Filtrationsplatte immobilisiert wurde sowie eine Kompetition zwischen den verschiedenen DO-Konjugaten (bzw. *Mytilus*-Extrakten) stattgefunden hat, wurde nach Durchsaugen der Lösungen in die Mikrotiterplatte eine Kontrollreaktion durchgeführt. Hierzu wurde die Filtrationsplatte mit PBST gespült und 1 h bei RT mit einem an HRP konjugiertes Avidin (s. 3.1.3) in der Verdünnung 1:2000 in 0,3% BSA/PBS inkubiert und anschließend mit präzipitierendem TMB entwickelt.

4.4.3 Testen der Methanolverträglichkeit

4.4.3.1 Methanolkompatibilität der Antigen-Antikörper-Reaktion

Da Domoinsäure üblicherweise mit Methanol-H₂O-Mischungen aus Gewebe extrahiert wird (Quilliam 1995, Pardo *et al.* 2007, Wei *et al.* 2001), musste zunächst die Methanolkompatibilität der Antigen-Antikörper-Reaktion im ELISA überprüft werden. Hierbei erfolgte die AK-Inkubation wie im herkömmlichen ELISA (s. 4.2.2), allerdings unter Verwendung verschiedener Methanol-Konzentrationen in 0,3% BSA/PBS.

4.4.3.2 Methanolkompatibilität der Detektionsassays

Die beschriebenen Versuche wurden teilweise mit methanolischen Extrakten durchgeführt. Um die Komponenten des Assays insgesamt auf Methanolverträglichkeit zu testen, wurden unter 4.4.1.4 und 4.4.2.2 beschriebene Versuche durchgeführt. Hierbei erfolgte die Antigen-Inkubation in 1%, 5% bzw. 10% Methanol/PBS.

4.4.4 Herstellung der *Mytilus*-Extrakte

4.4.4.1 *Mytilus edulis*

Das bereits gefrorene gesamte weiche Gewebe (5g) eines Individuums der Art *Mytilus edulis* wurde in Aluminiumfolie verpackt in flüssigem Stickstoff gefroren, um es anschließend in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill zu zerkleinern. Das Gewebe wurde in 10 ml Extraktionspuffer 1 (s. 3.1.4) aufgenommen und 1 h bei 220 rpm und RT geschüttelt. Um Zell- und Gewebetrümmer zu entfernen, wurde die Suspension bei 4500 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Für spätere Versuche wurden Teile des *Mytilus edulis*-Extrakts mit Domoinsäure angereichert: Hierfür wurde zunächst über die OD₂₈₀ der Proteingehalt ermittelt und der Extrakt dann auf 15 mg Protein/ml mit PBS verdünnt. 1 ml dieser Verdünnung wurde anschließend mit 15 µg (entsprechend 48 nmol) DO versetzt und 2 h bei RT inkubiert

4.4.4.2 *Mytilus galloprovincialis*

Drei lebende Individuen der Art *Mytilus galloprovincialis* wurden getrennt voneinander 24 h bei 14°C in je 500 ml Meerwasser inkubiert:

- 1) mit 1 µg DO pro Gramm Gesamtgewicht: Der Muschel mit einem Gesamtgewicht von 35 g wurden 3,5 µl DO (10 mg/ml HEPES) entsprechend 35 µg DO zugefügt. Dies entsprach einer anfänglichen DO-Konzentration im Meerwasser von 70 µg/l oder 225 nM.
- 2) mit 10 µg DO pro Gramm Gesamtgewicht: Der Muschel mit einem Gesamtgewicht von 35,4 g wurden 35,4 µl DO (10 mg/ml HEPES) entsprechend 354 µg DO zugefügt. Dies entsprach einer anfänglichen DO-Konzentration im Meerwasser von 708 µg/l oder 2,28 µM.
- 3) Der Muschel mit einem Gesamtgewicht von 36,6 g wurde keine DO zugefügt; sie diente als Negativkontrolle.

In regelmäßigen Abständen wurde kontrolliert, ob die Muscheln geöffnet waren, da es andernfalls möglich gewesen wäre, dass sie keine DO filtriert/ inkorporiert hätten.

Nach 24 h wurden die Muscheln geöffnet, das Wasser abtropfen gelassen und das gesamte weiche Gewebe entnommen, dessen Nassgewicht dann bestimmt wurde:

- 1) 8,1 g
- 2) 9,2 g
- 3) 9,4 g

Das Gesamtgewebe wurde in Aluminiumfolie verpackt in flüssigem Stickstoff gefroren, um es anschließend in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill zu zerkleinern. Das Gewebe wurde in 3 ml H₂O aufgenommen und mittels Ultraschall desintegriert. Die auf diese Art entstandenen jeweils 10 ml Homogenat wurden folgendermaßen aufgeteilt:

- a) 5 ml Homogenat + 5 ml Methanol
- b) 5 ml Homogenat + 5 ml Extraktionspuffer 2 (s. 3.1.4)

Die so aufbereiteten Gewebeproben wurden 1 h bei 220 rpm und RT geschüttelt und anschließend bei 4500 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert, um Zell- und Gewebetrümmer zu entfernen. Die Überstände wurden aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Aus den eingesetzten DO-Mengen und den erhaltenen Endvolumina ergaben sich folgende maximale DO-Konzentrationen in den Extrakten (vorausgesetzt, dass sämtliche DO inkorporiert wurde):

- 1a) 5,6 nmol DO/ml (50% Methanol/ 50% H₂O)
- 1b) 5,6 nmol DO/ml (50% Extraktionspuffer 2/ 50% H₂O)

- 2a) 57 nmol DO/ml (50% Methanol/ 50% H₂O)
- 2b) 57 nmol DO/ml (50% Extraktionspuffer 2/ 50% H₂O)

- 3a) Negativkontrolle (50% Methanol/ 50% H₂O)
- 3b) Negativkontrolle (50% Extraktionspuffer 2/ 50% H₂O)

5 ERGEBNISSE

5.1 Charakterisierung der Biotoxin-Konjugate

5.1.1 Charakterisierung der Biotoxin-Konjugate mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Um die Kopplungserfolge der Protein- (bzw. Biotin-) DO-Konjugate zu testen, wurden sie zunächst im denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel gemäß 4.1.2.1 aufgetrennt. Es wurden jeweils 3 nmol DO aufgetragen, daraus ergaben sich folgende Protein-Mengen: 5,4 µg OVA, 2,4 µg Trypsin-Inhibitor, 1,5 µg Casein, 30 µg Avidin. Äquivalente Mengen an unkonjugiertem Protein wurden eingesetzt. Für die Avidin-Biotin-DO-Proben (bzw. Avidin-Biotin) wurden zunächst 3 nmol Biotin-DO (bzw. Biotin) an 1,5 nmol Avidin gebunden: 30 µg Avidin (6 µl einer Lösung der Konzentration 5 mg/ml) wurden zusammen mit 0,43 µl Biotin-DO (4.1.1.2) bei RT für 1 h inkubiert und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Es wurden zwei Gele parallel laufen gelassen, von denen eines gemäß 4.1.2.3 auf eine Nitrocellulosemembran geblottet wurde. Zur Detektion der DO diente der polyklonale anti-DO-AK 387 in einer Verdünnung von 1:1000 in 0,3% BSA/TBS und danach der HRP-gekoppelte anti-rabbit-AK in einer Verdünnung von 1:10 000 in 0,3% BSA/TBS sowie präzipitierendes TMB.

Das zweite Gel wurde wie unter 4.1.2.2 beschrieben mit Coomassie gefärbt. Der Western Blot und das gefärbte Gel sind in Abb. 15 zu sehen.

Zunächst einmal fallen im SDS-Gel die scharfen Banden des ungekoppelten Ovalbumins (Spur 2, 44 kD) bzw. des ungekoppelten Trypsin-Inhibitors (Spur 4; 20,1 kD) auf. Die unscharfen Banden der zugehörigen Kopplungsprodukte (Spuren 1 und 3) zeigen ein Laufverhalten wie ein geringfügig leichteres Protein- sie befinden sich etwas unterhalb der ungekoppelten Proteine.

Das ungekoppelte Casein (Spur 6) bildet eine schwache Bande oberhalb 25 kD. Das Kopplungsprodukt (Spur 5) hingegen scheint im denaturierenden Gel kaum zu laufen- es ist oberhalb von 250 kD zu sehen.

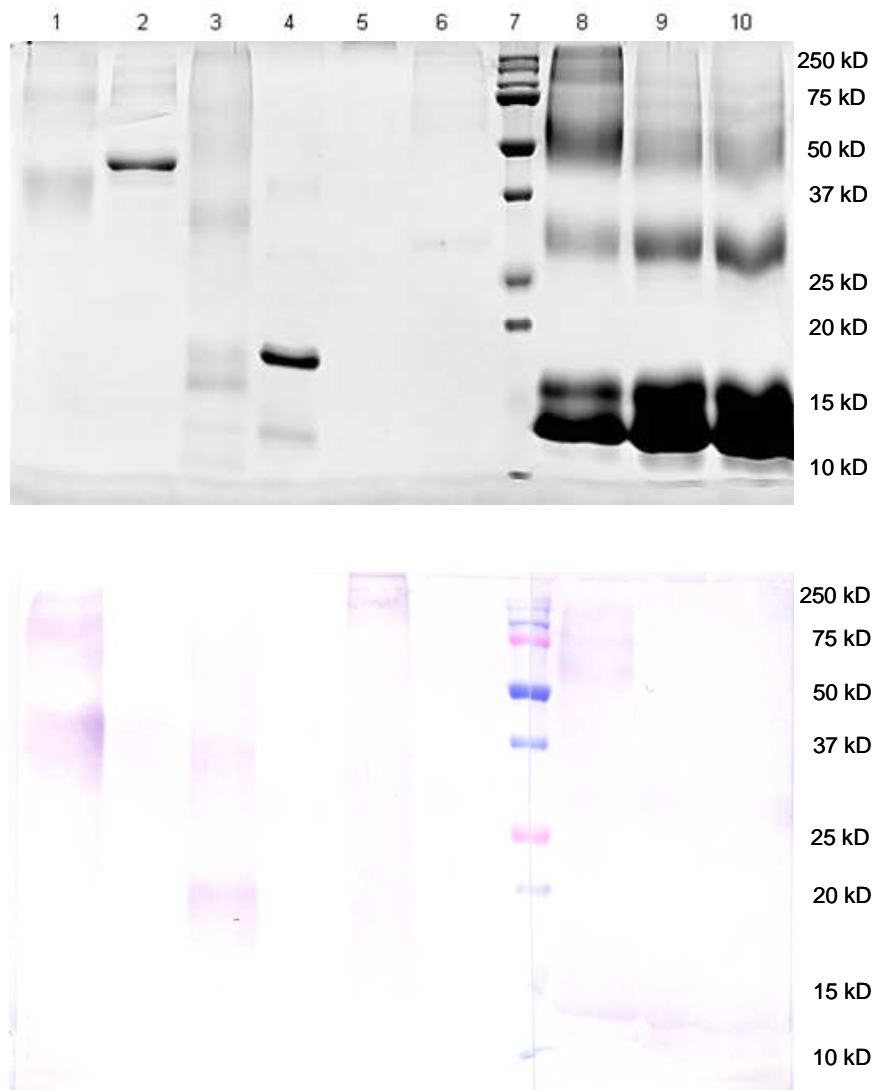


Abb. 15.: Denaturierendes SDS-Polyacrylamidgel (oben) und zugehöriger Western Blot der unkonjugierten und an DO konjugierten Proteine. 1 OVA-DO, 2 OVA, 3 Trypsin-Inhibitor-DO, 4 Trypsin-Inhibitor, 5 Casein-DO, 6 Casein, 7 Protein-Längenstandard, 8 Avidin-Biotin-DO, 9 Avidin-Biotin, 10 Avidin

Zu den Avidin-haltigen Spuren 8, 9 und 10 lässt sich zunächst sagen, dass mehr Protein aufgetragen wurde, als für eine gute Darstellung optimal gewesen wäre- dies wurde jedoch in Kauf genommen, um zumindest rechnerisch auf 3nmol DO zu kommen und mit den anderen Kopplungsprodukten vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

Weiterhin fällt in Spur 8 auf, dass das Biotin-DO-gebundene Avidin oberhalb 50 kD eine intensivere Bande zeigt als Biotin-gebundenes Avidin (Spur 9) oder Avidin alleine (Spur 10) auf gleicher Höhe. Mit der Bande oberhalb 25 kD verhält es sich umgekehrt- sie ist in Spur 8 schwächer als in Spur 9 und 10. Das hier verwendete tetramere Avidin (NeutrAvidinTM, ThermoFisher Scientific) besitzt ein Molekulargewicht von 60 kD und scheint durch die Denaturierung nur teilweise in Monomere zu zerfallen. Das erklärt die Banden auf Höhen von ca. 60, 30 und 15 kD. Das Tetramer scheint im Kopplungsprodukt (Spur 8) am besten erhalten zu bleiben, da hier die Bande auf Höhe von ca. 60 kD am intensivsten ist.

Im Western Blot (Abb. 15) werden nur die DO-Kopplungsprodukte detektiert und indirekt angefärbt, die als Negativkontrollen dienenden ungekoppelten Proteine (Spuren 2, 4, 6, 9 und 10) werden vom anti-DO-AK nicht erkannt.

5.1.2 Charakterisierung der Biotoxin-Konjugate mittels Dot Blot

Da es sich bei den synthetisierten DO-Konjugaten (von geringfügigen Kontaminationen abgesehen) nicht um Proteingemische, sondern um reine Proteine handelt, musste nicht jede neue Charge per Western Blot überprüft werden; es genügte vielmehr der weniger aufwendige Dot Blot.

5.1.2.1 Biotin-DO

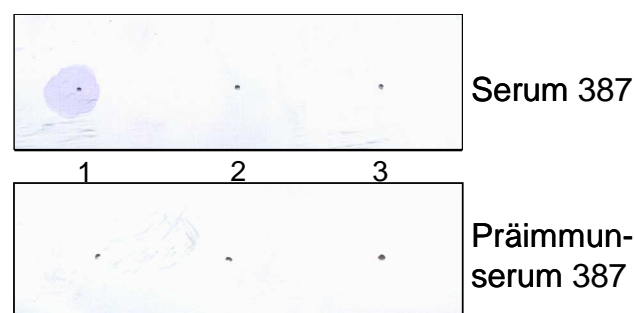


Abb. 16: Dot Blot biotinylierter DO, über Avidin immobilisiert. 1 Avidin+Biotin-DO, 2 Avidin+Biotin, 3 Avidin

In Abb. 16 ist der Dot Blot der biotinylierten DO zu sehen. Hierfür wurden zunächst 3nmol Biotin-DO an 1,5 nmol Avidin gebunden: 30 µg Avidin (6µl einer Lösung der Konzentration 5mg/ml) wurden zusammen mit 0,43 µl Biotin-DO (4.1.1.2) bei RT für 1 h inkubiert und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Die Proben wurden gemäß 4.1.2.4 auf eine Nitroellulosemembran aufgetragen und die Membran entsprechend behandelt. Zur Detektion der DO diente der polyklonale anti-DO-AK 387 in einer Verdünnung von 1:1000 in 0,3% BSA/TBS und daraufhin der HRP-gekoppelte anti-rabbit-AK in einer Verdünnung von 1:10000 in 0,3% BSA/TBS sowie präzipitierendes TMB als HRP-Substrat. Deutlich erkennbar ist die violette Färbung auf dem Avidin-Biotin-DO-Spot auf der oberen Membran, die mit Immuneserum 387 behandelt wurde. Die beiden anderen als Negativkontrollen dienenden Spots zeigen keine Signale, ebenso wenig wie die gesamte untere Membran, die mit Präimmuneserum behandelt wurde und als Negativkontrolle diente. Die Bindung zwischen dem Avidin-Biotin-DO-Konstrukt und dem anti-DO-AK scheint somit eine spezifische zu sein.

5.1.2.2 OVA-DO

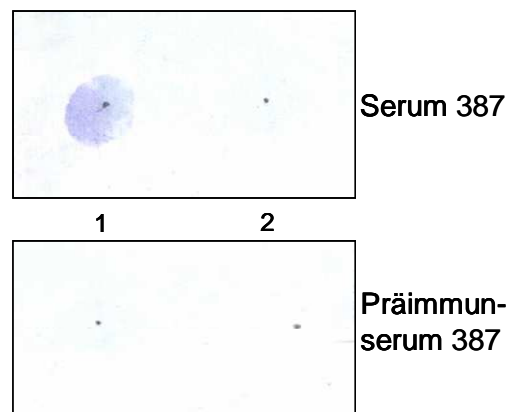


Abb. 17: Dot Blot Ovalbumin-gekoppelter DO. 1 OVA-DO, 2 OVA

In Abb. 17 ist der Dot Blot Ovalbumin-gekoppelter DO zu sehen, aufgetragen wurden wie im vorhergehenden Blot 3 nmol DO entsprechend 1,8 µl OVA-DO (4.1.1.1). Die Behandlung des Blots erfolgte analog zu dem in 5.1.2.1 beschriebenen.

Deutlich erkennbar ist die violette Färbung auf dem OVA-DO-Spot auf der oberen Membran, die mit Immuns serum 387 behandelt wurde. Der als Negativkontrolle dienende OVA-Spot zeigt kein Signal, ebenso wenig wie die untere Membran, die mit Präimmuns serum behandelt wurde und als Negativkontrolle diente. Die Bindung zwischen dem OVA-DO-Konjugat und dem anti-DO-AK scheint somit eine spezifische zu sein.

5.1.2.3 Trypsin-Inhibitor-DO

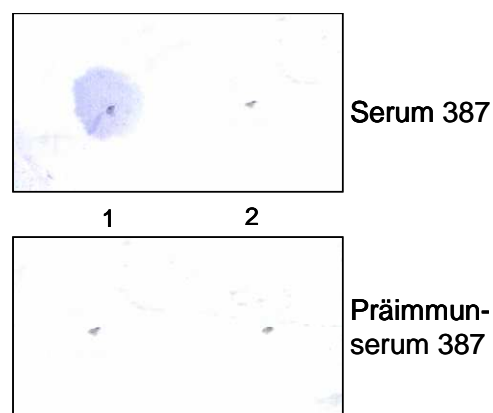


Abb. 18: Dot Blot Trypsin-Inhibitor-gekoppelter DO. 1 Trypsin-Inhibitor-DO, 2 Trypsin-Inhibitor

In Abb. 18 ist der Dot Blot Trypsin-Inhibitor-gekoppelter DO zu sehen, aufgetragen wurden wie in den beiden vorhergehenden Blots 3nmol DO entsprechend 1,8 μ l Trypsin-Inhibitor-DO (4.1.1.1). Die Behandlung des Blots erfolgte analog zu dem in 5.1.2.1 beschriebenen.

Deutlich erkennbar ist die violette Färbung auf dem Trypsin-Inhibitor-DO-Spot auf der oberen Membran, die mit Immuns serum 387 behandelt wurde. Der als Negativkontrolle dienende Trypsin-Inhibitor-Spot zeigt kein Signal, ebenso wenig wie die untere Membran, die mit Präimmuns serum behandelt wurde und als Negativkontrolle diente. Die Bindung zwischen dem Trypsin-Inhibitor-DO-Konjugat und dem anti-DO-AK scheint somit ebenfalls eine spezifische zu sein.

5.1.2.4 Casein-DO

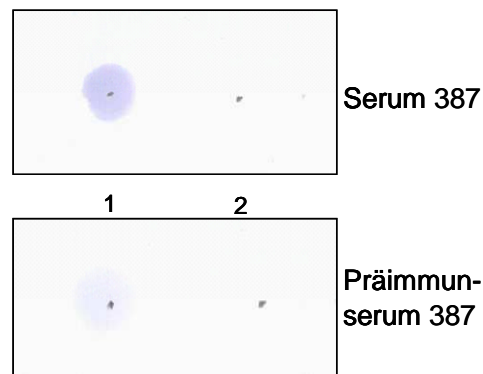


Abb. 19: Dot Blot Casein-gekoppelter DO. 1 Casein-DO,
2 Casein

In Abb. 19 ist der Dot Blot Casein-gekoppelter DO zu sehen, aufgetragen wurden wie im vorhergehenden Blot 3 nmol DO entsprechend 1,8 μ l Casein-DO (4.1.1.1). Die Behandlung des Blots erfolgte analog zu dem in 5.1.2.1 beschriebenen.

Deutlich erkennbar ist die violette Färbung auf dem Casein-DO-Spot auf der oberen Membran, die mit Immuns serum 387 behandelt wurde. Der als Negativkontrolle dienende Casein-Spot zeigt kein Signal. Der Casein-DO-Spot auf der unteren Membran, die mit Präimmuns serum behandelt wurde und somit als Negativkontrolle diente, zeigt allerdings ein erkennbares Signal, wenn auch deutlich schwächer als jener auf oberer Membran. Offenbar enthält das Präimmuns serum bereits einen geringen Anteil Immunglobuline, die in der Lage sind, an das Casein-DO-Konjugat zu binden. Dies ist jedoch zu vernachlässigen, wenn man sich die hohe Intensität des Signals auf der mit Immuns serum behandelten Membran betrachtet.

5.1.3 Charakterisierung der Biotoxin-Konjugate mittels ELISA

Da die Biotoxin-Konjugate letztendlich hauptsächlich im ELISA Verwendung finden sollten, wurden sie nicht nur im Immuno- und Western Blot, sondern auch in der einfachsten Art des ELISAs (s. 4.4.2) auf Kopplungserfolge getestet. Hiefür

wurde das jeweilige DO-Konjugat (in PBS verdünnt) direkt auf Mikrotiterplatten immobilisiert. Eine Ausnahme bildete die biotinylierte DO, für welche zunächst Avidin auf der Platte immobilisiert wurde (s. 4.4.2.1). Ansonsten entsprach die Vorgehensweise der unter 4.4.2 beschriebenen.

5.1.3.1 Biotin-DO

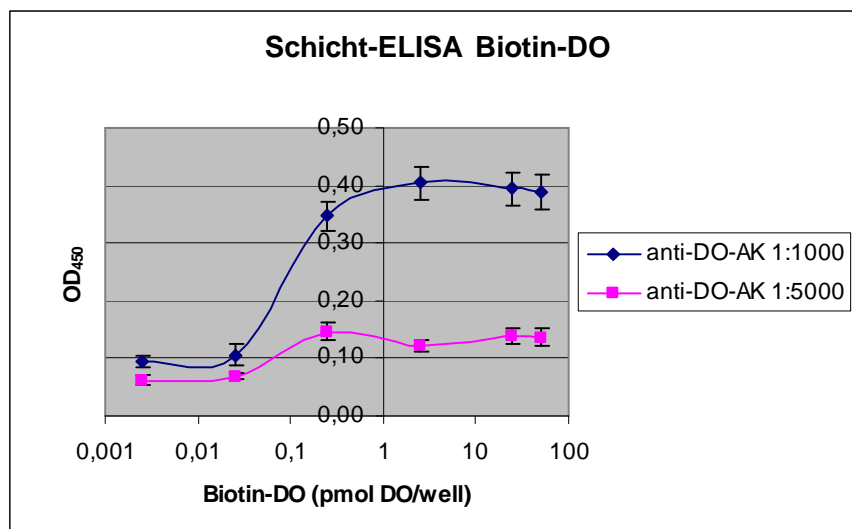


Abb. 20: Schicht-ELISA zur Überprüfung des Kopplungserfolges von Biotin-DO

In Abb. 20 ist das Ergebnis des ELISAs mit Biotin-DO zu sehen. Zunächst wurden pro well 12,5 pmol Avidin immobilisiert; nach einem Blockierungsschritt wurden 0-50 pmol Biotin-DO/well inkubiert. Daraufhin wurde der polyklonale anti-DO-AK parallel in zwei verschiedenen Verdünnungen (1:1000 und 1:5000) inkubiert und mit einem HRP-gekoppelten anti-rabbit-AK in der Verdünnung 1:10 000 und löslichem TMB detektiert.

