

**Chemischer und mikrobiologischer Nachweis clostridialer
Neurotoxine als potentielle biologische Kampfstoffe unter
besonderer Berücksichtigung der Huminsäureproblematik**

vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover

zur Erlangung der Grades
Doktor der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

genehmigte
Dissertation

von

Dipl. Chem. Michael Höfer
geboren am 11. Juni 1964
in Heiligenhafen/Ostholstein

Hannover, im Mai 2002

Referent:

Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent:

Prof. em. Dr. Dr. h.c. Karl Schügerl

Tag der Promotion:

08. Mai 2002

Datum der Veröffentlichung:

für
Jori

in Liebe

Danksagung:

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1999 bis März 2002 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover angefertigt. Für die Betreuung und Unterstützung während dieser Zeit, vor allem aber dafür, dass er mir nach vier Jahren in der Armee wieder die Möglichkeit gegeben hat, wissenschaftlich zu arbeiten, möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper ganz herzlich danken.

Herrn Prof. em. Dr. Dr. h.c. Karl Schügerl danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Diese Arbeit wäre ohne Fürsprecher der Bundeswehr nicht möglich gewesen. Herrn Oberst Dr. Kalder und Herrn Oberst Dipl. Phys. Kramer möchte ich stellvertretend für all diejenigen militärischen Entscheidungsträger danken, die mir die Möglichkeit eingeräumt haben, meinen Wunsch zu erfüllen.

Herrn PD Dr. Roland Dierstein vom Wehrwissenschaftlichen Institut für Schutztechnologien der Bundeswehr in Munster sei ebenfalls mein aufrichtiger Dank dafür ausgesprochen, dass er von der wissenschaftlichen Seite der Bundeswehr sein Einverständnis für diese Arbeit gegeben und die fachliche Unterstützung der Abteilung Biologie des WIS zugesichert hat.

Bei allen Mitarbeitern der Abteilung Biologie des WIS möchte ich mich recht herzlich bedanken, vor allem dass sie mich in ihr wissenschaftlich kompetentes Team so offen und herzlich aufgenommen und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Ich freue mich schon jetzt auf eine künftige, fruchtbare Zusammenarbeit. Stellvertretend für viele Mitarbeiter danke ich Herrn Dr. Stefan Köhne für die wertvollen Tipps bei meinen ersten Schritten in die Welt der PCR, Frau Gudrun Grote für die Sequenzierung meiner PCR-Amplifikate, Frau Dr. Bärbel Niederwöhrmeier für die gründliche Einführung in die Tücken und Fallstricke der ELISA, die ich nur bestätigen kann und die zahlreichen Diskussionen zum Thema biologischer Kampfstoffe. Ohne ihre Hilfe, Unmengen an Antikörpern aufzureinigen zu lassen, wären viele Versuche nicht möglich gewesen.

Herrn Dr. Thomas Binz und Herrn Dipl. Chem. Andreas Rummel vom Institut für Physiologische Chemie der Medizinische Hochschule Hannover danke ich für die großzügige Bereitstellung des Tetanustoxoids und viele interessante und anregende Diskussionen zum Thema clostridialer Neurotoxine.

Herrn Steffen Rietz vom Institut für Zierpflanzenbau der Universität Hannover danke ich für wertvolle Tipps zur praktischen PCR und Gelelektrophorese.

Für die Zeit meiner Arbeit am Institut war die 1. Panzerdivision meine militärische Heimat. An dieser Stelle möchte ich stellvertretend für alle Mitarbeiter des Kommandos Herrn

Oberleutnant Ralf Jaep meinen besonderen Dank für seine stets freundliche und unbürokratische Hilfe in bezug auf alle militärischen Belange aussprechen.

Last not least möchte ich allen Mitarbeitern des TCI für ihre Hilfestellung, Unterstützung und freundliche Aufnahme danken. Stellvertretend für viele möchte ich mich bei einigen Mitarbeitern, auch ehemaligen, besonders bedanken.

Frau Martina Weiß für diverse Zeichnungen, die sie in Windeseile fertiggestellt hat. Ganz besonders aber für Tipps bei Aufbau und Wartung der HPLC.

Herrn Dr. Ivo Havlik und Herrn Dr. Michael Dors für manche Hilfe mit alten Rechnern, die dann doch wieder liefen.

Herrn Dr. Georg Renemann für seine Unterstützung bei ELISA und Disk-Chromatographie.

Herrn Dipl. Chem. Christian Harbeck für die Überlassung von *Cl. formicoaceticum* und die Einweisung in die Welt der 2D-Fluoreszenzspektroskopie.