Aus Abb. 20 ist deutlich ersichtlich, dass das Avidin-Biotin-DO-Konstrukt tauglich für den Einsatz im ELISA ist: Zumindest bis zu einer Konzentration von 2,5 pmolDO/well

nimmt mit steigender Konzentration die OD₄₅₀ zu. Je mehr immobilisierte DO sich in einem well befindet, desto mehr Primärantikörper (und somit auch mehr Sekundärantikörper) kann binden. Folglich kann die an den Sekundärantikörper

gekoppelte HRP mehr TMB umsetzen. Die Absorptionen der Negativkontrollen (Avidin bzw. Avidin-Biotin) hingegen sind minimal. Die größte Absorptionsdifferenz besteht zwischen 2,5 pmol Biotin-DO/well und 0,25 pmol Biotin-DO/well, weshalb der Bereich oberhalb 0,25 pmol/well in späteren Versuchsaufbauten gewählt wurde. Darüber hinaus ist erkennbar, dass eine Verdünnung des anti-DO-AKs 387 von 1:5000 nicht ausreichend ist, um die genannten Verhältnisse deutlich sichtbar zu machen. Daher wurde im Folgenden stets eine AK-Verdünnung von 1:1000 gewählt.

5.1.3.2 Trypsin-Inhibitor-DO, OVA-DO, Casein-DO

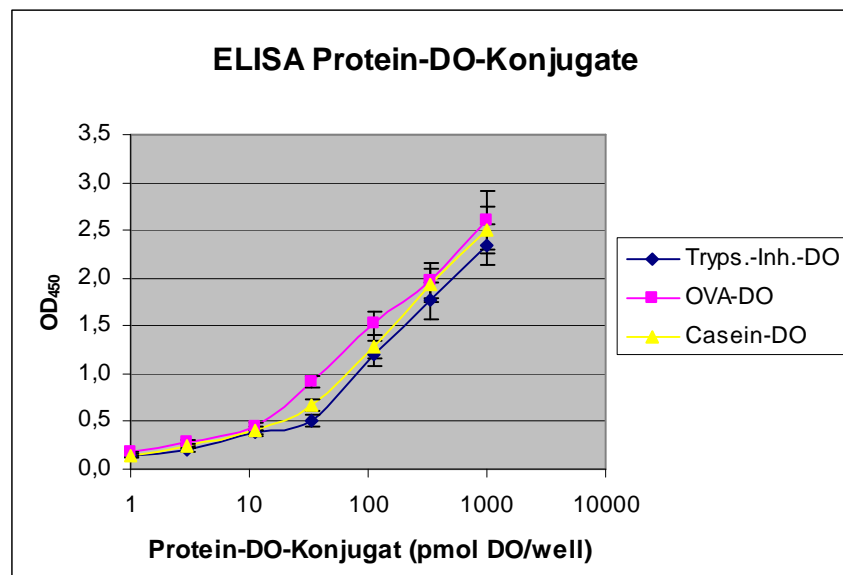


Abb. 21: ELISA zur Überprüfung der Kopplungserfolge der Protein-DO-Konjugate

In Abb. 21 ist das Ergebnis des ELISAs mit Trypsin-Inhibitor-DO, OVA-DO und Casein-DO zu sehen. Zunächst wurden die jeweiligen Konjugate in verschiedenen Verdünnungen (0-1 nmol DO/well) immobilisiert, es folgte ein Blockierungsschritt. Daraufhin wurde der polyklonale anti-DO-AK in der Verdünnung 1:1000 inkubiert und mit einem HRP-gekoppelten anti-rabbit-AK in der Verdünnung 1:10000 und löslichem TMB detektiert.

Es ist ersichtlich, dass alle drei Konjugate annähernd gleichermaßen geeignet sind für die Verwendung im ELISA: Mit steigender DO-Konzentration nimmt die

OD₄₅₀ zu. Je mehr DO pro *well* vorhanden ist, desto mehr anti-DO-AK bindet und wird folglich vom Sekundärantikörper detektiert. Es gibt lediglich geringe Differenzen zwischen den Signalen der verschiedenen DO-Konjugate: OVA-DO liefert ein etwas höheres Signal als Casein-DO, dessen Signale wiederum nur geringfügig höher sind als die des Trypsin-Inhibitor-DO-Konjugats.

5.1.4 Charakterisierung der Biotoxin-Konjugate mittels UV-Spektroskopie

Als vierte Methode zur Charakterisierung der Konjugate wurde die UV-Spektroskopie herangezogen. Um die Kopplungsqualität der biotinylierten Domoinsäure und der an die Trägerproteine kovalent gebundenen Domoinsäure zu überprüfen, mussten zunächst mit Hilfe der Gelfiltration (*Zeba Desalting Columns*, 3.1.6) EDC-/NHS-Rückstände bzw. die Isoharnstoffderivate (4.1.1), aber auch nicht gebundene Domoinsäure abgetrennt werden, um eventuelle Störeffekte auszuschließen.

Zur Durchführung der UV-Spektroskopischen Messungen wurden die Konjugationsansätze mit HEPES-Puffer 10 mM, pH 7,4 auf eine einheitliche Domoinsäurekonzentration von 40 µg/ml eingestellt und ein Spektrum von 200-300 nm Wellenlänge aufgenommen. Als Vergleich dienten jeweils die Lösungen der Domoinsäure bzw. der Trägermoleküle Ovalbumin, KLH und FID33, wobei deren Konzentrationen und das Lösungsmittel entsprechend den Verdünnungen der zugrundeliegenden Reaktionsansätze gewählt wurden.

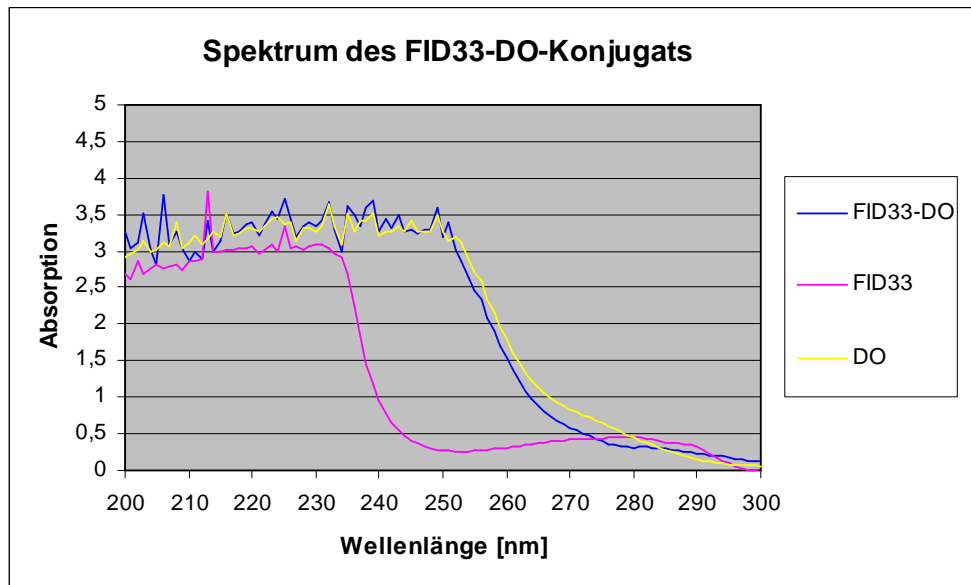


Abb. 22: Charakterisierung des FID33-DO-Konjugats mittels UV-Spektroskopie

Bedingungen: 100 μ l Immunkonjugat FID33-DO mit der Konzentration 40 μ g DO/ml HEPES 10 mM, pH 7,4. Referenz: FID₃₃-Lösung [133,3 μ g FID₃₃/ml HEPES 10 mM, pH 7,4] und DO-Lösung [40 μ g DO/ml HEPES 10 mM, pH 7,4]

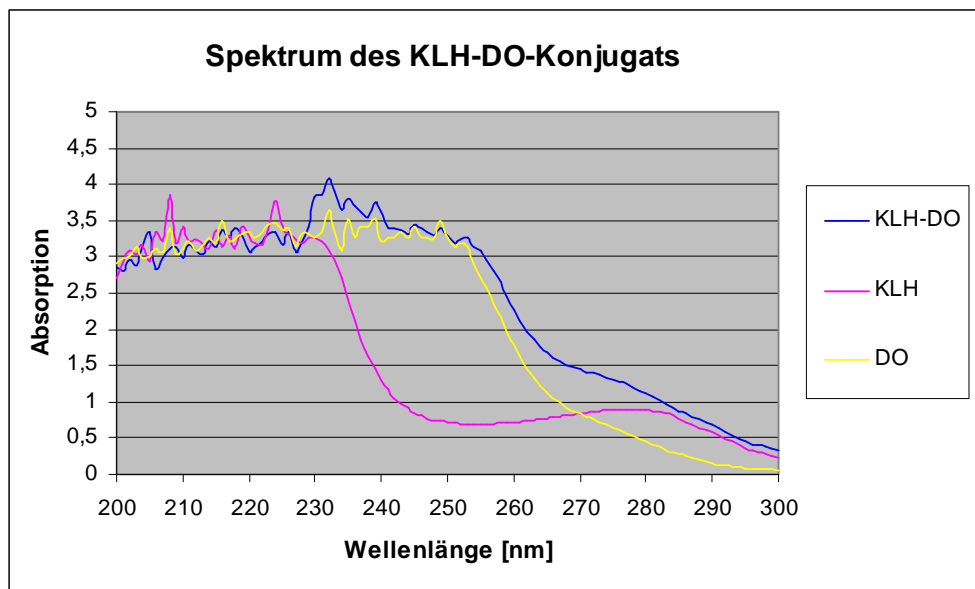


Abb. 23: Charakterisierung des KLH-DO-Konjugats mittels UV-Spektroskopie

Bedingungen: 100 μ l Immunkonjugat KLH-DO mit der Konzentration 40 μ g DO/ml HEPES 10 mM, pH 7,4. Referenz: KLH-Lösung [364 μ g KLH/ml HEPES 10 mM, pH 7,4] und DO-Lösung [40 μ g DO/ml HEPES 10 mM, pH 7,4]

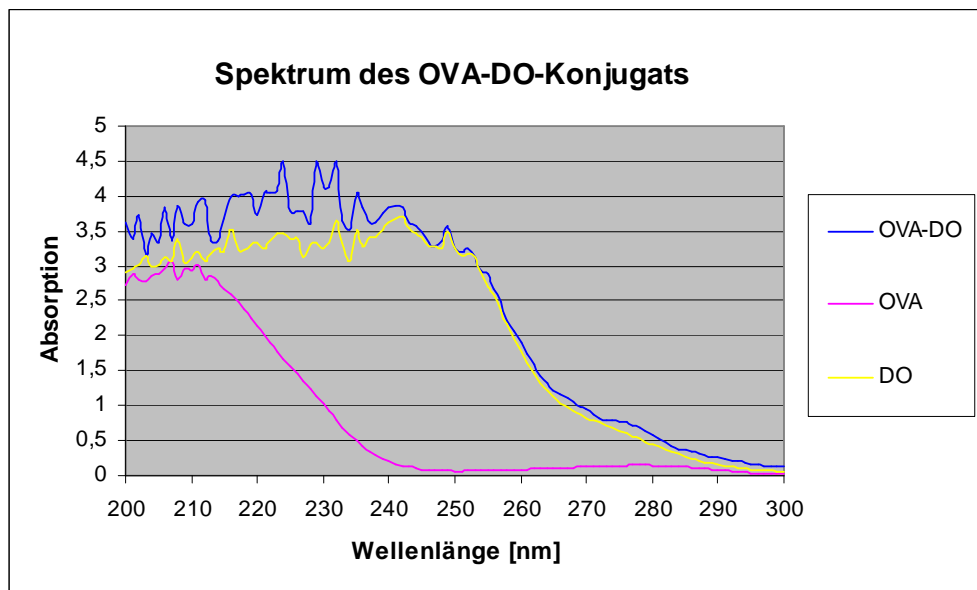


Abb. 24: Charakterisierung des OVA-DO-Konjugats mittels UV-Spektroskopie

Bedingungen: 100 μ l Beschichtungskonjugat OVA-DO mit der Konzentration 40 μ g DO/ml HEPES 10 mM, pH 7,4. Referenz: OVA-Lösung [230 μ g OVA/ml HEPES 10 mM, pH 7,4] und DO-Lösung [40 μ g DO/ml HEPES 10 mM, pH 7,4]

Bei der Betrachtung der Abb. 22, 23 und 24 lassen alle drei Spektren einen Bandenverlauf der Konjugate erkennen, der auf eine Addition der Absorptionen der zugrundeliegenden Edukte schließen lässt. Hierbei ist die Ausprägung einer erfolgreichen Konjugationsreaktion deutlicher an den Absorptionsbanden des KLH- und Ovalbumin-Konjugates festzustellen als an jener des FID33-DO-Immunkonjugats. Das Absorptionsspektrum des Antigens/Haptens zeigt einen charakteristischen spektralen Verlauf mit einem Maximum bei 242 nm Wellenlänge.

5.2 Charakterisierung polyklonaler Antikörper

5.2.1 Titerbestimmung des anti-DO-Immunsersums

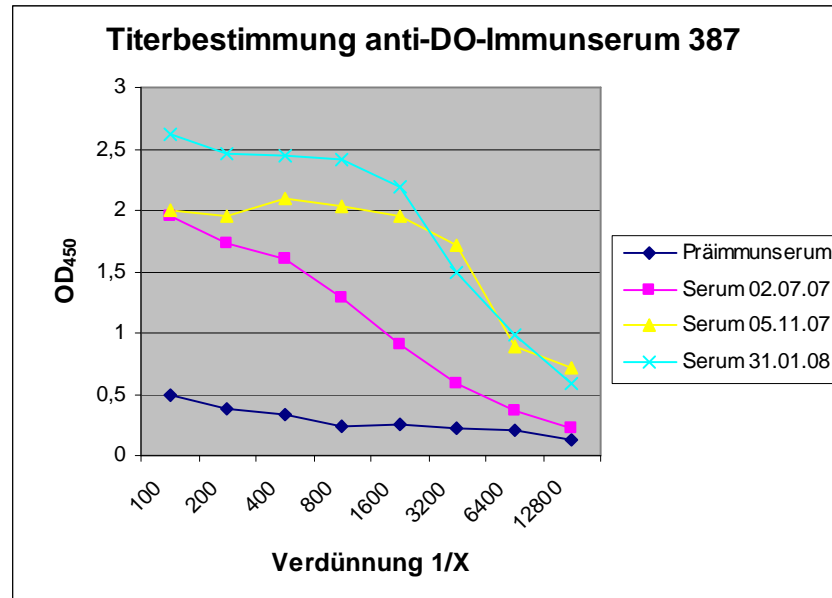


Abb. 25: ELISA zur Titerbestimmung des anti-DO-Immunsersums 387

Eine Titerbestimmung des anti-DO-Immunsersums 387 wurde gemäß 4.2.2 durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 25 zu sehen. Es ist zu erkennen, dass das Signal des Serums vom 31.01.08 ab einer Verdünnung von 1:1600 zu sinken beginnt, daher wurde dieses Serum im nachfolgenden Versuchen in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Die Signale der Seren vom 02.07.07 und 05.11.07 sinken schon bei niedrigeren Verdünnungen bzw. sind von Beginn an niedriger, was verdeutlicht, dass mehrmaliges Immunisieren durchaus sinnvoll ist.

5.2.2 Schachbrett-Titration

Eine Schachbrett-Titration wurde durchgeführt, um die ideale Antikörperverdünnung für einen bestimmten Bereich der Antigenkonzentration zu ermitteln.

Eine Mikrotiterplatte wurde mit OVA-DO (3 pmol-3 nmol DO/well) beschichtet und (nach Blockierung mit 3% BSA/PBS) mit verschiedenen anti-DO-AK-

Verdünnungen sowie den entsprechenden Verdünnungen des Präimmunsersums behandelt. Der ELISA wurde gemäß 4.2.2 entwickelt.

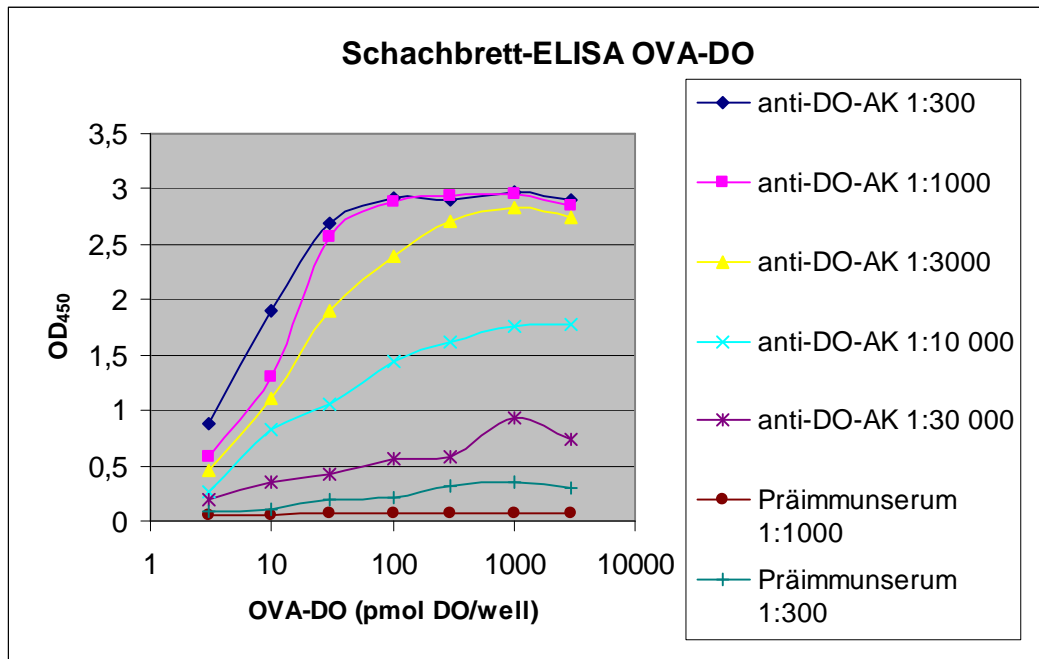


Abb. 26: Schachbrett-ELISA mit anti-DO-Immunsersum 387 und OVA-DO

In Abb. 26 ist das Ergebnis der Schachbrett-Titration zu sehen. Für die in späteren Versuchen angewandten OVA-DO-Konzentrationen von bis zu 300 pmol DO/well scheint eine AK-Verdünnung von 1:1000 sinnvoll zu sein, da hier die größtmöglich messbaren Differenzen zwischen Präimmunsersum und Immunsersum in gleicher Verdünnung vorliegen.

5.2.3 Aufreinigung polyklonaler Antikörper

Wie unter 4.2.4 beschrieben, wurden die IgGs aus dem anti-DO-Immunsersum 387 zunächst über eine Protein A-Säule isoliert und dann der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen über die OD₂₈₀ ermittelt.

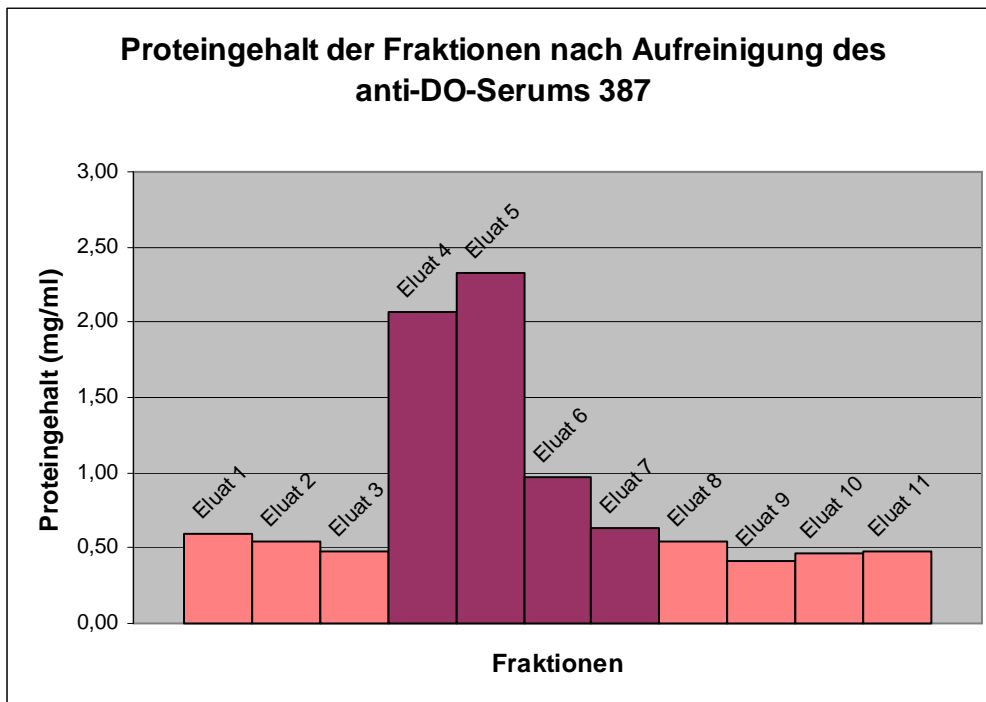


Abb. 27: Proteingehalt der Fraktionen nach Aufreinigung des anti-DO-Immunsersums 387

Aus Abb. 27 wurden diejenigen Eluate ausgewählt, die einen Proteingehalt $\geq 0,6$ mg/ml aufwiesen. Die Eluate 4, 5, 6 und 7 wurden im ELISA gemäß 4.2.5 auf spezifische Antikörperaktivität untersucht, d.h. in verschiedenen Verdünnungen auf einer gegebenen Menge an DO inkubiert und mit HRP-gekoppeltem anti-rabbit-AK detektiert. Als Positivkontrolle diente das Serum vor Aufreinigung.

In Abb. 28 ist zu erkennen, dass alle ausgewählten Eluate deutliche Signale im ELISA liefern. Am höchsten ist jenes von Eluat 4, wobei dieses einen etwas geringeren Proteingehalt aufweist als Eluat 5. In den Verdünnungen 1:30 und 1:100 weisen die Eluate 5, 6 und 7 annähernd gleichwertige Signale auf, in höheren Verdünnungen jedoch sinkt das von Eluat 7 am stärksten ab. Die als Negativkontrollen dienenden Waschfraktionen scheinen keine nachweisbaren anti-DO-Antikörper zu beinhalten.

Die Postivkontrolle, das Immunsersum vor Aufreinigung, zeigt in den Verdünnungen 1:30 und 1:100 ein niedrigeres Signal als die Eluate. In höheren Verdünnungen jedoch sinkt das Signal des nicht aufgereinigten Serums im Gegensatz zu den Signalen der Eluate nicht ab. Allerdings gilt es zu

berücksichtigen, dass das Serum durch die Aufreinigungsprozedur 1:10 verdünnt wurde. Das Signal der 1:100-Verdünnung des nicht aufgereinigten Serums sollte also theoretisch dem der 1:1000-Verdünnung der IgG-reichen Eluate entsprechen. Dies ist lediglich bei Eluat 5 der Fall, welches laut Abb. 27 die Fraktion mit dem höchsten Proteingehalt ist.

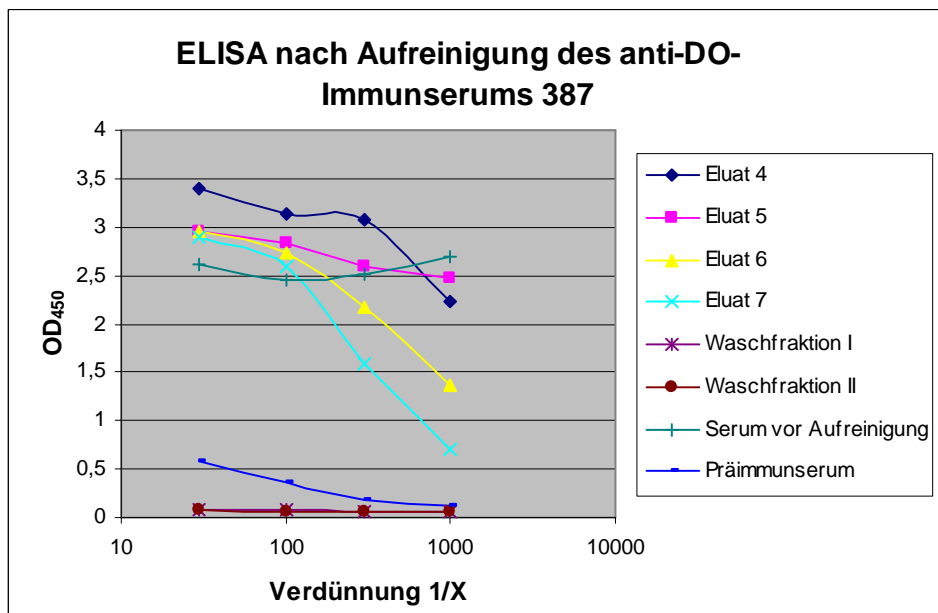


Abb. 28: ELISA nach Aufreinigung des anti-DO-Immunsersums 387

5.3 Charakterisierung monoklonaler Antikörper

5.3.1 Überprüfen der Subklone im ELISA

Eine Mikrotiterplatte wurde gemäß 4.2.2 mit 0,02 µg DO/well beschichtet und blockiert. Darauf folgte die Inkubation der Kulturüberstände verschiedener Subklone für 1 h bei RT. Die Detektion der monoklonalen anti-DO-Antikörper erfolgte über eine einstündige Inkubation mit HRP-gekoppeltem anti-mouse-AK (s. 3.1.3) in der Verdünnung 1:5000 in 0,3% BSA/PBS. Nach der Entwicklung mit TMB und 1 M H₂SO₄ erfolgte die Messung der Absorption bei 450 nm.

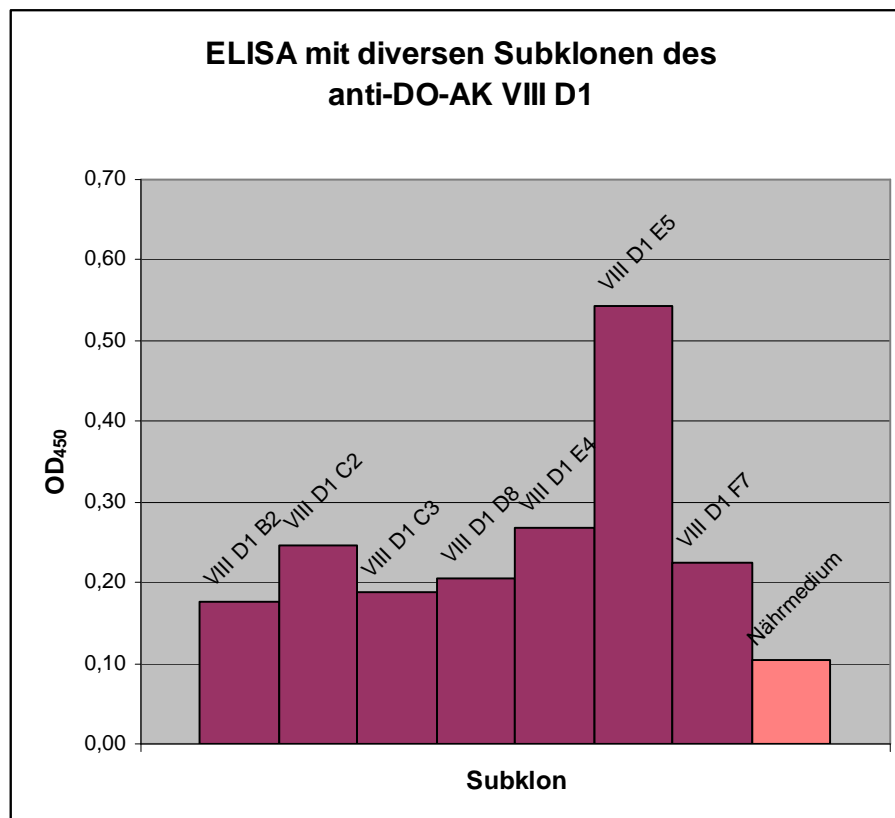


Abb. 29: ELISA mit diversen Subklonen des anti-DO-AK VIII D1

In Abb. 29 ist das Ergebnis des ELISAs verschiedener Subklone aufgeführt. Der Subklon VIII D1 E5 liefert eindeutig das höchste Signal und wurde daher zur Aufreinigung (s. 4.3.6) ausgewählt.

5.3.2 Subklassentypisierung monoklonaler Antikörper

Für die weitere Charakterisierung wurde jeweils ein Zellklon ausgewählt und dessen Überstand zur Bestimmung des Ig-Subtypes und Isotypes der produzierten Antikörper eingesetzt. Bei der Gewinnung der monoklonalen Antikörper nach dem hier angewendeten Verfahren sind folgende Sub- und Isotypen zu unterscheiden: IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ sowie IgM. Die Überstände der sieben Subklone wurden im ELISA (4.3.5) zur Bestimmung der Ig-Subklasse eingesetzt. Die ermittelten Subtypen der von den Hybridomzelllinien produzierten Antikörper sind in Tab. 3 dargestellt.

Subklon	Ig-Subtyp
VIII D1 B2	IgG _{2b}
VIII D1 C2	IgG ₁
VIII D1 C3	IgG _{2b}
VIII D1 D8	IgG ₁
VIII D1 E4	IgM
VIII D1 E5	IgG₁
VIII D1 F7	IgG _{2b}

Tab. 3: Subtypen der von den ausgewählten Hybridomen produzierten Antikörper

5.3.3 Aufreinigung monoklonaler Antikörper im ELISA

Die Aufreinigung des Subklons VIII D1 E5 erfolgte mittels Affinitätschromatographie über thiophile Adsorption (s. 4.3.6). Es wurden 100 ml Kulturüberstand eingesetzt und 15 Fraktionen mit einem jeweiligen Volumen von 0,75 ml eluiert. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde über die OD₂₈₀ bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 30 dargestellt:

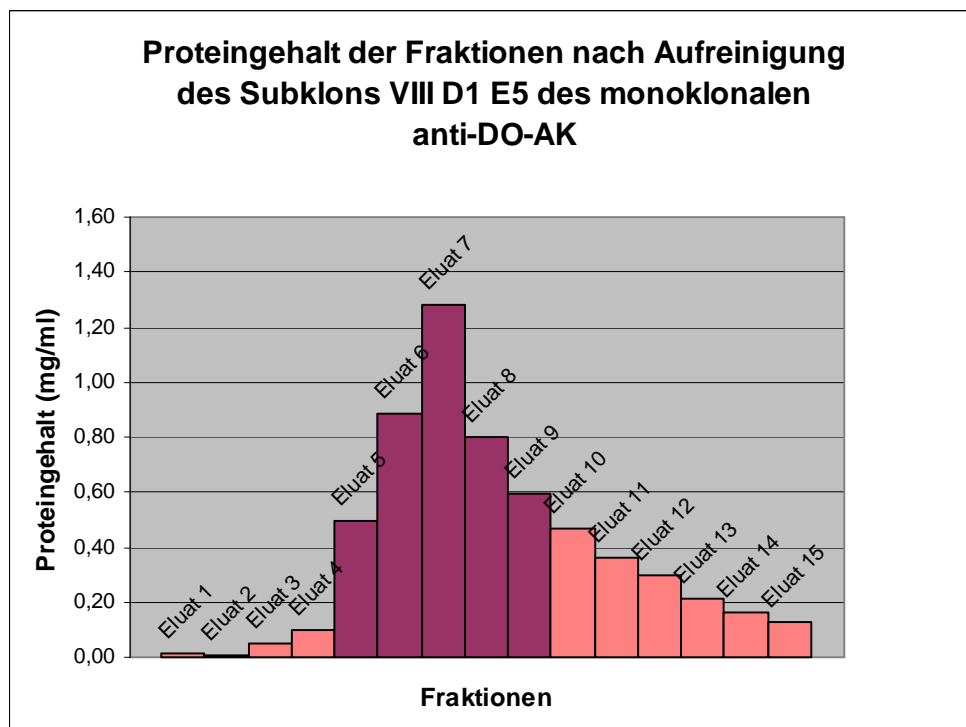


Abb. 30: Proteingehalt der Fraktionen nach Aufreinigung des Subklons VIII D1 E5 des monoklonalen anti-DO-AK

Die Fraktionen mit den höchsten Proteingehalten 6,7 und 8 bzw. 5 und 9 wurden zu Pool 1 bzw. Pool 2 zusammengefasst. Diese Pools wurden im ELISA gemäß 4.2.2 im Vergleich zum nicht aufgereinigten Kulturüberstand getestet. Hierfür wurden 0,02 µg DO/*well* immobilisiert und mit den Verdünnungen der Pools 1 und 2 bzw. des Kulturüberstand vor Aufreinigung inkubiert. Nach der Inkubation mit HRP-gekoppeltem anti-mouse-AK in der Verdünnung 1:5000 in 0,3% BSA/PBS erfolgte die Detektion mit TMB. Das Ergebnis ist in Abb. 31 zu sehen.

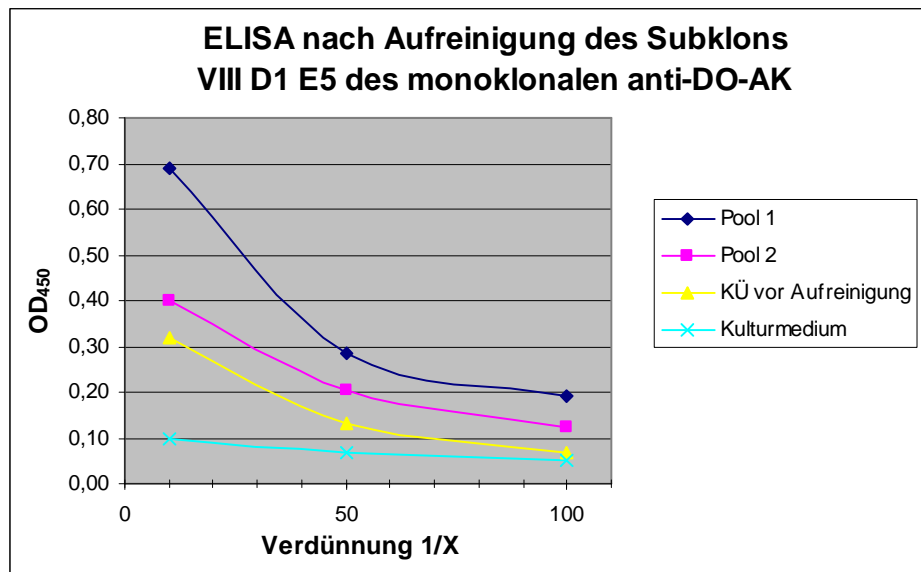


Abb. 31: ELISA nach Aufreinigung des Subklons VIII D1 E5 des monoklonalen anti-DO-AK

In Abb. 31 ist zu erkennen, dass die Signale der zum Pool 1 vereinigten Eluate sehr viel höher liegen als die des nicht aufgereinigten Kulturüberstandes. Auch die des Pools 2 sind noch deutlich höher als jene des nicht aufgereinigten Kulturüberstandes. Die monoklonalen Antikörper scheinen im Zuge der Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie über thiophile Adsorption erheblich konzentriert zu werden.

5.4 Assay zur Detektion von Domoinsäure

5.4.1 Assay zur Detektion von Domoinsäure mit OVA-DO

5.4.1.1 Kompetitions-ELISA mit OVA-DO

Gemäß 4.4.1.1 wurden 87 pmol OVA-DO pro well in einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach einem Blockierungsschritt erfolgte die anti-DO-AK-Inkubation gemeinsam mit variablen Konzentrationen an freier OVA-DO. Diese Konzentrationen sind in Abb. 32 auf der Abszisse dargestellt.

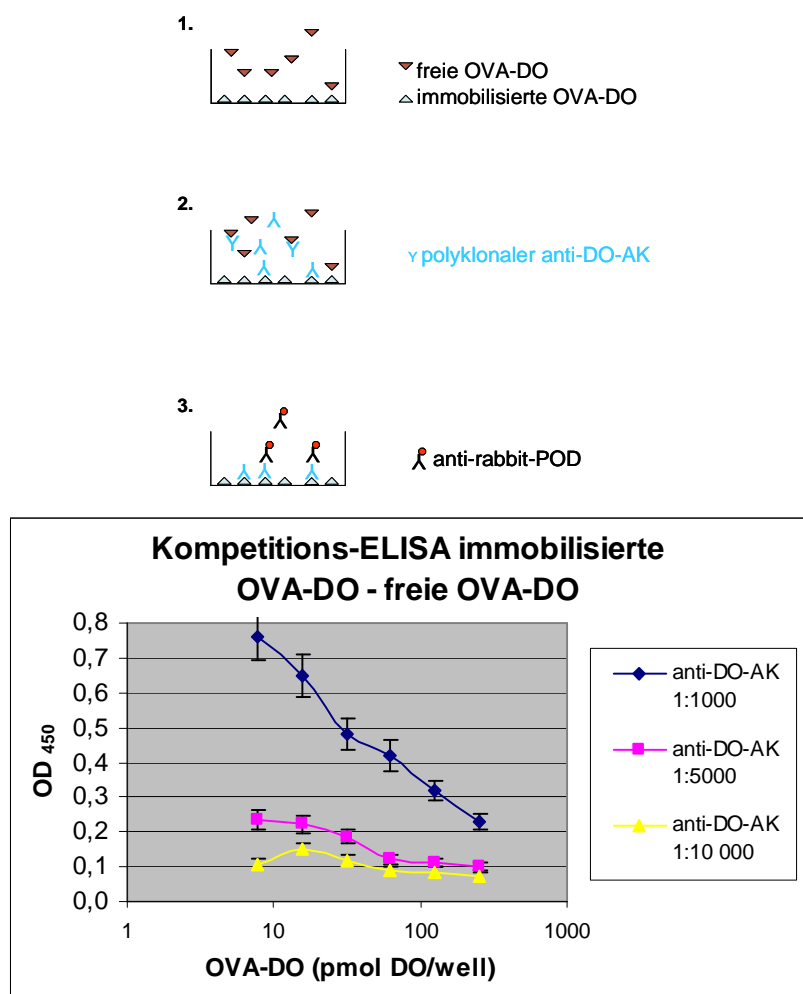


Abb. 32: Kompetitions-ELISA mit OVA-DO

Zumindest bei einer AK-Verdünnung von 1:1000 ist deutlich erkennbar, dass die OD_{450} mit zunehmender Konzentration an freier OVA-DO sinkt. Dies erklärt sich

folgendermaßen: Je mehr freie OVA-DO zugegeben wird, desto mehr anti-DO-AK bindet an diese freie DO und steht folglich nicht mehr der immobilisierten OVA-DO in der Platte zur Verfügung. Durch die Waschschrirte werden die Antikörper, die nicht an immobilisierte OVA-DO gebunden haben, aus der Platte entfernt und somit auch nicht von nachfolgendem Sekundärantikörper bzw. TMB detektiert- die Signalstärke nimmt ab. Weiterhin ist aus Abb. 32 ersichtlich, dass die anti-DO-AK-Verdünnungen 1:5000 und 1:10000 nicht ausreichen, um das beschriebene Verhalten ebenso deutlich zu machen.

5.4.1.2 Sandwich-ELISA mit OVA-DO

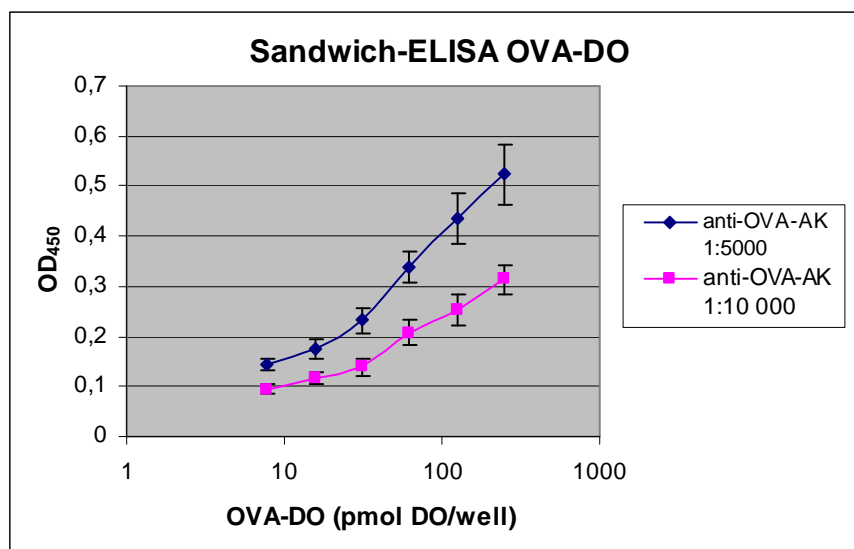
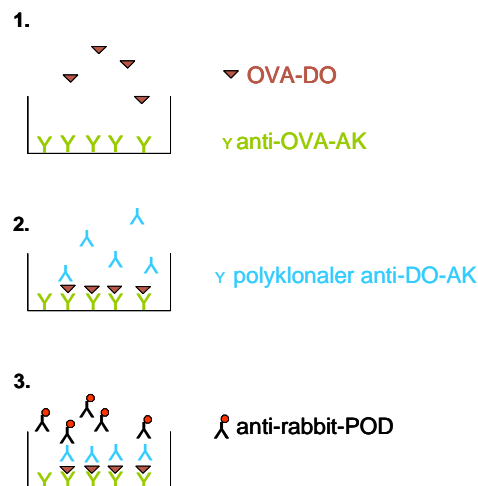


Abb. 33: Sandwich-ELISA mit OVA-DO

Wie unter 4.4.1.2 beschrieben, wurde eine Mikrotiterplatte zunächst mit anti-OVA-AK in den Verdünnungen 1:5000 bzw. 1:10000 beschichtet und nach einem Blockierungsschritt mit verschiedenen Konzentrationen an OVA-DO inkubiert. Diese Konzentrationen sind auf der Abszisse in Abb. 33 aufgeführt. Es folgte ein Inkubationsschritt mit anti-DO-AK 387 in der Verdünnung 1:1000 sowie dessen Detektion mit HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper und TMB.

Es ist deutlich zu erkennen, dass mit steigender OVA-DO-Konzentration die OD_{450} steigt: Bindet mehr OVA-DO an den immobilisierten Antikörper, hier anti-OVA-AK, so kann auch mehr anti-DO-AK an das Antigen binden und folglich vom Sekundärantikörper detektiert werden.

5.4.1.3 Kompetitiver Sandwich-ELISA mit OVA-DO

Wie unter 4.4.1.3 beschrieben, wurde obiger Sandwich-ELISA um ein kompetitives Element, in diesem Fall Trypsin-Inhibitor-DO, erweitert. Hierfür wurde zunächst der anti-OVA-AK in einer Verdünnung von 1:5000 auf der Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach einem Blockierungsschritt wurde OVA-DO in verschiedenen Konzentrationen, der Abszisse in Abb. 34 zu entnehmen sind inkubiert. Daraufhin wurde der anti-DO-AK in einer Verdünnung von 1:1000 gemeinsam mit verschiedenen Konzentrationen an Trypsin-Inhibitor-DO zugefügt. Die Trypsin-Inhibitor-DO-Konzentrationen wurden jeweils doppelt so hoch wie die bereits in den *wells* befindlichen OVA-DO-Konzentrationen gewählt. Nach einem Waschschrift wurde gebundener anti-DO-AK über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert.

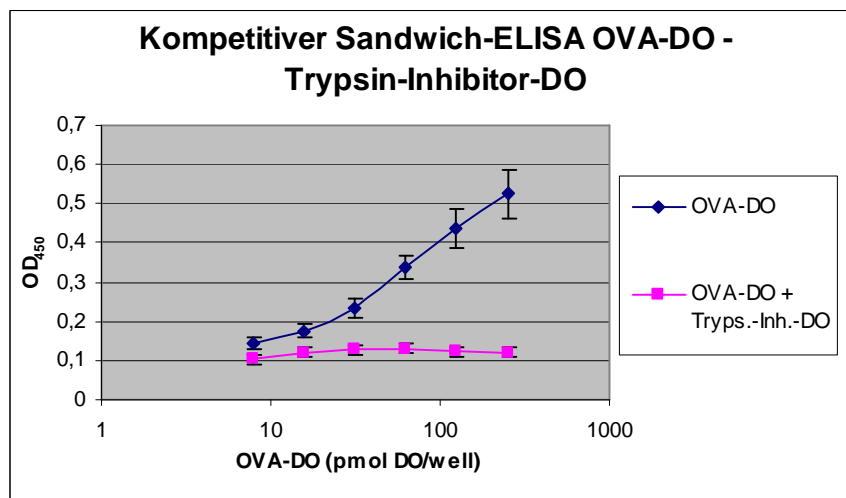
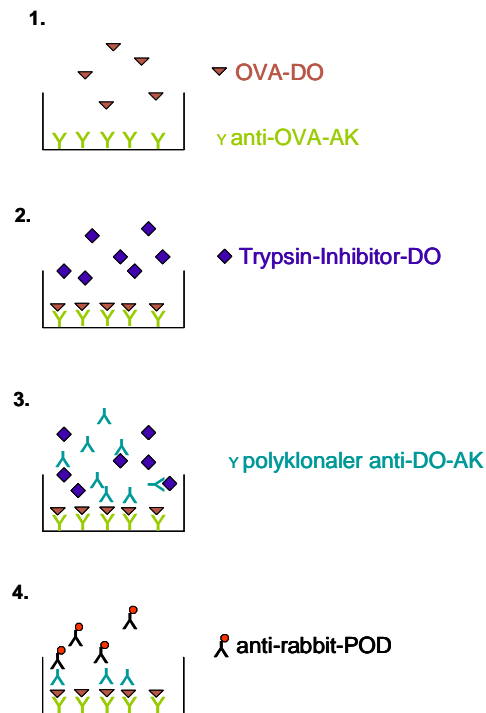


Abb. 34: Kompetitiver Sandwich-ELISA mit OVA-DO

Wie bereits unter 5.4.1.2 beschrieben, steigt das Signal mit zunehmender OVA-DO-Konzentration, sofern kein Kompetitor anwesend ist (blaue Kurve in Abb. 34). Wird jedoch die (gegenüber OVA-DO) doppelte Menge an Trypsin-Inhibitor-DO als Kompetitor zugegeben, sinkt die OD₄₅₀ auf ein Minimum - unabhängig

davon, wie viel OVA-DO sich auf der Platte befindet (rosa Kurve in Abb. 34). Ähnlich wie in unter 5.4.1.1 lässt sich dies damit erklären, dass Großteile des anti-DO-AK an die freie Trypsin-Inhibitor-DO binden und somit der immobilisierten OVA-DO nicht zur Verfügung stehen. Durch die Waschschriffe werden die Antikörper, die nicht an die immobilisierte OVA-DO gebunden haben, aus der Platte entfernt und somit auch nicht von nachfolgendem Sekundärantikörper bzw. TMB detektiert- das Signal sinkt.