Herrn Dipl. Chem. Marc Laroche für die Einweisung in FPLC und die praktische Hilfe bei meinen Kultivierungen – hat alles prima geklappt; außerdem für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herrn Dipl. Chem. Michael Fritzsche für Korrekturen dieser Arbeit, vor allem aber sein wertvolles Wissen um die Leistungsfähigkeit von Word 2000.

Um ehrlich zu sein, war das nicht ganz das Ende!

Die wissenschaftliche Arbeit hat mich begeistert – trotz oder vielleicht gerade wegen einiger Nackenschläge. Ohne eine Familie, die einen nach frustrierenden Versuchen immer noch zum Lachen bringt, wäre alles viel schwieriger gewesen. Ohne sie wären auch die Erfolge nur halbe Erfolge. Dafür danke ich meiner Frau Jorinde und meinen drei Kindern Sina, Alyn und Lennart.

Lebenslauf:

Persönliche Daten:

Name: Michael Höfer
Geburtsdatum: 11. Juni 1964
Geburtsort: Heiligenhafen / Ostholstein
Familienstand: verheiratet, 3 Kinder

Schulbildung:

08.1970 – 04.1972 Grundschole St. Augustin/Sieg
04.1972 – 07.1974 Grundschole Heiligenhafen
08.1974 – 04.1980 Gymnasium Oldenburg/Holstein
04.1980 – 06.1985 Gymnasium Springe/LK Hannover
Abschluss: Allgem. Hochschulreife
08.1981 – 07.1982 High-School North Royalton, Ohio
Abschluss: High-School Diplom

Beruflicher Werdegang:

01.07.1985 Eintritt in die Bundeswehr
14.06.1989 Ernennung zum Berufsoffizier
12.1996 – 03.1997 Führungsakademie der Bundeswehr
(Laufbahnprüfung für Stabsoffiziere)
03.1997 – 07.1999 Verwendung als Kompaniechef

Universitätsausbildung:

10.1989 – 09.1994 Chemiestudium an der Universität Hannover

Diplomarbeit:

10.1994 – 05.1995 Institut für Technische Chemie
Universität Hannover
„Bestimmung von Kohlenwasserstoffen in der Gasphase über wässrigen Systemen“

Dissertation:

07.1999 – 03.2002 Institut für Technische Chemie
Universität Hannover
„Chemischer und mikrobiologischer Nachweis clostridialer Neurotoxine als potentielle biologische Kampfstoffe unter besonderer Berücksichtigung der Huminsäureproblematik“

Abstract

Michael Höfer

Chemischer und mikrobiologischer Nachweis clostridialer Neurotoxine als potentielle biologische Kampfstoffe unter besonderer Berücksichtigung der Huminsäureproblematik

Die Bundesregierung hat Botulinustoxin (BotTX) neben 8 weiteren Toxinen als mögliche biologische Kampfstoffe eingestuft. Aufgrund ihrer hohen Letalität muss eine schnelle und empfindliche Methode angewandt werden, um sie in möglichst geringer Konzentration zu detektieren. In dieser Arbeit werden clostridiale Neurotoxine untersucht. Dazu zählen die 7 Serotypen des BotTX und das Tetanustoxin (TeTX). Es handelt sich dabei um Proteine mit einer Molekülmasse um 150kDa. Ihr Nachweis als Reinsubstanz gehört zur Standardanalytik. Ein Nachweis aus Boden oder Wasser stellt den Analytiker allerdings vor kaum lösbare Probleme, vor allem im Hinblick auf die maskierenden Effekte der Huminsäuren (HS).

Ziel war es, eine Aufreinigungsmethode zu entwickeln, die die empfindliche Analytik von Proteinen aus Oberflächenwässern und Boden gewährleistet. Die Arbeit gliedert sich in 2 Hauptteile. Im ersten Arbeitsteil wird der Einfluss der HS vor allem auf optische Analysemethoden untersucht. Hier konnte mittels 2D-Fluoreszenz gezeigt werden, dass bereits geringe Konzentrationen an HS die Fluoreszenz von Proteinen quenchen. Mittels MALDI-MS konnte ein stabiler Anlagerungskomplex zwischen HS und Proteinen nachgewiesen werden, der der Pseudomicellenbildung der HS zugeschrieben wird. Im zweiten Arbeitsteil werden verschiedene Analysemethoden mit dem Ziel etabliert, den Einfluss der HS zurückzudrängen oder aber den Komplex aufzubrechen. Parallel wird die Möglichkeit eines indirekten Toxinnachweises über die Gensequenz untersucht. Durch Zugabe von BSA und hohen $MgCl_2$ -Konzentrationen konnte eine PCR etabliert werden, mit der ein Nachweis auch in stark HS-belasteten Proben möglich wird. Für den direkten