5.4.1.4 Filtrationsplatten-ELISA mit OVA-DO

Gemäß 4.4.1.4 wurden 2,5 pmol anti-DO-AK auf der Membran einer Filtrationsplatte und anti-OVA-AK in einer Mikrotiterplatte immobilisiert. 300 pmol OVA-DO wurden gemeinsam mit variablen Konzentrationen an Trypsin-Inhibitor-DO in den *wells* der Filtrationsplatte inkubiert, letztere sind auf der Abszisse in Abb. 35 aufgeführt. Anschließend wurde die Antigenlösung in die mit anti-OVA-AK beschichtete Mikrotiterplatte gesaugt. Im Anschluss wurde diese Platte analog zu den vorhergehenden ELISAs entwickelt.

Parallel wurde der gleiche Versuch mit unkonjugierter Domoinsäure und mit einem mit Domoinsäure angereicherten Proteinextrakt von *Mytilus edulis* durchgeführt. Die freie Domoinsäure bzw. der angereicherte Extrakt sollten hier die Kompetitoren (anstelle der vorher eingesetzten Trypsin-Inhibitor-DO) darstellen. Die Ergebnisse sind in Abb. 35 dargestellt.

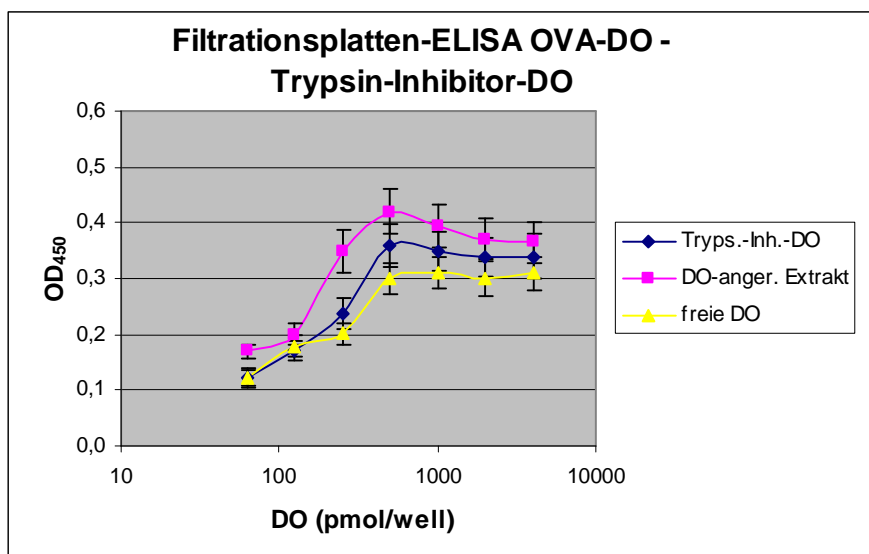
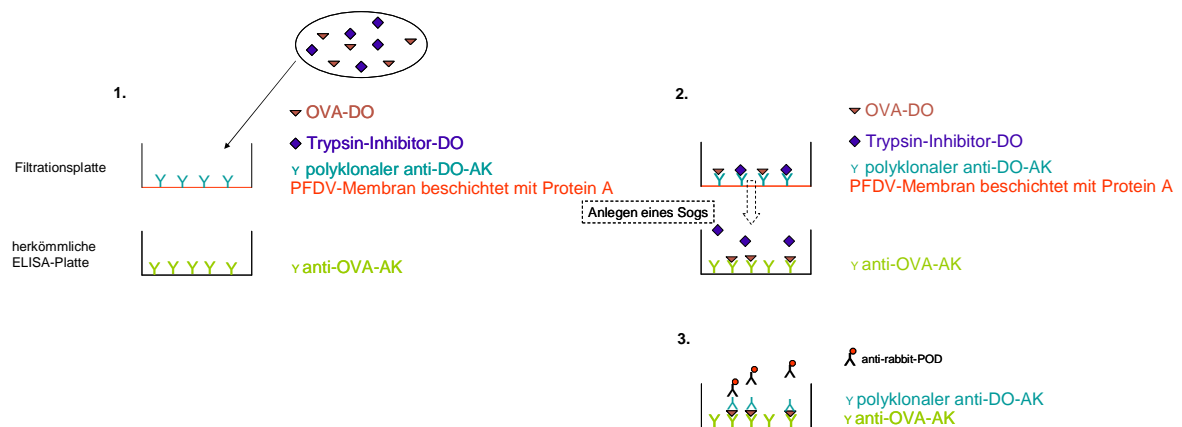


Abb. 35: Filtrationsplatten-ELISA mit OVA-DO

In Abb. 35 ist deutlich erkennbar, dass die OD_{450} mit steigender Kompetitor-Konzentration zunimmt. Dies gilt bis zu einer Konzentration von 500 pmol DO/well, bei höheren Konzentrationen sinkt das Signal leicht ab und bildet im weiteren Verlauf ein Plateau. Erklärbar ist dieser Sachverhalt folgendermaßen: Je mehr Domoinsäure (ob frei, an Trypsin-Inhibitor konjugiert oder möglicherweise an Proteine im Extrakt adsorbiert) mit den 300 pmol OVA-DO in der Filtrationsplatte um den immobilisierten anti-DO-AK kompetitiert, desto weniger OVA-DO kann in der Filtrationsplatte binden. Folglich wird umso mehr OVA-DO in die Mikrotiterplatte gesaugt. Dort bindet OVA-DO an den immobilisierten anti-OVA-AK und wird von anti-DO-AK und HRP-gekoppeltem

Sekundärantikörper detektiert. Bei steigender Kompetitor-Konzentration kann also weniger OVA-DO in der Filtrationsplatte binden, dafür aber ein höheres Signal in der Mikrotiterplatte generieren.

Ist jedoch die Bindungskapazität des in der Filtrationsplatte immobilisierten anti-DO-AK ab einer bestimmten Antigenkonzentration (hier 500 pmol/well) ausgelastet, so können keine weiteren OVA-DO-Moleküle von der Bindung am anti-DO-AK abgehalten und durch die Platte gesaugt werden. Die OD₄₅₀ bleibt daher annähernd gleich hoch.

Weiterhin ist zu bemerken, dass die Signale bei Kompetition durch DO-angereicherten Proteinextrakt durchgängig höher sind als bei Kompetition durch Trypsin-Inhibitor-DO oder reine Domoinsäurelösung. Da die DO-Konzentration rechnerisch in beiden Fällen gleich hoch ist, liegt die Vermutung nahe, dass der angereicherte Extrakt ein größeres Potential zur Kompetition besitzt als Trypsin-Inhibitor-DO bzw. die Domoinsäure alleine.

Der gleiche Versuchsaufbau wurde wiederholt, wobei Extrakte künstlich kontaminierter Individuen von *Mytilus galloprovincialis* (s. 4.4.4) zum Einsatz kamen. Für die verschiedenen DO-Konzentrationen wurden die von kontaminierten Muscheln stammenden Extrakte 1a, 1b, 2a und 2b (Erläuterungen s. Abb. 36) mit den von der nicht kontaminierten Muschel stammenden Extrakten 3a und 3b verdünnt. So wurde gewährleistet, dass die Zusammensetzung der Proben innerhalb einer Verdünnungsreihe die gleiche blieb und Veränderungen in den resultierenden Signalen lediglich auf variierende DO-Konzentrationen zurückzuführen waren. Die Extraktverdünnungen wurden gemeinsam mit jeweils 300 pmol OVA-DO/well in der Filtrationsplatte inkubiert und anschließend in die mit anti-OVA-AK beschichtete Mikrotiterplatte gesaugt. Die Platte wurde analog zu den vorhergehenden ELISAs entwickelt. Das Ergebnis ist in Abb. 36 dargestellt.

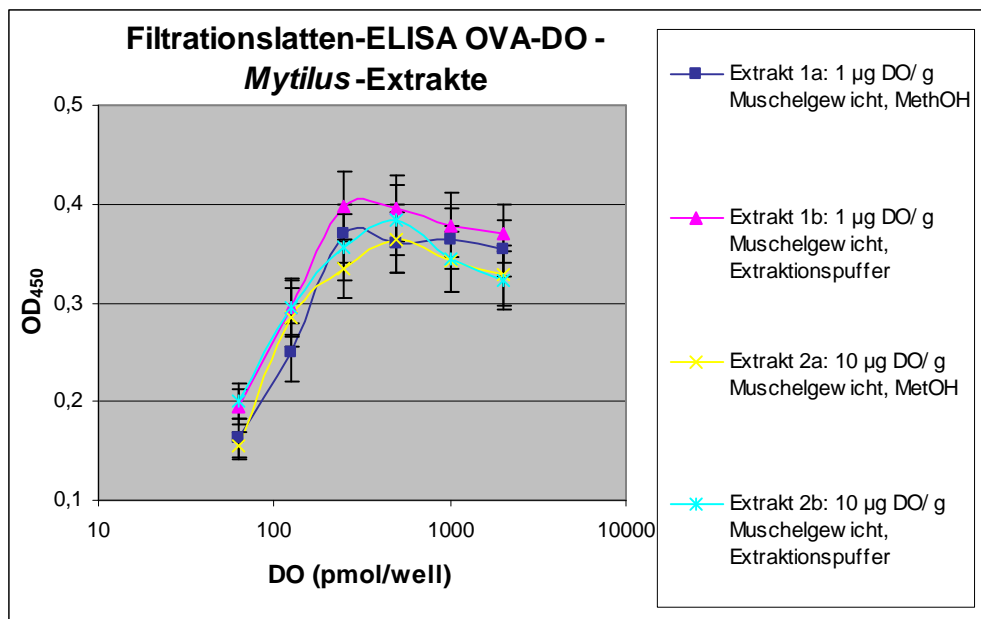


Abb. 36: Filtrationsplatten-ELISA mit OVA-DO und verschiedenen Extrakten

Ähnlich wie in zuletzt beschriebenem ELISA ist in Abb. 36 zu erkennen, dass die OD_{450} mit steigender Kompetitor-Konzentration zunimmt. Dies gilt wiederum nur bis zu einer DO-Konzentration von 250- 500 pmol/well; bei höher liegenden Konzentrationen sinkt das Signal leicht ab und bildet im weiteren Verlauf ein Plateau: Je mehr Domoinsäure mit den 300 pmol OVA-DO in der Filtrationsplatte um den immobilisierten anti-DO-AK kompetitiert, desto weniger OVA-DO kann in der Filtrationsplatte binden. Folglich wird umso mehr OVA-DO in die Mikrotiterplatte gesaugt. Dort bindet OVA-DO an den immobilisierten anti-OVA-AK und wird von anti-DO-AK und HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper detektiert. Ist jedoch die Bindungskapazität des in der Filtrationsplatte immobilisierten anti-DO-AK ab einer bestimmten Antigenkonzentration (hier 250- 500 pmol/well) ausgelastet, so können keine weiteren OVA-DO-Moleküle von der Bindung am anti-DO-AK abgehalten und durch die Platte gesaugt werden. Die OD_{450} bleibt daher annähernd gleich hoch.

Wie der Legende in Abb. 36 zu entnehmen ist, handelt es sich bei den Extrakten 1a und 1b um jene, die aus Muschel Nr.1 gewonnen wurden, die mit 1 µg DO/ g Gesamtgewicht kontaminiert wurde. Extrakt 1a ist hierbei der methanolhaltige

Auszug (50% Methanol, 50% H₂O), Extrakt 1b liegt ein wässriger Proteinextraktionspuffer (s. 3.1.5) zugrunde. Analoges gilt für die Extrakte 2a und 2b, wobei Muschel Nr.2 mit 10 µg DO/ g Gesamtgewicht kontaminiert wurde. Die aus Extrakt 1b resultierenden Signale sind durchgängig geringfügig höher als die aus Extrakt 1a hervorgehenden. Möglicherweise besitzt der wässrige Extrakt gegenüber dem methanolischen ein leicht erhöhtes Potential zur Competition. Im Prinzip unterstützen die Ergebnisse der Extrakte 2a und 2b diese These, jedoch sind Unterschiede zwischen den Kurven hierbei nahezu verschwindend gering.

5.4.2 Assay zur Detektion von Domoinsäure mit Biotin-DO

5.4.2.1 Schicht-ELISA mit Biotin-DO

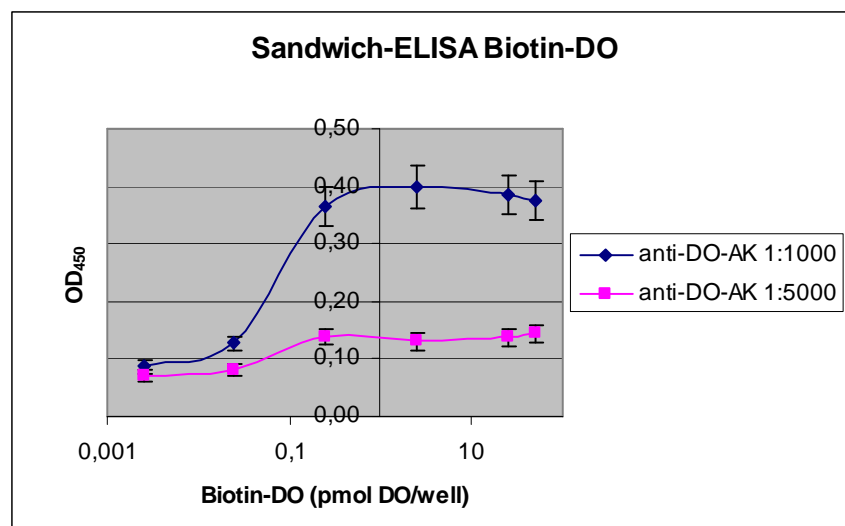
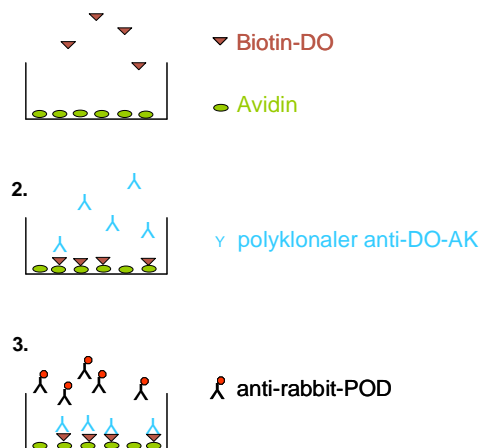


Abb. 37: Schicht-ELISA mit Biotin-DO

In Abb. 37 ist das Ergebnis des Schicht-ELISAs mit Biotin-DO zu sehen. Zunächst wurden pro well 12,5 pmol Avidin immobilisiert; nach einem Blockierungsschritt wurden 0-50 pmol Biotin-DO/well inkubiert. Daraufhin wurde der polyklonale anti-DO-AK parallel in zwei verschiedenen Verdünnungen (1:1000 und 1:5000) inkubiert und mit einem HRP-gekoppelten anti-rabbit-AK in der Verdünnung 1:10000 und löslichem TMB detektiert.

Aus Abb. 37 ist deutlich ersichtlich, dass das Schicht-System, ähnlich einem Sandwich-ELISA, auch mit Avidin, Biotin-DO und anti-DO-AK funktioniert: Zumindest bis zu einer Konzentration von 2,5 pmol DO/well nimmt mit steigender Konzentration die OD_{450} zu. Je mehr immobilisierte DO sich in einem well befindet, desto mehr Primärantikörper und somit auch mehr Sekundärantikörper kann binden. Folglich kann die an letzteren gekoppelte HRP mehr TMB umsetzen. Die Absorptionen der Negativkontrollen (Avidin bzw. Avidin-Biotin) hingegen sind minimal. Die größte Absorptionsdifferenz besteht zwischen 2,5 pmol Biotin-DO/well und 0,25 pmol Biotin-DO/well, weshalb der Bereich oberhalb 0,25 pmol/well in späteren Versuchsaufbauten gewählt wurde. Darüber hinaus ist erkennbar, dass eine Verdünnung des anti-DO-AKs 387 von 1:5000 nicht ausreichend ist, um die genannten Verhältnisse deutlich sichtbar zu machen. Daher wurde im Folgenden stets eine AK-Verdünnung von 1:1000 gewählt.

5.4.2.2 Filtrationsplatten-ELISA mit Biotin-DO

Wie unter 4.4.2 beschrieben, wurde der Filtrationsplatten-ELISA auch mit Biotin-DO als die zu messende Größe durchgeführt.

Hierfür wurden wie unter 4.4.1.4 beschrieben 2,5 pmol anti-DO-AK auf der PVDF-Membran der Filtrationsplatten immobilisiert; die Mikrotiterplatte wurde mit 25 pmol Avidin pro well beschichtet. Als später zu messende Größe wurden 0,5 pmol Biotin-DO und als Kompetitor jeweils 0-1 nmol OVA-DO, freie DO und mit DO angereicherter Extrakt von *Mytilus edulis* in verschiedenen Verdünnungen inkubiert und anschließend durch die Filtrationsplatte in die Mikrotiterplatte gesaugt. Ansonsten entsprach die Vorgehensweise der unter 4.4.1.4 genannten.

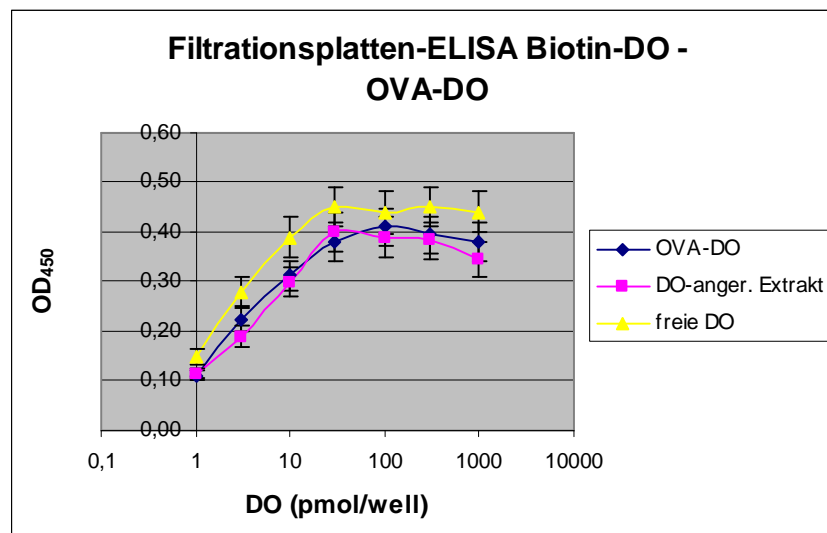
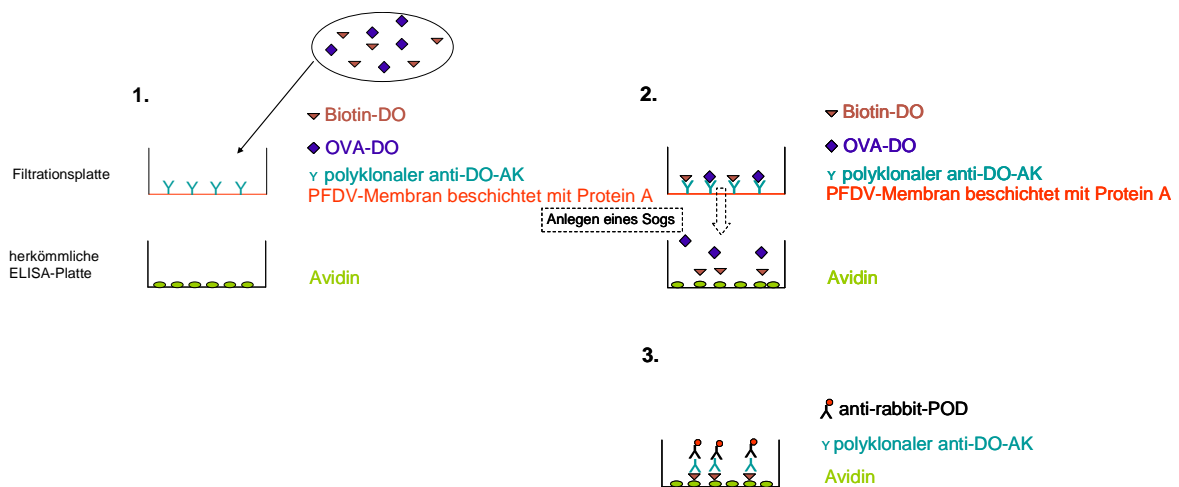


Abb. 38: Filtrationsplatten-ELISA mit Biotin-DO

Ähnlich wie unter 5.4.1.4 beschrieben, ist auch in Abb. 38 zu erkennen, dass die OD_{450} mit zunehmender Kompetitor-Konzentration steigt. Dies gilt in diesem Fall bis zu einer Konzentration von 30-100 pmol DO/well. Bei höheren Konzentrationen bildet das Signal ein Plateau. Erklärbar ist dieser Sachverhalt folgendermaßen: Je mehr Domoinsäure (ob frei, an OVA-DO konjugiert oder möglicherweise an Proteine im Extrakt adsorbiert) mit den 0,5 pmol Biotin-DO in der Filtrationsplatte um den immobilisierten anti-DO-AK kompetitiert, desto weniger Biotin-DO kann in der Filtrationsplatte binden. Folglich wird umso mehr

Biotin-DO in die Mikrotiterplatte gesaugt. Dort bindet sie an das immobilisierte Avidin und wird von anti-DO-AK und HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper detektiert. Bei steigender Kompetitor-Konzentration kann also weniger Biotin-DO in der Filtrationsplatte binden, dafür aber ein höheres Signal in der Mikrotiterplatte generieren.

Ist jedoch die Bindungskapazität des in der Filtrationsplatte immobilisierten anti-DO-AK ab einer bestimmten Antigenkonzentration (hier 30- 100 pmol/well) ausgelastet, so können keine weiteren Biotin-DO-Moleküle von der Bindung am anti-DO-AK abgehalten und durch die Platte gesaugt werden. Die OD_{450} bleibt daher annähernd gleich hoch.

Weiterhin ist zu beobachten, dass die Kurve der freien Domoinsäure insgesamt höher liegt als die des DO-angereicherten Extrakts und der OVA-DO. Möglicherweise besitzt die reine Domoinsäure gegenüber der Biotin-DO ein höheres Kompetitionspotential als die beiden letztgenannten.

Der gleiche Versuchsaufbau wurde wiederholt, wobei Extrakte künstlich kontaminierter Individuen von *Mytilus galloprovincialis* (s. 4.4.4) zum Einsatz kamen. Für die verschiedenen DO-Konzentrationen wurden die von kontaminierten Muscheln stammenden Extrakte 1a, 1b, 2a und 2b mit den von der nicht kontaminierten Muschel stammenden Extrakten 3a und 3b verdünnt. So wurde gewährleistet, dass die Zusammensetzung der Proben innerhalb einer Verdünnungsreihe die gleiche blieb und Veränderungen in den resultierenden Signalen lediglich auf variierende DO-Konzentrationen zurückzuführen waren. Die Extraktverdünnungen wurden gemeinsam mit jeweils 0,5 pmol Biotin-DO/well in der Filtrationsplatte inkubiert und anschließend in die mit Avidin beschichtete Mikrotiterplatte gesaugt. Die Platte wurde analog zu den vorhergehenden ELISAs entwickelt. Das Ergebnis ist in Abb. 39 dargestellt

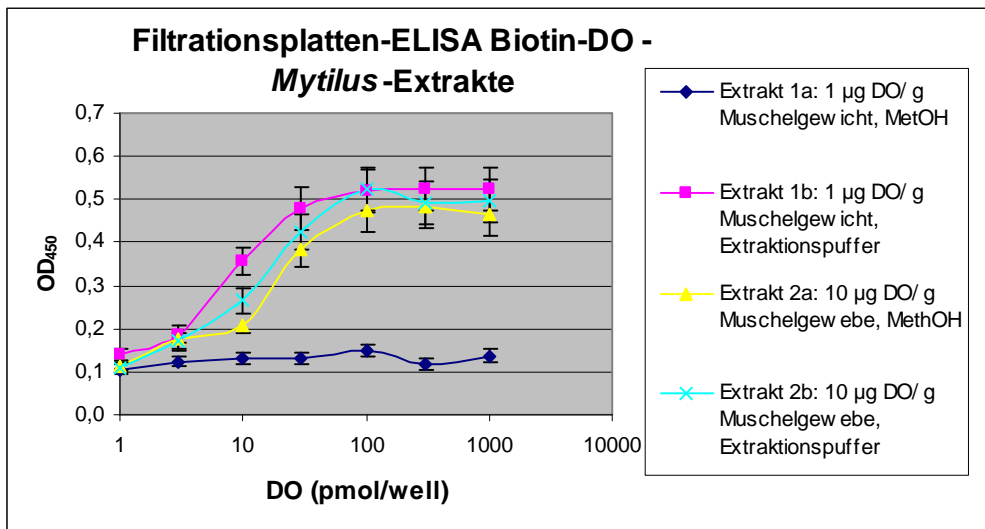


Abb. 39: Filtrationsplatten-ELISA mit Biotin-DO und verschiedenen Extrakten

Ähnlich wie in vorhergehend beschriebenem ELISA ist in Abb. 39 zu erkennen, dass die OD_{450} mit steigender Kompetitor-Konzentration zunimmt. Dies gilt bis zu einer DO-Konzentration von 100 pmol/well; bei höher liegenden Konzentrationen bilden die Signale im weiteren Verlauf ein Plateau: Je mehr Domoinsäure mit den 0,5 pmol Biotin-DO in der Filtrationsplatte um den immobilisierten anti-DO-AK kompetitiert, desto weniger Biotin-DO kann in der Filtrationsplatte binden. Folglich wird umso mehr Biotin-DO in die Mikrotiterplatte gesaugt. Dort bindet sie an das immobilisierte Avidin und wird von anti-DO-AK und HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper detektiert. Ist jedoch die Bindungskapazität des in der Filtrationsplatte immobilisierten anti-DO-AK ab einer bestimmten Antigenkonzentration (hier 100 pmol/well) ausgelastet, so können keine weiteren Biotin-DO-Moleküle von der Bindung am anti-DO-AK abgehalten und durch die Platte gesaugt werden. Die OD_{450} bleibt daher annähernd gleich hoch. Eine Ausnahme zu beschriebenem Sachverhalt bildet die aus Extrakt 1a hervorgehende Kurve.

Wie der Legende in Abb. 39 zu entnehmen ist, handelt es sich bei den Extrakten 1a und 1b um jene, die aus Muschel Nr.1 gewonnen wurden, die mit 1 µg DO/ g Gesamtgewicht kontaminiert wurde. Extrakt 1a ist hierbei der methanolhaltige Auszug (50% Methanol, 50% H_2O), Extrakt 1b liegt ein wässriger

Proteinextraktionspuffer (s. 3.1.5) zugrunde. Analoges gilt für die Extrakte 2a und 2b, wobei Muschel Nr.2 mit 10 µg DO/ g Gesamtgewicht kontaminiert wurde. Die aus Extrakt 1a hervorgehenden Signale sind annähernd gleich hoch, unabhängig von der DO-Konzentration des Extrakts. Da für die Verdünnungen der Methanolanteil konstant bei 9% gehalten wurde, liegt der Schluss nahe, dass dieser Methanolanteil für das gewählte Testsystem mit Biotin-DO zu hoch ist (s. auch 5.4.3).

Die Verdünnungen von Extrakt 2a hingegen beinhalten jeweils 0,9% Methanol. Auch diese Konzentration scheint das Testsystem zu beeinflussen, da die zugehörige Kurve unterhalb der aus den beiden wässrigen Extrakten 1b und 2b hervorgehenden Kurven liegt. Allerdings zeigt diese Kurve in sich den obig beschriebenen typischen Verlauf.

5.4.2.3 Kontrollreaktion zur Competition in Filtrationsplatte

Um eindeutig nachzuweisen, dass der anti-DO-AK auf der Membran der Filtrationsplatte immobilisiert wurde sowie eine Competition zwischen den verschiedenen DO-Konjugaten (bzw. *Mytilus*-Extrakten) stattgefunden hat, wurde nach Durchsaugen der Lösungen in die Mikrotiterplatte eine Kontrollreaktion durchgeführt. Hierzu wurde die Filtrationsplatte mit PBST gespült und 1 h bei RT mit einem an HRP konjugiertes Avidin (s. 3.1.3) in der Verdünnung 1:2000 in 0,3% BSA/PBS inkubiert und anschließend mit präzipitierendem TMB entwickelt. Das Ergebnis ist in Abb. 40 zu sehen; es zeigt die zu den Ergebnissen in Abb. 38 (5.4.2.2) gehörende Filtrationsplatte.

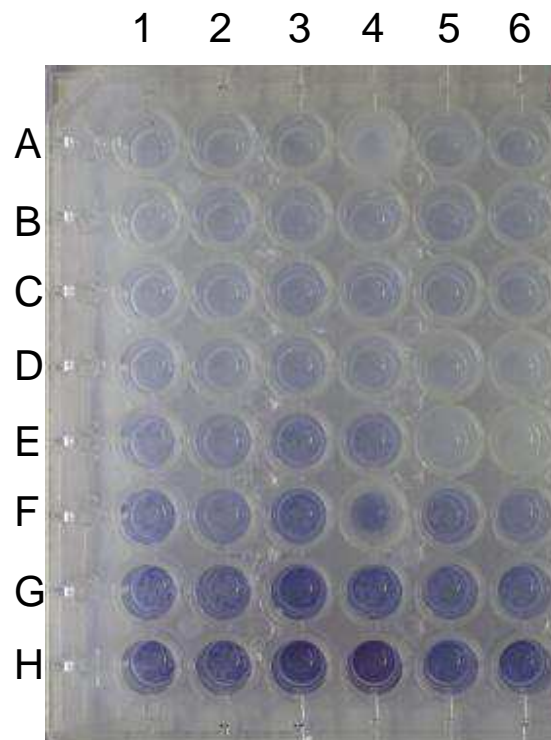


Abb. 40: Kontrollreaktion zur Konkurrenz in Filtrationsplatte

Die Intensität der Membranfärbung in den *wells* in Abb. 40 scheint mit der Menge gebundener Biotin-DO zu korrelieren. In den Reihen 1-6 wurden 0,5 pmol Biotin-DO und (von unten nach oben) 0- 1 nmol kompetitierende DO inkubiert, wobei es sich in den Reihen 1 und 2 um OVA-DO, in den Reihen 3 und 4 um DO-angereicherten Extrakt und in den Reihen 5 und 6 um freie DO handelte (s. 5.4.2.2). Allgemein lässt sich feststellen, dass die Färbung von oben nach unten intensiver wird- also mit abnehmender Konkretorkonzentration. Je weniger kompetitierende DO zugegen ist, desto mehr Biotin-DO bindet an den auf der Membran der Filtrationsplatte immobilisierten anti-DO-AK und von wird HRP-gekoppeltem Avidin detektiert. Eine Ausnahme bilden die *wells* E5 und E6, in denen 30 pmol freie DO inkubiert wurden und in welchen die schwächste Färbung erkennbar ist. Dies wiederum korreliert mit der höchsten OD_{450} nach Durchsaugen in die Filtrationsplatte (s. Abb. 38, 5.4.2.2).

5.4.3 Testen der Methanolkompatibilität

5.4.3.1 Methanolkompatibilität der Antigen-Antikörper-Reaktion

Um die Methanolkompatibilität der Antigen-Antikörper-Reaktion im Allgemeinen zu untersuchen, wurde ein herkömmlicher ELISA (s. 4.2.2) unter Verwendung unterschiedlicher Methanolkonzentrationen während der Antikörperinkubation durchgeführt. Parallel hierzu wurde nach Bindung der Antikörper an die immobilisierte OVA-DO eine „Nachinkubation“ mit verschiedenen Methanolkonzentrationen durchgeführt und der ELISA dann wie üblich entwickelt.

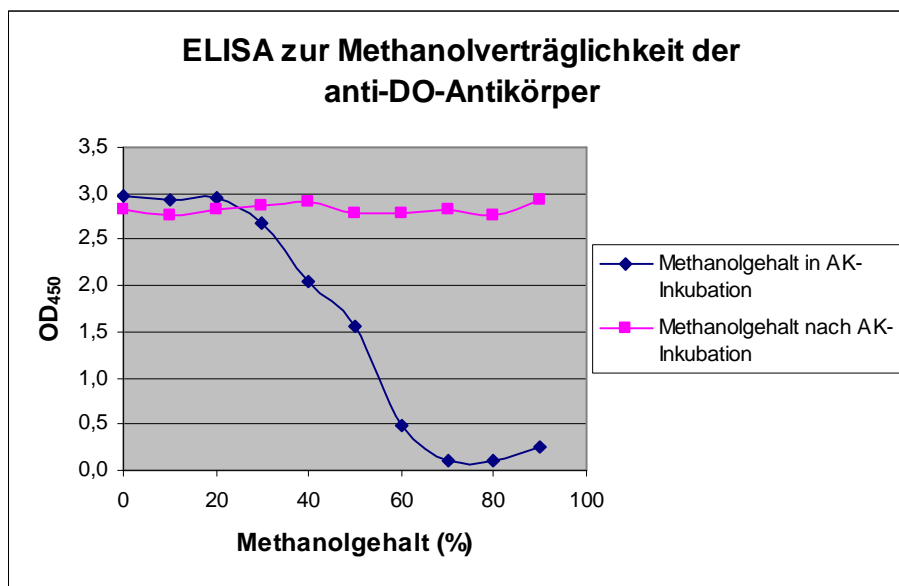


Abb. 41: ELISA zur Methanolverträglichkeit der anti-DO-Antikörper

In Abb. 41 bzw. ist deutlich zu erkennen, dass eine nachträgliche Methanolinkubation keinen Einfluss auf eine bereits entstandene Antigen-Antikörper-Bindung zu haben scheint: Unabhängig vom Methanolgehalt bleibt die OD₄₅₀ annähernd gleich hoch.

Ist hingegen Methanol während der Antikörperinkubation anwesend, sinkt das Signal ab einem Methanolgehalt von 30%. Methanol scheint also den Prozess der Bindung zwischen Antigen und Antikörper zu stören, ist aber offensichtlich nicht in der Lage, eine bereits erfolgte Bindung zu zerstören.

5.4.3.2 Methanolkompatibilität des Detektionsassays

Um die Komponenten des Kompetitions-ELISA in der Filtrationsplatte insgesamt auf Methanolverträglichkeit zu testen, wurden unter 4.4.1.4 und 4.4.2.2 beschriebene Versuche durchgeführt. Hierbei erfolgte die Antigen-Inkubation in 1%, 5% bzw. 10% Methanol/PBS.

Im ersten Versuch wurden 0,5 pmol Biotin-DO mit 0-300 pmol OVA-DO in der Filtrationsplatte inkubiert und in die mit Avidin beschichtete Mikrotiterplatte gesaugt. Das Ergebnis ist in Abb. 42 dargestellt.

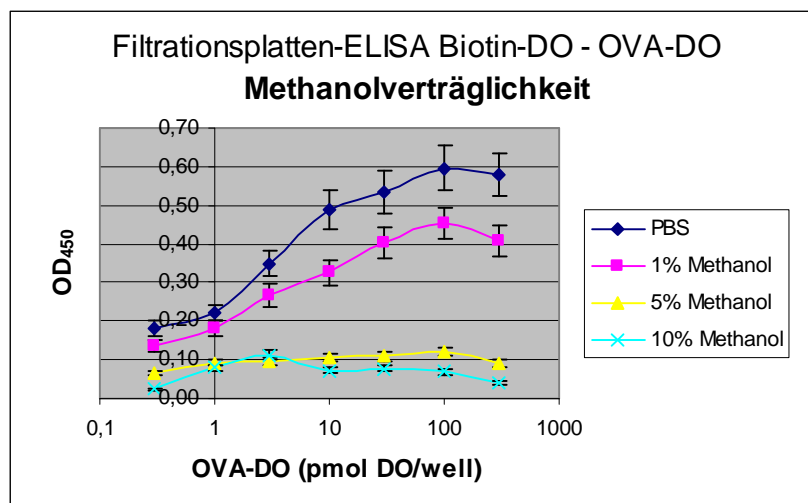
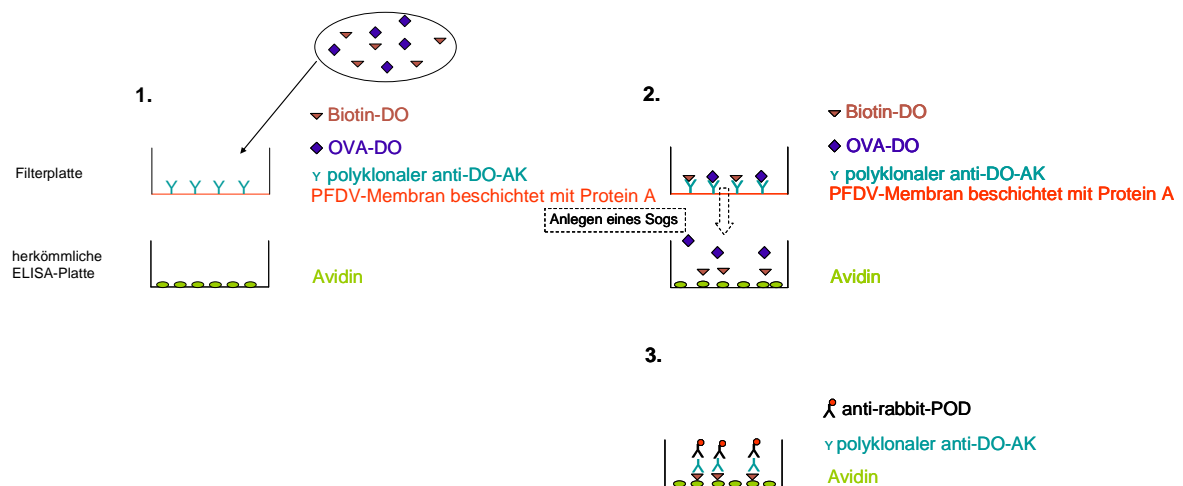


Abb. 42: Filtrationsplatten-ELISA mit Biotin-DO zur Überprüfung der Methanolverträglichkeit

In Abb. 42 sind die OD_{450} bei verschiedenen OVA-DO-Konzentrationen unter Verwendung unterschiedlicher Methanolkonzentrationen dargestellt. Zu erkennen ist zum einen, dass die Kurven als Gesamte mit steigender Methanolkonzentration niedrigere OD-Werte zeigen und abflachen. Ferner ist bei einem Methanolgehalt von 1% noch der typische Kurvenverlauf (steigendes Signal mit zunehmender Kompetitor-Konzentration, s. 5.4.1.4 und 5.4.2.2) deutlich erkennbar. Bei einem Methanolgehalt von 5% bzw. 10% hingegen nehmen die OD_{450} mit steigender OVA-DO-Konzentration nur geringfügig zu. Obwohl die Intensität der OD_{450} beeinträchtigt wird, lässt sich der Versuch auch mit 1%igen Methanolgehalt während der Antigen-Inkubation durchführen, nicht jedoch unter Verwendung von 5% Methanol oder mehr.

In einem zweiten Versuch wurden 300 pmol OVA-DO mit 0- 2 nmol Trypsin-Inhibitor-DO in der Filtrationsplatte inkubiert (in 1%, 5% bzw. 10% Methanol/PBS) und in die mit anti-OVA-AK beschichtete Mikrotiterplatte gesaugt. In Abb. 43 sind die OD_{450} bei verschiedenen Trypsin-Inhibitor-DO-Konzentrationen unter Verwendung unterschiedlicher Methanolkonzentrationen dargestellt. Zu erkennen ist, dass die Kurven als Gesamte mit steigender Methanolkonzentration niedrigere OD-Werte zeigen. Im Unterschied zum analogen Versuch mit Biotin-DO (s. Abb. 42) bleibt hierbei jedoch der typische Kurvenverlauf (steigendes Signal mit zunehmender Kompetitor-Konzentration, s. 5.4.1.4 und 5.4.2.2) annähernd erhalten- das Signal steigt bei einem Methanolanteil von 5% oder 10% allerdings erst bei höheren Trypsin-Inhibitor-DO-Konzentrationen als bei Verwendung von reinem PBS oder auch 1% Methanol zur Antigeninkubation. Obwohl die Intensität der OD_{450} beeinträchtigt wird, lässt sich der Versuch auch mit 1%igen Methanolgehalt während der Antigen-Inkubation durchführen. Abhängig davon, welche Domainsäurekonzentrationen detektiert werden sollen, ließe er sich auch unter Verwendung von 5% oder sogar 10% Methanol durchführen.

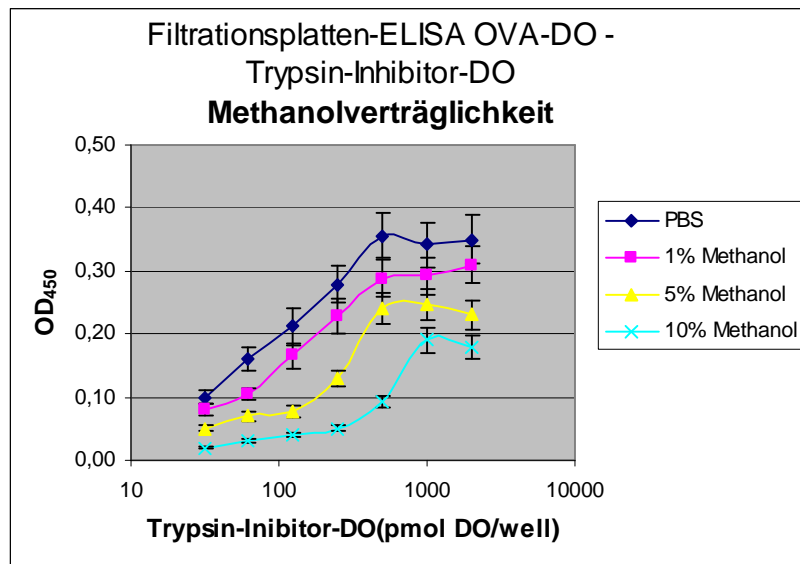
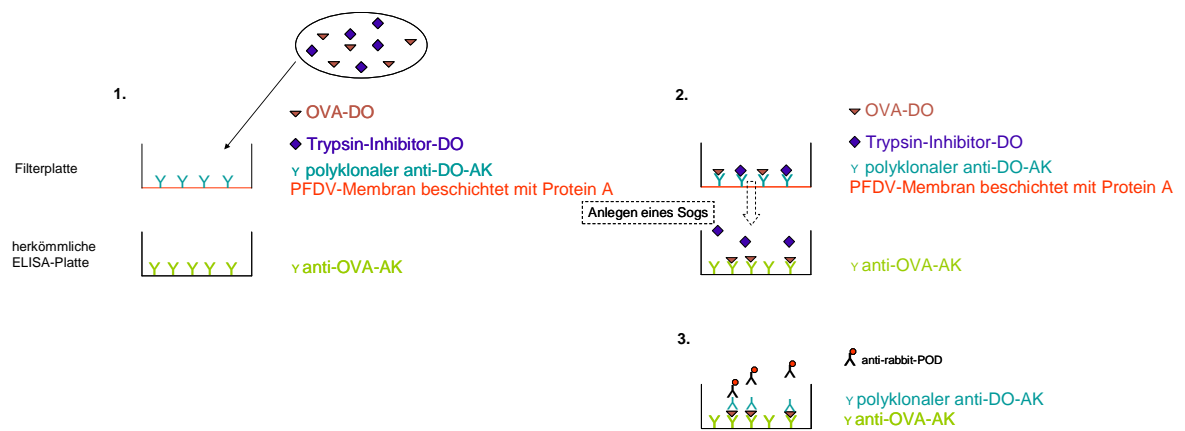


Abb. 43: Filtrationsplatten-ELISA mit OVA-DO zur Überprüfung der Methanolverträglichkeit

6 DISKUSSION

6.1 Antikörpergewinnung

Da Domoinsäure aufgrund ihres geringen Molekulargewichts von 311 Dalton nicht immunogen wirkt, musste sie zur Antikörpergewinnung zunächst an Trägerpeptide bzw. -proteine gekoppelt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierbei das beste Ergebnis mit KLH (*keyhole limpet hemocyanin*) erzielt. Die stark immunogene Wirkung dieses Hämocyanins aus der Napfschnecke *Megathura crenulata* lässt sich nicht nur auf das hohe Molekulargewicht von ca. 8×10^6 Dalton zurückführen (Rittenberg *et al.*, 1966). Die geringe Ähnlichkeit zu körpereigenen Proteinen der Vertebraten spielt ebenfalls eine große Rolle (Goding, 1996).

Um spezifische Antikörper gegen ein bestimmtes Hapten zu gewinnen, sollte dieses möglichst weit vom Trägerprotein entfernt sein. Befindet sich das Hapten zu nah am Trägerprotein, kann es von dessen Strukturen umwölbt sein und es entstehen Antikörper, die oftmals gegen den Hapten-Trägerprotein-Komplex gerichtet sind (Peters *et al.*, 1990). Daher hat es sich für die Herstellung von AK gegen Haptene bewährt, Abstandshalter (Spacer) einzubauen (Schaaper *et al.*, 1989). Eine Spacerlänge von mindestens vier C-Atomen ist anzustreben (Campbell, 1992). Das Anfügen eines Spacers verändert jedoch die chemische und räumliche Struktur des Haptens. Da Domoinsäure bereits einen natürlichen C5-„Spacer“ enthält, konnte auf den Einbau eines weiteren Abstandshalters verzichtet werden. Somit wurde Domoinsäure unverändert mit der Carbodiimid-Methode, welche oft zur Immunogensynthese verwendet wird, an KLH gekoppelt (Erlanger, 1973; Bauminger *et al.*, 1980). Hierbei werden die Carboxylgruppen der Domoinsäure unter Bildung eines aktiven Esters mit EDC aktiviert (s. auch 6.2). Der aktivierte Ester geht mit den Lysinresten des KLH unter Wasserabspaltung eine Peptidbindung ein.

Die Immunisierung eines Kaninchens mit oben beschriebenen KLH-DO-Konjugat führte zur Gewinnung des polyklonalen anti-DO-Antikörpers 387. Das Serum der

vierten Blutung wurde in der Verdünnung 1:1000 verwendet. Vergleichende Versuche zeigten, dass eine Aufreinigung des Serums für die Anwendungen im Rahmen dieser Arbeit unnötig war. Im herkömmlichen ELISA wurden das nicht aufgereinigte Serum sowie die vier bei der Aufreinigung eluierten Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt parallel zur Detektion von OVA-DO verwendet. Das Immenserum vor Aufreinigung zeigte in den Verdünnungen 1:30 und 1:100 niedrigere Signale als die Eluate. In höheren Verdünnungen jedoch sank das Signal des nicht aufgereinigten Serums im Gegensatz zu den Signalen der Eluate nicht ab. Für die hier durchgeführten ELISAs schien eine Aufreinigung des Serums also nicht sinnvoll zu sein. Allerdings gilt es zu berücksichtigen, dass das Serum durch die Aufreinigungsprozedur 1:10 verdünnt wurde. Das Signal der 1:100-Verdünnung des nicht aufgereinigten Serums sollte also theoretisch dem der 1:1000-Verdünnung der IgG-reichen Eluate entsprechen. Dies war lediglich bei Eluat 5 der Fall, welches die Fraktion mit dem höchsten Proteingehalt war.

Gegen Ende der Arbeit gelang es, mit dem gleichen KLH-DO-Konjugat monoklonale Antikörper aus einer Maus zu gewinnen. Das beste Ergebnis lieferte hierbei der Subklon VIII D1 E5. Aus Zeitgründen konnten jedoch nicht alle Ergebnisse mit dem monoklonalen Antikörper reproduziert werden.

6.2 Synthese und Charakterisierung der Domoinsäure-Konjugate

Zur Überprüfung der Antikörperqualität im ELISA wurde zur Beschichtung der Mikrotiterplatten Domoinsäure an Ovalbumin gekoppelt. Dieses Konjugat wurde auch im späteren Versuchsaufbau zu Detektion von DO verwendet, ebenso die biotinylierte DO wie auch die an Trypsin-Inhibitor gekoppelte DO

Die Konjugation der Domoinsäure an die Trägerproteine erfolgte über die Carbodiimid-Methode. Für diese Kopplungsreaktion wurden die Carboxylgruppen der Carbonsäure mit wasserlöslichem 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) aktiviert. Carbodiimid katalysiert die Bildung einer Amidbindung zwischen einer Carbonsäure und einer Aminogruppe (in diesem Fall des Proteins), wobei zunächst aus der Carboxylgruppe ein stark aktives

Zwischenprodukt der Ortho-Acylisoharnstoff entsteht, welches schnell mit Nucleophilen reagiert (Tedder *et al.*, 1972). Die Zugabe von N-Hydroxysuccinimid (NHS) dient hierbei zur Stabilisierung des Zwischenproduktes (Staros *et al.*, 1986). Die Kopplungsreaktion in Anwesenheit von EDC/NHS erfolgte im leicht sauren Milieu (pH 6,0), da H⁺-Ionen die Reaktion des aktiven Esters mit der Aminogruppe katalysieren.

Die Biotinylierung der Domoinsäure erfolgte über (+)-Biotinyl-3-6,9-trioxaundecandiamin und wurde ebenfalls mit der Carbodiimid-Methode durchgeführt

Die Charakterisierung der DO-Konjugate erfolgte mittels ELISA, Dot Blot, SDS-PAGE und Western Blot. Die Ergebnisse der ELISAs und Dot Blots waren positiv wie in 5.1 beschrieben. Besonders gut waren die Ergebnisse von OVA-DO, Trypsin-Inhibitor-DO und Biotin-DO, so dass diese Konjugate für den eigentlichen Detektionassay für tauglich befunden wurden. Das Ergebnis der SDS-PAGE bzw. des Western Blots waren ebenfalls positiv. Lediglich auffällig war hierbei, dass die Kopplung von DO an Ovalbumin und Trypsin-Inhibitor das Laufverhalten der Proteine im Gel auf eine unerwartete Weise zu beeinflussen scheint (s. Abb. 15, 5.1.1). Eine naheliegende Annahme wäre zunächst, dass sich das Molekulargewicht der Proteine durch Kopplung von DO leicht erhöht, wenn auch nicht soweit, dass sich der Massenunterschied durch eine im Gel höher gelegene Bande bemerkbar machen würde. Eine weitere theoretische Möglichkeit wäre, dass ein Teil der Trägerproteine untereinander koppelt, so dass es zur Bildung von Dimeren bzw. Oligomeren käme, deren erhöhtes Molekulargewicht sich durchaus im Laufverhalten bemerkbar machen müsste. Das Ergebnis in Abb. 15 zeigt jedoch nichts dergleichen: Die Banden der OVA-DO- bzw. Trypsin-Inhibitor-DO-Konjugate liegen etwas unterhalb der Banden der ungekoppelten Proteine. Die Konjugate zeigen also das Laufverhalten eines leichteren Proteins anstatt wie zunächst vermutet eines schwereren Proteins. Das veränderte Laufverhalten kann zum einen in den durch die Domoinsäure zusätzlich in die Trägerproteine eingeführten Carboxylgruppen begründet liegen.

Zum anderen liegen die Proteine nach dem Kopplungsprozess vermutlich geknäuelte, d.h. in veränderter Konformation vor. Auch dieser Umstand bringt ein verändertes Laufverhalten im SDS-Gel mit sich.

In Abb. 15 (5.1.1) ist ebenfalls das Laufverhalten im SDS-Gel der biotinylierten, an Avidin gebundene Domainsäure gegenüber des reinen Avidins zu sehen. Hierbei scheint die Bindung des Biotoxins keinen Einfluss auf das Laufverhalten des Proteins zu haben- die Banden liegen annähernd auf gleichen Höhen von ca. 60, 30 und 15 kD. Da es sich bei der hier verwendeten Form von Avidin (NeutrAvidin™, ThermoFisher Scientific) um ein tetrameres Protein von 60 kD handelt, liegt anhand des Ergebnisses der Schluss nahe, dass es durch die Denaturierung durch SDS bzw. β -Mercaptoethanol teilweise in Dimere, teilweise in Monomere zerfällt. Ein dritter Teil bleibt als Tetramer erhalten. Dieser Anteil scheint durch die Bindung biotinylierter Domainsäure erhöht zu werden- die Bande bei ca. 60 kD ist hier stärker ausgeprägt als beim ungebundenen Avidin.

Eine weitere Möglichkeit, die Bindung eines Haptens an ein Trägermolekül zu überprüfen, liegt in der UV/VIS-Spektroskopie. Hierzu muss das Hapten eine spezifische Absorption aufweisen. Die der freien Domainsäure liegt bei 242 nm (Quilliam *et al.*, 1989), die des KLH-Moleküls bei 280 nm (Sambrook *et al.*, 1989). Eine weitere, häufig eingesetzte Methode ist die Quantifizierung des durch Dialyse abgetrennten, nicht gebundenen DO-Anteils nach HPLC-Trennung mittels UV-Absorption bei 242 nm (Quilliam und Wright, 1989).

Von den indirekten Methoden zur Charakterisierung der Immunkonjugate wurde die von Branaa *et al.* (1999) beschriebene UV-spektroskopische Messung angewendet. Sie wurde exemplarisch auch für das Ovalbumin-Domainsäure-Konjugat durchgeführt, welches im späteren Detektionsassay zum Einsatz kam. Die Beurteilung der Konjugation des Haptens an das Trägermolekül erfolgte hierbei anhand der Absorptionsspektren von 200-300 nm Wellenlänge, wobei eine Addition der Absorbanzen durch den Träger und das nicht modifizierte

Hapten im Konjugat vorausgesetzt wurde (Wittmann *et al.*, 1989). Die Übereinstimmung der Absorptionsspektren der Konjugate mit dem der reinen Domoinsäure legte die Vermutung nahe, dass die Konjugationsreaktion erfolgreich abgelaufen war (s. 5.1.4). In Anbetracht der Tatsache, dass die Reaktionsansätze vor ihrer spektroskopischen Vermessung durch Gelfiltration von Kontaminanten mit einem Molekulargewicht < 1000 (*cut off*) befreit wurden, konnte diese Vermutung als bestätigt angesehen werden. Eine direkte Bestimmung der Haptendichte mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese oder die Untersuchung der Immunkonjugate per matrixunterstützter Laserdesorptionsionisations-Massenspektrometrie (*matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry*, MALDI-MS) (Wengatz *et al.*, 1992) war aufgrund der hohen Molekularmasse von KLH in beiden Fällen nicht möglich. Eine Überprüfung der Haptendichte des FID33-Konjugats erschien angesichts der geringen Anzahl möglicher funktioneller Gruppen (4 freie Lysinreste/FID33-Molekül) und der unzureichenden Antikörpertiter wenig sinnvoll. Gestützt durch die Erkenntnis aus der Literatur, dass die Produktion von Antikörpern in der Praxis weitgehend empirisch verläuft und Immunisierungsreaktionen mit vorhersehbaren oder eindeutig erklärbaaren Ergebnissen nach dem derzeitigen Wissensstand nur selten möglich sind, erlaubte eine abschließende Beurteilung der synthetisierten Immunogene erst der Tierversuch, wobei die gelungene Induktion von gegen Domoinsäure gerichteten Antikörpern mit aussagekräftigen Antikörpertitern (5.2.1), Dot Blot Ergebnissen (5.1.2) und der Auswertung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese/Western Blots (5.1.1) die Tauglichkeit des KLH-Immunkonjugate bewies.

6.3 Überprüfung der Grundlagen für den Detektionsassay

6.3.1 Kompetitions-ELISA

Zur Überprüfung der für den zu entwickelnden Detektionsassay erforderlichen Grundlagen wurde zunächst ein Kompetitions-ELISA durchgeführt, bei dem eine Mikrotiterplatte mit einer definierten Menge an OVA-DO beschichtet wurde. Die *wells* der Platte wurden im Anschluss mit anti-DO-AK und variierenden Mengen an OVA-DO (stellvertretend für auf proteingebundene DO zu untersuchende Proben) inkubiert. In der Platte gebundener anti-DO-AK wurde wie beschrieben detektiert. Die OD₄₅₀ sank mit zunehmender Konzentration an freier OVA-DO.: Je mehr freie OVA-DO zugegeben wurde, desto mehr anti-DO-AK band an diese und stand folglich nicht mehr der immobilisierten OVA-DO in der Platte zur Verfügung. Mit diesem Versuch wurde zunächst gezeigt, dass die Konkurrenz eines immobilisierten und eines freien Antigens um einen Antikörper im Falle von konjugierter Domainsäure grundsätzlich funktioniert.

6.3.2 Sandwich-ELISA / Schicht-ELISA

Neben der Konkurrenz war ein funktionierendes Sandwich-System wichtigste Voraussetzung für den zu entwickelnden Detektionsassay. Hierzu wurden die beiden in 4.4.1.2 und 4.4.2.1 beschriebenen Systeme anti-OVA-AK – OVA-DO – anti-DO-AK und Avidin – Biotin-DO – anti-DO-AK entwickelt. Für ersteres wurde eine Mikrotiterplatte mit anti-OVA-Antikörper beschichtet und mit variablen Konzentrationen an OVA-DO inkubiert. Die Detektion erfolgte über den anti-DO-Antikörper. Wie erwartet stieg das Signal mit zunehmender OVA-DO-Konzentration- das Sandwich-System wurde für geeignet erachtet, um auf seiner Basis einen Detektionsassay zu errichten.

Auch das Schicht-System mit Biotin-DO erwies sich als tauglich. Hierfür wurde eine Mikrotiterplatte mit Avidin beschichtet und mit variablen Konzentrationen an Biotin-DO inkubiert. Die Detektion erfolgte über den anti-DO-Antikörper. Wie erwartet stieg das Signal mit zunehmender Biotin-DO-Konzentration.

6.3.3 Kompetitiver Sandwich-ELISA

Oben beschriebener Sandwich-ELISA wurde um ein kompetitierendes Element, Trypsin-Inhibitor-DO, erweitert.

Hierfür wurden verschiedener Mengen OVA-DO an den in der Platte immobilisierten anti-OVA-AK gebunden. Die *wells* wurden mit der jeweils doppelten Menge an Trypsin-Inhibitor-DO (gegenüber OVA-DO) beschickt. In direktem Anschluss hieran wurde der anti-DO-AK zugegeben, so dass die gebundene OVA-DO mit der freien Trypsin-Inhibitor-DO um die Bindestellen des anti-DO-AKs kompetitierte. Nach dessen Detektion in der Platte stieg das Signal mit zunehmender OVA-DO-Konzentration, sofern kein Kompetitor anwesend war. Wurde jedoch die (gegenüber OVA-DO) doppelte Menge an Trypsin-Inhibitor-DO als Kompetitor zugegeben, sank die OD₄₅₀ auf ein Minimum-unabhängig davon, wie viel OVA-DO sich auf der Platte befand. Großteile des anti-DO-AK schienen an die freie Trypsin-Inhibitor-DO zu binden und standen somit der immobilisierten OVA-DO nicht zur Verfügung. Hiermit wurde demonstriert, dass auch verschiedene DO-Konjugate um den anti-DO-AK kompetitieren, was eine wichtige Voraussetzung für den eigentlichen Detektionsassay war.

6.3.4 Methanolkompatibilität

Herkömmlicherweise wird Domoinsäure mit Methanol-H₂O-Mischungen aus Gewebe extrahiert (Quilliam, 1995; Pardo *et al.*, 2007). Parallel zu rein wässrigen Extrakten wurde auch in dieser Arbeit mit methanolischen Auszügen gearbeitet, weshalb sowohl die Methanolkompatibilität der Antigen-Antikörper-Reaktion im Allgemeinen als auch die Methanolkompatibilität der Detektionsassays bestimmt werden mussten

6.3.4.1 Methanolkompatibilität der Antigen-Antikörper-Reaktion

Zunächst wurde die Methanolkompatibilität der Antigen-Antikörper-Reaktion untersucht. Hierzu wurde ein herkömmlicher ELISA durchgeführt (mit OVA-DO als Beschichtungskonjugat), bei dem allerdings die Inkubation des

Primärantikörpers unter Anwesenheit verschieden hoher Methanolanteile erfolgte. Hierbei wurde deutlich, dass nach Detektion über einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper die OD_{450} ab einem Methanolanteil von 30% zu sinken begann. Zwischen 0 und 20% Methanol hingegen blieb das Signal konstant auf einer Höhe. Ab welchem exakten Methanolanteil zwischen 20% und 30% der Vorgang der Antigen-Antikörper-Bindung geschwächt wird, bliebe zu ermitteln.

In einem parallelen Versuch wurde ein herkömmlicher ELISA durchgeführt, bei dem die Platte nach erfolgter Antigen-Antikörper-Bindung mit unterschiedlich hohen Methanolanteilen inkubiert wurde. Interessanterweise hatte diese nachträgliche Methanolinkubation keinen messbaren Effekt auf die bereits vorhandene Antigen-Antikörper-Bindung.

6.3.4.2 Methanolkompatibilität der Detektionsassays

Um die Komponenten des Kompetitions-ELISA in der Filtrationsplatte insgesamt auf Methanolverträglichkeit zu testen, wurden unter 4.4.1.4 und 4.4.2.2 beschriebene Versuche durchgeführt. Hierbei erfolgte die Antigen-Inkubation in 1%, 5% bzw. 10% Methanol/PBS.

Die Detektion mithilfe von OVA-DO als der zu messenden Größe funktionierte in Anwesenheit eines Methanolgehalts von bis zu 10%. Allerdings wurde hierbei die Intensität der Signale im Allgemeinen sowie auch die Sensitivität des Testsystems beträchtlich beeinflusst, d.h. dass das Signal erst bei höheren Kompetitor-Konzentrationen zu steigen begann als bei Verwendung von weniger oder keinem Methanol.

Im Falle der Detektion mithilfe von Biotin-DO als der zu messenden Größe hingegen zeigte sich, dass der Versuch mit 5% bzw. 10% Methanol nicht durchführbar ist. Die Verwendung von 1% Methanol beeinflusst zwar die Intensität des Signals, jedoch bleibt der typische Kurvenverlauf gegenüber der rein wässrigen Lösung erhalten. Somit ließe sich der Test mit einem

Muschelextrakt mit einem Methanolgehalt von 1% und Biotin-DO als der zu messenden Größe durchführen.

Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Testsysteme bezüglich der Methanolkompatibilität liegt der Schluss nahe, dass das Biotin-DO-Konjugat methanollabil ist (bzw. das Avidin-Biotin-DO-Konstrukt). Diese Labilität scheint stärker ausgeprägt zu sein als jene des OVA-DO-Konstrukts.

6.4 Assay zur Detektion von Domoinsäure

Zur Detektion von Domoinsäure in Muschelextrakten wurden unter 4.4.1.4 und 4.4.2.2 beschriebene ELISAs entwickelt.

6.4.1 Assay zur Detektion von Domoinsäure mit OVA-DO

Diese ELISAs wurden zunächst im künstlichen System getestet: Im Falle der Detektion mithilfe von OVA-DO als der zu messenden Größe diene Trypsin-Inhibitor-DO als kompetitierendes Antigen stellvertretend für einen Muschelextrakt, in dem Domoinsäure proteingebunden vorliegt. Einen signifikanten Anstieg des Signals lieferte hierbei eine Trypsin-Inhibitor-DO-Konzentration von 125 pmol DO/well oder 1,25 nmol DO/ml. Dies wiederum entspricht 389 ng DO/ml. Der zulässige Höchstwert für Domoinsäure liegt bei 20 µg/g Muschelgewebe (Kvasnicka *et al.* 2006; Traynor *et al.* 2006; Anonym 2004; Anonym, 2005 a). In der vorliegenden Arbeit wurde 1 g Muschelgewebe in einem Volumen von 2 ml extrahiert, so dass in 1 ml Extrakt nicht mehr als 10 µg DO vorliegen dürfte, um unter der dem zulässigen Höchstwert zu liegen. Dies entspricht 32 nmol DO/ml. Das Testsystem sollte also sensitiv genug sein, um mindestens 10 µg bzw. 32 nmol DO/ml detektierbar zu machen. Der beschriebene Signalanstieg bei einer Trypsin-Inhibitor-Konzentration von 1,25 nmol DO/ml beweist sogar eine höhere Sensitivität.

Um im Muschelextrakt frei vorliegende DO zu simulieren, wurde der gleiche Versuch mit in PBS gelöster DO als Kompetitor durchgeführt. Hierbei erfolgte der

Signalanstieg bereits ab einer Konzentration von 625 pmol DO/ml (entsprechend 194 ng DO/ml), was eine höhere Empfindlichkeit des Testsystems gegenüber freier DO vermuten lässt.

Als drittes künstliches System wurde ein nachträglich mit DO angereicherter Extrakt von *Mytilus edulis* als kompetitierendes Element gewählt. Auch hierbei erfolgte ein Anstieg des Signals bei 625 pmol DO/ml, so dass auch dieses System als ausreichend sensitiv zum Nachweis von DO betrachtet werden kann. Weiterhin fiel auf, dass die durch den angereicherten Extrakt generierte Kurve insgesamt höher lag als die durch freie und Trypsin-Inhibitor-gekoppelte DO generierten. Der Schluss liegt nahe, dass der Extrakt ein höheres Potential zur Konkurrenz mit OVA-DO um den anti-DO-AK besitzt als die freie und Trypsin-Inhibitor-gekoppelte DO.

Nach erfolgreichen Tests in den beschriebenen künstlichen Systemen wurde der gleiche Versuch mit Muschelextrakten durchgeführt, deren Ursprungs-Individuen der Art *Mytilus galloprovincialis* in lebendem Zustand verschiedenen DO-Konzentrationen ausgesetzt waren (1) 1 µg DO pro Gramm Gesamtgewicht bzw. 70 µg/l Meerwasser; 2) 10 µg DO pro Gramm Gesamtgewicht bzw. 708 µg/l Meerwasser). Die Gewebe wurden jeweils auf zwei Arten aufbereitet: Zur Herstellung der Extrakte 1a und 2a diente eine Mischung aus 50% Methanol und 50% H₂O, für 1b und 2b wurde ein wässriger Extraktionspuffer verwendet. Die Ausgangsverdünnungen wurden so gewählt, dass in Extrakt 1a 9% Methanol, in Extrakt 2a 0,9% Methanol vorlagen. Für die weiteren Verdünnungsschritte dienten Extraktverdünnungen der nicht kontaminierten Muscheln, so dass gewährleistet war, dass lediglich die DO-Konzentration, nicht aber die sonstige Zusammensetzung der Extrakte verändert wurde.

Es zeigte sich, dass die Domoinsäure in allen vier Extrakten detektierbar war: Auch hier machte sich eine DO-Konzentration von 625 pmol/ml in einem Anstieg des Signals bemerkbar. Außerdem fiel auf, dass die jeweiligen Kurven der wässrigen Extrakte höher lagen als die Kurven der entsprechenden methanolischen Extrakte. Dies deckt sich mit dem Ergebnis des Versuchs zur

Methanolverträglichkeit; Methanol scheint das Potential der Extrakte zur Konkurrenz mit OVA-DO um den anti-DO-AK negativ zu beeinflussen. Trotzdem funktionierte die Detektion von Domoinsäure auch in Anwesenheit von 9% Methanol.

Des Weiteren war auffällig, dass die Kurve des wässrigen Extrakts 1b höher lag als die Kurve des wässrigen Extrakts 2b. Muschel Nr. 1 war 1 µg DO/g Gesamtgewicht ausgesetzt worden, Muschel Nr. hingegen 10 µg DO/g Gesamtgewicht. Dass Extrakt 1b ein höheres Verdrängungspotential als Extrakt 2b zu haben scheint, liegt möglicherweise an unterschiedlichen Filtrations- und/oder Inkorporationsverhalten der Individuen.

In Tab. 4 sind die zur Detektion erforderlichen Mindestkonzentrationen der verschiedenen Konkurrenten gegenüber OVA-DO (300 pmol DO/well bzw. 3 nmol DO/ml) verglichen:

Konkurrent	Mindestkonzentration DO
Trypsin-Inhibitor-DO	1250 pmol/ml
freie DO	625 pmol/ml
mit DO angereicherter <i>Mytilus edulis</i> -Extrakt	625 pmol/ml
Extrakt 1a: 1 µg DO/g <i>Mytilus galloprovincialis</i> , 9% MetOH	625 pmol/ml
Extrakt 1b: 1 µg DO/g <i>Mytilus galloprovincialis</i>	625 pmol/ml
Extrakt 2a: 10 µg DO/g <i>Mytilus galloprovincialis</i> ; 0,9% MetOH	625 pmol/ml
Extrakt 2a: 10 µg DO/g <i>Mytilus galloprovincialis</i>	625 pmol/ml

Tab. 4: Zur Detektion erforderliche Mindestkonzentrationen der konkurrierenden Domoinsäure gegenüber 3 nmol OVA-gekoppelter DO/ml

Aus Tab. 4 wird deutlich, dass rein rechnerisch doppelt soviel Trypsin-Inhibitor-gekoppelte als freie oder im Extrakt vorliegende Domoinsäure nötig ist um eine messbare Konkurrenz zu erzielen. Dies liegt vermutlich daran, dass nicht alle

DO-Moleküle an für den Antikörper zugängliche Bereiche innerhalb des Trypsin-Inhibitor-Moleküls gekoppelt werden; außerdem ist die tatsächliche Effizienz der EDC-katalysierten Kopplung von DO an Trägerproteine nicht bekannt. Weiterhin bleibt zu untersuchen, zu welchen Anteilen in welcher Form die Domoinsäure nach Inkorporation durch die Muschel vorliegt: frei, kovalent an Proteine gebunden oder an Proteine adsorbiert. Insofern können die angegebenen Konzentrationen nur als Richtwerte betrachtet werden.

6.4.2 Assay zur Detektion von Domoinsäure mit Biotin-DO

Auch der Detektionsassay mit Biotin-DO als der zu messenden Größe wurde zunächst im künstlichen System getestet; hierbei diente OVA-DO als kompetitierendes Antigen stellvertretend für einen Muschelextrakt, in dem Domoinsäure proteingebunden vorliegt. Einen signifikanten Anstieg des Signals lieferte hierbei eine OVA-DO-Konzentration von 3 pmol DO/well oder 30 pmol DO/ml. Wie unter 6.4.1 hergeleitet, sollte der Detektionsassay sensitiv genug sein, um mindestens 10 µg bzw. 32 nmol DO/ml detektierbar zu machen. Der beschriebene Signalanstieg bei einer OVA-DO Konzentration von 30 pmol DO/ml (entsprechend 9 ng DO/ml) beweist eine weitaus höhere Sensitivität.

Um im Muschelextrakt frei vorliegende DO zu simulieren, wurde der gleiche Versuch mit in PBS gelöster DO als Kompetitor durchgeführt. Hierbei erfolgte der Signalanstieg bereits ab einer Konzentration von 10 pmol DO/ml (entsprechend 3 ng DO/ml), wobei der Anstieg gegenüber dem 0-Wert etwas schwächer ausgeprägt war als der Anstieg von OVA-DO bei einer Konzentration von 30 pmol DO/ml. Trotzdem lässt sich eine geringfügig höhere Empfindlichkeit des Testsystems gegenüber freier DO vermuten.

Als drittes künstliches System wurde ein nachträglich mit DO angereicherter Extrakt von *Mytilus edulis* als kompetitierendes Element gewählt. Wie im Fall von OVA-DO erfolgte ein deutlicher Anstieg des Signals bei 30 pmol DO/ml, so dass auch dieses System als mehr als ausreichend sensitiv zum Nachweis von DO betrachtet werden kann.

Nach erfolgreichen Tests in den beschriebenen künstlichen Systemen wurde der gleiche Versuch mit Muschelextrakten durchgeführt, deren Ursprungs-Individuen der Art *Mytilus galloprovincialis* in lebendem Zustand verschiedenen DO-Konzentrationen ausgesetzt waren (1) 1 µg DO pro Gramm Gesamtgewicht bzw. 70 µg/l Meerwasser; 2) 10 µg DO pro Gramm Gesamtgewicht bzw. 708 µg/l Meerwasser). Die Gewebe wurden jeweils auf zwei Arten aufbereitet: Zur Herstellung der Extrakte 1a und 2a diente eine Mischung aus 50% Methanol und 50% H₂O, für 1b und 2b wurde ein wässriger Extraktionspuffer verwendet. Die Ausgangsverdünnungen wurden so gewählt, dass in Extrakt 1a 9% Methanol, in Extrakt 2a 0,9% Methanol vorlagen. Für die weiteren Verdünnungsschritte dienten Extraktverdünnungen der nicht kontaminierten Muscheln, so dass gewährleistet war, dass lediglich die DO-Konzentration, nicht aber die sonstige Zusammensetzung der Extrakte verändert wurde.

Es zeigte sich, dass die Domoinsäure in den Extrakten 1b, 2a und 2b detektierbar war. Die Signale der durch den Extrakt 1a (9% Methanol) generierten Kurve hingegen blieben annähernd konstant auf einer Höhe. Dies deckt sich mit dem Ergebnis des Versuchs zur Methanolverträglichkeit, bei dem ein Methanolanteil von 10% als zu hoch für ein funktionierendes Testsystem befunden wurde. In den wässrigen Extrakt 1b und 2b machte sich eine DO-Konzentration von 30 pmol/ml (entsprechend 9 ng DO/ml) in einem deutlichen Anstieg des Signals bemerkbar ebenso im methanolischen Extrakt 2a (0,9% Methanol). Hierbei fiel auf, dass die jeweiligen Kurven der beiden wässrigen Extrakte höher lagen als die Kurve des methanolischen Extrakts 2a. Dies deckt sich wiederum mit dem Ergebnis des Versuchs zur Methanolverträglichkeit, aus welchem hervorging, dass die Detektion von DO mithilfe von Biotin-DO als der zu messenden Größe in Anwesenheit von 1% Methanol zwar funktionierte, dass allerdings die Intensität des Signals dadurch gesenkt wurde.

In Tab. 5 sind die zur Detektion erforderlichen Mindestkonzentrationen der verschiedenen Kompetitoren gegenüber Biotin-DO (0,5 pmol DO/well bzw. 5 pmol DO/ml) verglichen:

Kompetitor	Mindestkonzentration DO
OVA-DO	30 pmol/ml
freie DO	10-30 pmol/ml
mit DO angereicherter <i>Mytilus edulis</i> -Extrakt	30 pmol/ml
Extrakt 1a: 1 µg DO/g <i>Mytilus galloprovincialis</i> , 9% MetOH	30 pmol/ml
Extrakt 1b: 1 µg DO/g <i>Mytilus galloprovincialis</i>	30 pmol/ml
Extrakt 2a: 10 µg DO/g <i>Mytilus galloprovincialis</i> ; 0,9% MetOH	30 pmol/ml
Extrakt 2a: 10 µg DO/g <i>Mytilus galloprovincialis</i>	30 pmol/ml

Tab. 5: Zur Detektion erforderliche Mindestkonzentrationen der kompetitierenden Domoinsäure gegenüber 5 pmol biotinylierter DO/ml

Aus Tab. 5 wird ersichtlich, dass die Sensitivität des Detektionsassays mithilfe von Biotin-DO als der zu messenden Größe gegenüber freier DO geringfügig sensitiver ist als gegenüber Ovalbumin-gebundener oder im Extrakt vorliegender DO. Dies liegt vermutlich daran, dass innerhalb des Ovalbumin-Moleküls nicht alle DO-Moleküle für den Antikörper zugänglich sind. Wie unter 6.4.1 bereits beschrieben, ist allerdings noch nicht aufgeklärt, zu welchen Anteilen in welcher Form die DO in den Extrakten vorliegt, genauso wenig wie die Effizienz der EDC-katalysierten Kopplung von DO an Trägerproteine. Insofern können die angegebenen Konzentrationen nur als Richtwerte dienen.

6.4.3 OVA-DO und Biotin-DO im Vergleich

Es wurden zwei im prinzipiellen Aufbau identische Detektionssysteme für Domoinsäure entwickelt. Im ersten diente OVA-DO, im zweiten Biotin-DO als zu messende Größe. Mit beiden Systemen sind Domoinsäurekonzentrationen unterhalb des zulässigen Höchstwerts von 20 µg/g Muschelgewebe detektierbar. Der Kompetitions-ELISA mit Biotin-DO ist jedoch um das ca. 20-fache empfindlicher als jener mit OVA-DO: In ersterem lassen sich 30 pmol DO/ml

(entsprechend 9 ng DO/ml) Extrakt detektieren, in letzterem hingegen 625 pmol DO/ml (entsprechend 194 ng DO/ml) Extrakt. Dies liegt an empirisch ermittelten begleitenden Parametern: Im ELISA mit Biotin-DO konkurrieren 5 pmol biotinylierte DO/ml mit der im Extrakt enthaltenen DO, im ELISA mit OVA-DO konkurrieren 3 nmol Ovalbumin-gebundene DO mit der im Extrakt vorliegenden DO. Wie bereits erwähnt handelt es sich in letzterem Fall um einen errechneten Wert; es ist unbekannt, wie viel DO innerhalb des OVA-Moleküls für den Antikörper tatsächlich zugänglich ist und daher für die Konkurrenz gewertet werden kann. Versuche, das OVA-DO-System zu sensitivieren, scheiterten daran, dass bei Verwendung von um Größenordnungen niedrigeren OVA-DO-Konzentrationen im Sandwich-ELISA kein signifikantes Signal mehr generiert wurde (s. 5.4.1.2).

Ein potentieller Vorteil des Detektionssystems mit OVA-DO ist seine höhere Methanolkompatibilität: DO war hier auch in einem 9%igen methanolischen Extrakt nachweisbar, was im Konkurrenz-ELISA mit Biotin-DO nicht der Fall war. Da jedoch mit dem in dieser Arbeit verwendeten rein wässrigen Extrakt annähernd identische Ergebnisse wie mit dem methanolischen Auszug erzielt wurden, war dies nicht relevant.

6.5 Ausblick

Prinzipiell ist der in dieser Arbeit entwickelte Assay zur Detektion von Domoinsäure unterhalb des zulässigen Höchstwerts geeignet. Um jedoch genaue Aussagen über seine Zuverlässigkeit und Sensitivität zu machen, müsste der Assay mit Muschelextrakten durchgeführt werden, deren Ursprungsindividuen unter natürlichen Umständen mit Domoinsäure kontaminiert wurden. Die Tiere sollten einer Blüte ASP-Toxin bildender Algen ausgesetzt werden; ob in einer Muschelfarm oder in der freien Natur spielt hierbei zunächst keine Rolle. Möglicherweise inkorporieren und akkumulieren die Tiere die ASP-Toxine unter diesen Umständen in anderen Mengen als in im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuch, in welchem die Tiere Domoinsäure ausgesetzt waren, die direkt im umgebenden Meerwasser gelöst wurde.

Die Extrakte der natürlich kontaminierten Muscheln müssten per HPLC quantitativ auf Domoinsäure untersucht und parallel in dem in dieser Arbeit entwickelten Assay eingesetzt werden, um definitiven Rückschluss auf die Genauigkeit des neuen Testsystems geben zu können. Die Angaben zur Sensitivität basieren auf theoretischen Berechnungen ausgehend von der eingesetzten Menge an Domoinsäure, die demnach maximal vorhanden sein kann.

Letztendlich müsste das in dieser Arbeit entwickelte Detektionssystem mit einem monoklonalen Antikörper etabliert werden, um eine dauerhafte Reproduzierbarkeit zu gewährleisten und somit einen kommerziellen Einsatz zu ermöglichen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Domoinsäure ist ein von mehreren Arten mariner Kieselalgen der Gattung *Pseudonitzschia* produziertes Toxin, welches während einer Algenblüte in Mollusken wie z.B. der Miesmuschel *Mytilus sp.* akkumuliert werden kann. Beim Verzehr solch kontaminierter Muscheln können sowohl beim Menschen als auch bei Tieren erhebliche Vergiftungserscheinungen auftreten, die von Übelkeit, Kopfschmerzen und Orientierungsstörungen bis hin zum Verlust des Kurzzeitgedächtnisses (daher auch als *amnesic shellfish poisoning* bekannt) reichen und in einigen Fällen tödlich enden.

Die heute gängigen Methoden zur Detektion von Domoinsäure in Muschelgewebe wie Flüssigkeitschromatographie und Maus-Bioassay sind zeit- und kostenintensiv bzw. in Anbetracht einer Verbesserung des Tierschutzes aus ethischer Sicht nicht zu vertreten. Immunologische Testsysteme stellen eine erstrebenswerte Alternative dar, da sie sich durch eine vergleichsweise einfache Handhabung, hohe Selektivität und Reproduzierbarkeit auszeichnen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein solches immunologisches Testsystem zur Detektion von Domoinsäure zu entwickeln. Hierfür wurden zunächst Antikörper gegen Domoinsäure gewonnen, wofür das Toxin wiederum als erstes über die Carbodiimid-Methode an das Trägerprotein *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) gekoppelt wurde, um eine Immunantwort auslösen zu können. Kaninchen und Mäuse wurden mit KLH-DO-Konjugaten nach vorgegebenen Immunisierungsschemata immunisiert. Nach vier Blutabnahmen zeigte das polyklonale Kaninchenantiserum eine ausreichend hohe Sensitivität zum Antigen; das nachfolgende Detektionssystem wurde mit Hilfe dieses polyklonalen Antikörpers aufgebaut. Zwar ist es gegen Ende der Arbeit auch gelungen, einen spezifischen monoklonalen Antikörper aus der Maus zu gewinnen, jedoch konnte dieser aus zeitlichen Gründen nicht mehr im Detektionssystem etabliert werden, was durchaus wünschenswert gewesen wäre.

Weiterhin wurde Domoinsäure im Zuge der Entwicklung eines neuartigen Testsystems an die Trägerproteine Ovalbumin, Trypsininhibitor und Casein sowie an Biotin konjugiert. Die Kopplungserfolge wurden im ELISA, Western Blot bzw. Dot Blot nachgewiesen. Die Ovalbumin-gekoppelte sowie die biotinylierte Domoinsäure dienen im Folgenden als die zu messenden Größen in den Detektionsassays- die in einer zu untersuchenden Probe vorhandene, kompetitierende Domoinsäure wurde somit indirekt nachgewiesen.

Der zulässige Höchstwert für Domoinsäure liegt bei 20 µg/g Muschelgewebe. Sowohl mit Biotin-DO als auch mit OVA-DO als den zu messenden Größen waren Domoinsäurekonzentrationen unterhalb dieses Grenzwertes nachweisbar; allerdings erwies sich der Aufbau mit Biotin-DO um das ca. 20-fache empfindlicher als jener mit OVA-DO.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse könnten als Grundlage zur Etablierung eines kommerzialisierbaren immunologischen Testsystems zur Detektion von Domoinsäure und anderen Biotoxinen dienen. Nach erfolgreicher Validierung wäre ein solches Testsystem in seiner Handhabung einfacher als die gängige Flüssigkeitschromatographie und besser reproduzierbar als der Maus-Bioassay.

Summary

Domoic acid is a toxin produced by several species of the diatom *Pseudonitzschia*. During an algal bloom, it can be accumulated in molluscs such as the mussel *Mytilus sp.* Consuming these contaminated mussels, both humans and animals may suffer from severe food poisoning. The symptoms vary from nausea, headache and disorientation to the loss of short term memory (hence known as amnesic shellfish poisoning). Amnesic shellfish poisoning rarely results in death.

Today's prevalent methods for the detection of domoic acid in mussel tissue, such as liquid chromatography and the mouse bioassay, are time-consuming and costly. They are also not justifiable for ethical reasons bearing in mind an

increase in animal protection. Being highly selective, reproducible and easy in handling, immunological test systems constitute a desirable alternative.

The aim of this study was the development of such an immunological test system for the detection of domoic acid. For this purpose, antibodies against domoic acid were raised. To enable the toxin to release an immune response, it was coupled in a first instance to the carrier protein keyhole limpet hemocyanin (KLH), using the carbodiimide method. Rabbits and mice were immunised injecting these KLH domoic acid conjugates by default schemata. After the fourth blood test, the polyclonal rabbit immune serum showed an adequate sensitivity for the antigen; the following detection system was established by means of this polyclonal antibody. By the end of the study, a specific monoclonal antibody against domoic acid was raised successfully. Due to time constraints, it was not possible to establish this antibody in the test system, although it would have been desirable.

Furthermore, domoic acid was linked to the carrier proteins ovalbumin, trypsin inhibitor and casein as well as to biotin in the course of the development of a novel detection system. The results of the coupling procedures were verified by ELISA and Western Blot respectively Dot Blot technique. The ovalbumin coupled as well as the biotinylated domoic acid were subsequently the factors to be measured in the detection assays, i.e. the competing domoic acid present in a sample to be analyzed was detected indirectly.

The allowed maximum of domoic acid is determined as 20 µg/g of mussel tissue. Toxin concentrations below this limit were detectable both using biotinylated and ovalbumin coupled domoic acid as the factors to be measured. However, the construction using biotinylated domoic acid turned out to be twenty times more sensitive than using ovalbumin coupled domoic acid.

The results presented in this thesis might provide a basis for the establishment of an immunological test system for the detection of domoic acid and other biotoxins that could be commercialised. After successful validation, a test system like this would be easier in handling than the current liquid chromatography and better reproducible than the mouse bioassay.

8 ANHANG

8.1 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Pseudo-nitzschia pungens
- Abb. 2:** Strukturanalogie von Domoinsäure und Glutaminsäure
- Abb. 3:** Biosynthese von Domoinsäure
- Abb. 4:** Kopplungsreaktion unter Einwirkung von EDC/NHS
- Abb. 5:** Strukturformel von (+)-Biotinyl-3-6,9-trioxaundecandiamin
- Abb. 6:** Schema einer Schachbrett Titration
- Abb. 7:** An Agarosekügelchen immobilisierter Ligand für die thiophile Adsorption von Immunglobulinen
- Abb. 8:** Schema eines Kompletions-ELISAs mit OVA-DO
- Abb. 9:** Schema eines Sandwich-ELISAs mit OVA-DO
- Abb. 10:** Schema eines kompetitiven Sandwich-ELISAs mit OVA-DO
- Abb. 11:** Schema eines Filtrationsplatten-ELISAs mit OVA-DO
- Abb. 12:** Vorrichtung zur Durchführung eines Filtrationsplatten-ELISAs
- Abb. 13:** Schema eines Schicht-ELISAs mit Biotin-DO
- Abb. 14:** Schema eines Filtrationsplatten-ELISAs mit Biotin-DO
- Abb. 15:** Denaturierendes SDS-Polyacrylamidgel (oben) und zugehöriger Western Blot der unkonjugierten und an DO konjugierten Proteine
- Abb. 16:** Dot Blot biotinylierter DO, über Avidin immobilisiert
- Abb. 17:** Dot Blot Ovalbumin-gekoppelter DO
- Abb. 18:** Dot Blot Trypsin-Inhibitor-gekoppelter DO
- Abb. 19:** Dot Blot Casein-gekoppelter DO
- Abb. 20:** Schicht-ELISA zur Überprüfung des Kopplungserfolges von Biotin-DO
- Abb. 21:** ELISA zur Überprüfung der Kopplungserfolge der Protein-DO-Konjugate
- Abb. 22:** Charakterisierung des FID33-DO-Konjugats mittels UV-Spektroskopie

- Abb. 23:** Charakterisierung des KLH-DO-Konjugats mittels UV-Spektroskopie
- Abb. 24:** Charakterisierung des OVA-DO-Konjugats mittels UV-Spektroskopie
- Abb. 25:** ELISA zur Titerbestimmung des anti-DO-Immunsersums 387
- Abb. 26:** Schachbrett-ELISA mit anti-DO-Immunsersum 387 und OVA-DO
- Abb. 27:** Proteingehalt der Fraktionen nach Aufreinigung des anti-DO-Immunsersums 387
- Abb. 28:** ELISA nach Aufreinigung des anti-DO-Immunsersums 387
- Abb. 29:** ELISA mit diversen Subklonen des anti-DO-AK VIII D1
- Abb. 30:** Proteingehalt der Fraktionen nach Aufreinigung des Subklons VIII D1 E5 des monoklonalen anti-DO-AK
- Abb. 31:** ELISA nach Aufreinigung des Subklons VIII D1 E5 des monoklonalen anti-DO-AK
- Abb. 32:** Kompetitions-ELISA mit OVA-DO
- Abb. 33:** Sandwich-ELISA mit OVA-DO
- Abb. 34:** Kompetitiver Sandwich-ELISA mit OVA-DO
- Abb. 35:** Filtrationsplatten-ELISA mit OVA-DO
- Abb. 36:** Filtrationsplatten-ELISA mit OVA-DO und verschiedenen Extrakten
- Abb. 37:** Schicht-ELISA mit Biotin-DO
- Abb. 38:** Filtrationsplatten-ELISA mit Biotin-DO
- Abb. 39:** Filtrationsplatten-ELISA mit Biotin-DO und verschiedenen Extrakten
- Abb. 40:** Kontrollreaktion zur Competition in Filtrationsplatte
- Abb. 41:** ELISA zur Methanolverträglichkeit der anti-DO-Antikörper
- Abb. 42:** Filtrationsplatten-ELISA mit Biotin-DO zur Überprüfung der Methanolverträglichkeit
- Abb. 43:** Filtrationsplatten-ELISA mit OVA-DO zur Überprüfung der Methanolverträglichkeit

8.2 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1:** Übersicht über die von marinen Algentoxinen ausgelösten Vergiftungserscheinungen
- Tab. 2:** Pipettierschema für die zur Proteintrennung eingesetzten Polyacrylamidgele
- Tab. 3:** Subtypen der von den ausgewählten Hybridomen produzierten Antikörper
- Tab. 4:** Zur Detektion erforderliche Mindestkonzentrationen der kompetitierenden Domoinsäure gegenüber 3 nmol OVA-gekoppelter DO/ml
- Tab. 5:** Zur Detektion erforderliche Mindestkonzentrationen der kompetitierenden Domoinsäure gegenüber 5 pmol biotinylierter DO/ml

8.3 Abkürzungsverzeichnis

A

A	Ampère
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper

B

Bed.	Bedingungen
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BSA	<i>bovines serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise

C

CE	Kapillarelektrophorese
CZE	Kapillarzonenelektrophorese

D

dest.	destilliert
DO	Domoinsäure

E

EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)- carbodiimid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay

F

Fc-Domäne	kristallines Fragment der Antikörper
FCS	Fötale Kälberserum

G

g	relative Zentrifugalbeschleunigung
---	------------------------------------

H

h	Stunde
HAB	harmful algal bloom, toxische Algenblüte
HPLC	Hochleistungschromatographie
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase

I

IgG	Immunglobulin Klasse G, γ -Immunglobulin
IgM	Immunglobulin Klasse M

K

kDa	Kilodalton (1 Dalton = $1,66 \cdot 10^{-27}$ kg)
KLH	Keyhole limpet hemocyanin

KÜ	Kulturüberstand
kV	Kilovolt
L	
LC	Flüssigchromatographie
M	
mA	Milliampère
min	Minute
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
MU	mouse unit, Mauseinheit
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
N	
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NM	Nährmedium
O	
OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin, Hühnerei-Albumin
P	
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglykol
R	
rel.	relativ
RT	Raumtemperatur

S

SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
Sek.-AK.	Sekundärantikörper

T

Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

U

u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett

V

V	Volt
vgl.	vergleiche
(v/v)	<i>volume per volume</i>

W

(w/v)	<i>weight per volume</i>
-------	--------------------------

Z

z.B.	zum Beispiel
------	--------------

8.4 Literaturverzeichnis

Ahmed F.E. (1991). Seafood Safety. National Academy Press, Washington, DC

Anderson D.M. (1989). Toxic Algal Blooms and Red Tides: A Global Perspective. *In: Okaichi T., Anderson D.M., Nemoto T., (eds). Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology.* Elsevier, New York, 11-16

Anonym (2004). Verordnung EG 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 20. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs. *Abl. der EG Nr. L 139 S. 0055-0205*

Anonym (2005 a). Analytik mariner Biotoxine. Positionspapier Nr. 013/2005 des BfR vom 07. April 2005

Anonym (2005 b). 40 Jahre Kieselalgen. Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung. www.awi.de/de/aktuelles_und_presse/pressemitteilungen/

Ausubel F., Brent R., Kingston R., Moore D., Seidman J., Smith J., Struhl K. (1994). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons Inc., New York

Bates S.S., DeFreitas A.S.W., Milley J.E., Pocklington R., Quilliam M.A., Smith J.C., Worms J. (1991). Controls on Domoic Acid Production by the Diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseries* in Culture: Nutrient and Irradiance. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48, 1136-1144

Bauminger S., Wilchek M. (1980). The Use of Carbodiimides in the Preparation of Immunizing Conjugates. *Method. Enzymol.*, 70, 151-159

Berkelman T., Stenstedt T., (1998). 2-D Electrophoresis Using Immobilized pH Gradients, Principles and Methods. Amersham Bioscience, New Jersey

Branaa P., Naar J., Chinain M., Pauillac S. (1999). Preparation and Characterization of Domoic Acid-Protein Conjugates Using Small Amount of Toxin in a Reversed Micellar Medium: Application in a Competitive Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Bioconjugate Chem.*, 10, 1137-42

Burkholder J.M. (1998). Implications of Harmful Marine Microalgae and Heterotrophic Dinoflagellates in Management of Sustainable Marine Fisheries. *Ecol. Applications.*, 8, S37-S62

Campbell A.M. (1992). Monoclonal Antibody and Immunosensor Technology. Elsevier, Amsterdam

- Cembella A.D., Milenkovic L., Doucette G., Fernandez M. (1995).** *In Vitro* Biochemical and Cellular Assays. In Hallegraeff G.M., Anderson D.M., Cembella A.D., Enevoldsen H.O., (eds). Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC/UNESCO, Paris, 177-228
- Cohen P., Holmes C.F.B., Tsukitani Y. (1990).** Okadaic Acid: A New Probe for the Study of Cellular Regulation. *Trends Biochem. Sci.*, 15, 98-102
- Coller H.A., Coller B.S. (1983).** Statistical Analysis of Repetitive Subcloning by the Limiting Dilution Technique with a View toward Ensuring Hybridoma Monoclonality. *Hybridoma*, 2, 91-96
- Crowther J.R. (2001).** The ELISA Guidebook: Theory and Practice, 149. Springer Verlag, New York
- Dechraoui M.-Y., Naar J., Pauillac S., Legrand A.-M., (1999).** Ciguatoxins and Brevetoxins, Neurotoxic Polyether Compounds Active on Sodium Channels. *Toxicon*, 37, 125-143
- Dingermann T., Hänsel R., Zündorf I. (2002).** Pharmazeutische Biologie-Molekulare Grundlagen und klinische Anwendungen. Springer Verlag, Berlin
- Dominik A., Steinhilber D. (1996).** Instrumentelle Analytik für Pharmazeuten. Jungjohann Verlag bei G. Fischer, Ulm
- Douglas D.J., Ramsey U.P., Walter J.A., Wright J.L.C., (1992).** Biosynthesis of the Neurotoxin Domoic Acid by the Marine Diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseriis*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 714-716
- Edmunds J.S.G., McCarthy R.A., Ramsdell J.S. (1999).** Ciguatoxin Reduces Larval Survivability in Finfish. *Toxicon*, 37, 1827-1832
- Erlanger B.F. (1973).** Principles and Methods for the Preparation of Drug Protein Concentration for Immunological Studies. *Pharmacol. Rev.*, 25, 271-280
- Fernández M.L., Shumway S., Blanco J. (2003).** Management of Shellfish Resources. In Hallegraeff, G.M., Anderson D.M., Cembella A.D., Enevoldsen H.O., (eds). Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC/UNESCO, Paris, 657-692
- Freudenthal A.R. (1990).** Public Health Aspects of Ciguatera Poisoning Contracted on Tropical Vacations by North American Tourists. In: Graneli E., Sundström B., Edler L., Anderson D.M., (eds). Toxic Marine Phytoplankton. Elsevier, New York, 463-468

- Fritz L., Quilliam M.A., Wright J.L.C., Beale A.M., Work T.M. (1992).** An Outbreak of Domoic Acid and Poisoning Attributed to the Pinnate Diatom *Pseudonitzschia australis*. *J. Phycol.*, 28, 438-442
- Fryxell G.A., Villac M.C., Shapiro L.P. (1997).** The Occurrence of the Toxic Diatom Genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) on the West Coast of the USA, 1920-1996: a review. *Phycologia*, 36, 419-437.
- Fujiki H., Suganuma M., Suguri H., Yoshizawa S., Tagai K., Uda N., Wakamatsu K., Yamada K., Murata M., Yasumoto T. (1988).** Diarrhetic Shellfish Toxin, Dinophysistoxin-1, is a Potent Tumorpromotor on Mouse Skin. *Jpn. J. Cancer Res.*, 79, 1089-1093
- Geraci J.R., Anderson D.M., Timperi R.J., St. Aubin D.J., Early G.A., Prescott J.H., Mayo C.A. (1989).** Humpback Whales Fatally Poisoned by Dinoflagellate Toxin. *Can. J. Fish Res. Aquat. Sci.*, 46, 1895-1898
- Giordano G., White C.C., Mohar I., Kavanagh T.J., Lucio G. Costa L.C. (2007).** Glutathione Levels Modulate Domoic Acid-Induced Apoptosis in Mouse Cerebellar Granule Cells. *Toxicol. Sci.*, 100, 433-444
- Goding J.W. (1996).** Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press, London
- Green N.M., (1975).** Three-Dimensional Structures of Avidin and the Avidinbiotin-Complex. *Adv. Protein Chem.*, 29, 85-133
- Guiland F. (1999).** Unusual Mortality Event - Domoic Acid Toxicity in California Sea Lions (*Zalophus californianus*) Stranded along the Central California Coast, May-October 1998. NOAA Technical Memorandum NMFS-OPR-8. U.S. National Marine Fisheries Service, Washington, DC, 30-38
- Hallegraeff G.M. (1993).** A Review of Harmful Algal Blooms and Their Apparent Global Increase. *Phycologia*, 32, 79-99
- Hampson D.R., Manolo J.L. (1998).** The Activation of Glutamate Receptors by Kainic Acid and Domoic Acid. *Nat. Toxins*, 6, 153-158
- Harlow E., Lane D. (1988).** Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Hasle G.R. (1995).** *Pseudo-nitzschia pungens* and *P. multiseriata* (Bacillariophyceae): Nomenclatural History, Morphology and Distribution. *J. Phycol.*, 31, 428-435

Hirama M., Oishi T., Uehara H., Inoue M., Maruyama M., Oguri H., Satake M. (2001). Total Synthesis of Ciguatoxin CTX3C. *Science*, 294, 1904-1907

Holland P., McNabb P. (2003). Inter-laboratory Study of an LC-MS Method for ASP & DSP Toxins in Shellfish. Cawthron Report No. 790. Cawthron Institute, New Zealand

Ibelgaufts H. (1993). Gentechnologie von A bis Z. VCH, Weinheim

Iverson F., Truelove J., Nera E., Tryphonas L., Campbell J., Lok E. (1989). Domoic Acid Poisoning and Mussel-associated Intoxication: Preliminary Investigations into the Response of Mice and Rats to Toxic Mussel Extract. *Food Chem. Toxicol.*, 27, 377-384

Iverson F., Truelove J. (1994). Toxicology and Seafood Toxins: Domoic Acid. *Nat. Toxins*, 2, 334–339

Iverson F., Truelove J., Tryphonas L., Nera E.A. (1990). The Toxicology of Domoic Acid Administered Systemically to Rodents and Primates. *Can. Dis. Wkly. Rep.*, 16, 15–18

Johnston B.A., Eisen H., Fry D. (1991). An Evaluation of Several Adjuvant Emulsion Regimens for the Production of Polyclonal Antisera in Rabbits. *Lab. Animal. Sci.*, 41, 15-21

Kemeny D.M. (1994). ELISA - Anwendung des *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* im biologisch/medizinischen Labor. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Kvasnicka F., Sevcik R., Voldrich M. (2006). Determination of Domoic Acid by On-line Coupled Capillary Isotachopheresis with Capillary Zone Electrophoresis. *J. of Chromatography A.*, 1113, 255–258

Laemmli U. (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685

Landsberg J.H. (1996). Neoplasia and Biotoxins in Bivalves: Is There a Connection? *J. Shellfish Res.*, 15, 203-230

Landsberg J.H., Balazs G.H., Steidinger K.A., Baden D.G., Work T.M., Russel D.J. (1999). The Potential Role of Natural Tumor Promoters in Marine Turtle Fibropapillomatosis. *J. Aquat. Anim. Health*, 11,199-210

Lawrence J.E., Bauder A.G., Quilliam M.A., Cembella A.D. (1998). *Prorocentrum lima*: A Putative Link to Diarrhetic Shellfish Poisoning in Nova Scotia, Canada. In: Reguera B., Blanc J., Fernandez M.L., Wyatt T., (eds). Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission, Santiago de Compostela, 78-79

Lawrence J.F., Charbonneau C.F., Ménard C., Quilliam M.A., Sim P.G., (1989). Liquid Chromatographic Determination of Domoic Acid in Shellfish Products Using the Paralytic Shellfish Poison Extraction Procedure of the Association of Official Analytical Chemists. *J. Chromatogr. A*, 462, 349-356

Lewis R.J., Holmes M.J. (1993). Origin and Transfer of Toxins Involved in Ciguatera. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 106, 615-628

Laycock M.V., de Freitas A.S.W., Wright J.L.C. (1989). Glutamate Agonists from Marine Algae. *J. Appl. Phycol.*, 1, 113-122

Liston, A.J. (1990). Domoic Acid Toxicity. Introduction. *Can. Dis. Wkly. Rep.*, 16, 1-2

Lottspeich F., Zorbas H. (1998). Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Luckas B. (1995). Selektive Erfassung von Algentoxinen aus Krusten- und Schalentieren. *Chem. unserer Zeit*, 29, 68-75

Müller W.E.G., Belikov S.I., Kaluzhnaya O.V., Perovic-Ottstadt S., Fattorusso E., Ushijima H., Krasko A., Schröder H.C. (2007). Cold Stress Defense in the Freshwater Sponge *Lubomirskia baicalensis*, *FEBS J.*, 274, 23-36

Müller W.E.G., Schröder H.C. (1997). Bioaktive Substanzen aus Schwämmen: Gene weisen den Weg bei der Suche nach neuen Arzneimitteln. *Biol. unserer Zeit*, 27, 389-398

Nanoprobes (2006). Produktinformation Monomaleimido Nanogold, Katalognr. 2020A

Nguyen A.L., Luong J.H.T., Masson C. (1990). Capillary Electrophoresis for Detection and Quantitation of Domoic Acid in Mussels. *Anal. Lett.*, 23, 1621-1634

Nisbet I.C. (1983). Paralytic Shellfish Poisoning: Effects on Breeding Terns. *Condor*, 85, 338-345

- Pardo O., Yusà V., León N., Pastor A. (2007).** Development of a Pressurised Liquid Extraction and Liquid Chromatography with Electrospray Ionization-tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Domoic Acid in Shellfish. *J. Chromatogr. A*, 1154, 287-294
- Peng Y.G., Taylor T.B., Finch R.E., Switzer R.C., Ramsdell J.S. (1994).** Neuroexcitatory and Neurotoxic Actions of the Amnesic Shellfish Poison, Domoic Acid. *Neuroreport*, 5, 981-985
- Peters J.H., Baumgarten H. (1990).** Monoklonale Antikörper. Springer Verlag, Berlin
- Pocklington R., Milley J.E., Bates S.S., Bird C.J., De Freitas A.S.W., Quillam M.A. (1990).** Trace Determination of Domoic Acid in Seawater and Phytoplankton by High-performance Liquid Chromatography of the Fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC) Derivative. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 38, 351-368
- Poli M.A., Mende T.J., Baden D.G. (1986).** Brevetoxins, Unique Activators of Voltage-sensitive Sodium Channels, Bind to Specific Sites in Rat Brain Synaptosomes. *Mol. Pharmacol.*, 30, 129-135
- Preston E., Haynie I. (1991).** Transfer Constants for Blood-brain Barrier Permeation of the Neuroexcitatory Shellfish Toxin, Domoic Acid. *Can. J. Neurolog. Sci.*, 18, 39-44
- Quilliam M.A., Gilgan M., Pleasance S., De Freitas A.S.W., Douglas D., Fritz L., Hu T., Marr J.C., Smyth C., Wright J.L.C. (1993).** Confirmation of an Incident of Diarrhetic Shellfish Poisoning in Eastern Canada. *In: Smayda T.J., Shimizu Y.*, (eds). Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam, 547-552
- Quilliam M.A., Thomas K., Wright J.L.C. (1998).** Analysis of Domoic Acid in Shellfish by Thin-layer Chromatography. *Nat. Toxins*, 6, 147-152
- Quilliam M.A., Wright J.L.C. (1989).** The Amnesic Shellfish Poisoning Mystery. *Anal. Chem.*, 81, 1053-1060
- Quilliam M.A. (1995).** Analysis of Diarrhetic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish Tissue by Liquid Chromatography with Fluorometric and Mass Spectrometric Detection. *J. AOAC Int.*, 78, 555-570
- Ramsdell J. (2007).** The Molecular and Integrative Bases to Domoic Acid Toxicity. *In: Botana L.*, (ed). Phycotoxins Chemistry and Biochemistry. Blackwell Publishing, New York, 223-250

- Ramsey U.P., Douglas D.J., Walter J.A., Wright J.L.C. (1998).** Biosynthesis of Domoic Acid by the Diatom *Pseudo-nitzschia multiseriis*. *Nat. Toxins*, 6, 137-146
- Rehm H. (2000).** Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Rittenberg G.M.B., Amkraut A.A. (1966).** Immunogenicity of Trinitrophenyl-Hemocyanin; Production of Primary and Secondary Anti-hapten Precipitins. *J. Immunol.*, 97, 421-430
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989).** Coupling of Synthetic Peptides to Keyhole Limpet Hemocyanin. *In: Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., (eds). Molecular Cloning, a Laboratory Manual 3.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 18.8-18.9
- Schaaper W.M.M., Lankhof H., Pujik W.C., Meloen R.H. (1989).** Manipulation of Antipeptide Immune Response by Varying the Coupling of the Peptide with the Carrier Protein. *Mol. Immunol.*, 26, 81-85
- Sinclair J., Westrick J. (2001).** Creating a Cyanotoxin Target List for the Unregulated Contaminant Monitoring Rule. http://www.epa.gov/ogwdw/ucmr/pdfs/meeting_ucmr1_may2001.pdf
- Smayda T.J. (1997).** Harmful Algal Blooms: Their Ecophysiology and General Relevance to Phytoplankton Blooms in the Sea. *Limnol. Oceanogr.*, 42, 1137-1153
- Smayda T.J. (1990).** Novel and Nuisance Phytoplankton Blooms in the Sea: Evidence for a Global Epidemic. *In: Graneli E., Sundstrom B., Edler L., Anderson D.M., (eds). Toxic Marine Phytoplankton.* Elsevier, New York, 29-40
- Staros J.V., Wright R.W., Swingle D.M. (1986).** Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of Water-soluble Carbodiimide-mediated Coupling Reactions. *Anal. Biochem.*, 156, 220-222
- Strain S.M., Tasker R.A.R. (1991).** Hippocampal Damage Produced by Systemic Injections of Domoic Acid in Mice. *Neuroscience*, 44, 343-352
- Stryer L. (1995).** Biochemistry, 4th Edition. W.H. Freeman and Co., New York
- Subba Rao D.V., Pan Y., Mukhida K. (1998).** Production of Domoic Acid by *Pseudo-nitzschia multiseriis* HASLE, Affected by Lithium. *Mar. Ecol.*, 19, 31-36

Suganuma M., Fujiki H., Suguri H., Yoshizawa S., Hirota M., Nakayasu M., Ojika M., Wakamatsu K., Yamada K., Sugimura T. (1988). Okadaic Acid - an Additional Non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type Tumor Promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85, 1768-1771

Tedder J.M., Nechvatal A., Murray A.W. et al. (1972). Amino-acids and Proteins. In: Tedder J.M., (ed). Basic Organic Chemistry. John Wiley and Sons Inc., London, 305-342

Thermo Fisher Scientific (2008). Herstellerprotokoll EZ-Link[®] Amin-PEO₃-Biotin Nr. 0750.4

Thermo Fisher Scientific (2008). Herstellerprotokoll PIERCE Thiophilic Adsorption Kit Nr. 0409.2

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76, 4350-4354

Traynor I.M., Plumpton L., Fodey T.L., Higgins C., Elliott C.T. (2006). Immunobiosensor Detection of Domoic Acid as a Screening Test in Bivalve Molluscs: Comparison with Liquid Chromatography-based Analysis. *J. of AOAC Int.*, 89, 868-872

Van Apeldoorn M.E. (1999). Amnesic Shellfish Poisoning: A review. RIVM Report 388802 19, 1-53

Van Dolah F.M., Finley E.L., Haynes B.L., Doucette G.J., Moeller P.D., Ramsdell J.S. (1994). Development of Rapid and Sensitive High Throughput Pharmacologic Assays for Marine Phycotoxins. *Nat. Toxins*, 2, 189-196

Van Dolah F.M. (2000). Marine Algal Toxins: Origins, Health Effects and Their Increased Occurrence. *Environ. Health Perspect.*, 108, 133-141

Van Dolah F.M., Leighfield T.A., Haynes B.L., Hampson D.R., Ramsdell J.S. (1997). A Microplate Receptor Assay for the Amnesic Shellfish Poisoning Toxin, Domoic Acid, Utilizing a Cloned Glutamate Receptor. *Anal. Biochem.*, 245, 102-105

Villac M.C., Fryxell G.A., Chavez F.P., Cifuentes L.A. (1993b). *Pseudo-nitzschia australis* Frenguelli and Related Species from the West Coast of the USA: Occurrence and Domoic Acid Production. *J. Shellfish Res.*, 12, 457-465

Villac M.C., Roelke D.L., Villareal T.A., Fryxell G.A. (1993a). Comparison of Two Domoic Acid-producing Diatoms; A Review. *Hydrobiologia*, 269/270, 213-224

Wengatz I., Schmid R.D., Kreissig S., Wittmann C., Hock B., Ingendoh A., Hillenkamp F. (1992). Determination of the Hapten Density of Immunoconjugates by Matrix-assisted UV Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Analyt. Lett.*, 25, 1983-1997

Wera S., Hemmings B. (1995). Ser/thr Protein Phosphatases. *Biochem. J.*, 311, 17-29

Wiens M., Luckas B., Brümmer F., Shokry M., Ammar A., Steffen R., Batel R., Diehl-Seifert B., Schröder H.C., Müller W.E.G. (2003). Okadaic Acid: A Potential Defense Molecule for the Sponge *Suberites domuncula*. *Mar. Biol.*, 142, 213-223

C., Hock B. (1989). Improved Enzyme Immunoassay for the Analysis of s-triazines in Water Samples. *Food Agric. Immunol.*, 1, 211-224

Work T.M., Barr B.B., Beale A.M., Fritz L., Quilliam M.A., Wright J.L.C. (1993). Epidemiology of Domoic Acid Poisoning in Brown Pelicans (*Pelicanus occidentalis*) and Brandt's Cormorants (*Phalacrocorax penicillatus*) in California. *J. Zool. Wildlife Med.*, 24, 54-62

Westermeier R., Gronau S., Schickle H. (1989). *Semidry-Blotting* von Proteinen aus SDS- und IEF-Polyacrylamidgelen. Pharmacia. Freiburg, Sonderdruck SD 072

Wright, J.L.C. (1989). Domoic Acid, a New Shellfish Toxin: The Canadian Experience. *J. Shellfish Res.*, 8, 444-449

Wright J.L. Bird C.J., De Freitas A.S., Hampson D., McDonald J., Quilliam M.A. (1990). Chemistry, Biology, and Toxicology of Domoic Acid and Its Isomers. *Can. Dis. Wkly. Rep.*, 16, 21-26

Wright J.L.C., Quilliam M.A. (1995). Methods for Domoic Acid, the Amnesic Shellfish Poisons. *In: Hallegraeff G.M., Anderson D.M., Cembella A.D., Enevoldsen H.O., (eds). Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides No. 33, UNESCO, Paris, 113-133*

Yasumoto T., Murata M., Oshima Y., Matsumoto G., Clardy J. (1984). Diarrhetic Shellfish Poisoning. *In: Ragelis E.P., (ed). Seafood Toxins. American Chemical Society Symposium Series, 262, 207-214*

Yasumoto T., Oshima Y., Sugawara W., Fukuyo Y., Oguri H., Igarishi T., Fujita N. (1980). Identification of *Dinophysis fortii* as the Causative Organism of Diarrhetic Shellfish Poisoning. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 46, 1405-1411

Yasumoto T., Oshima Y., Yamaguchi M. (1979). Occurrence of a New Type of Shellfish Poisoning in Japan and Chemical Properties of the Toxin. *In:* Taylor D., Seliger H.H., (eds). Toxic Dinoflagellate Blooms. Elsevier, Amsterdam, 495-502

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die genannten Hilfsmittel verwendet zu haben. Des weiteren versichere ich, dass ich diese Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine andere Prüfung oder die gleiche oder Teile der Abhandlung als Dissertation bei einer anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich eingereicht habe.

Wiesbaden, August 2009

Melissa Faust

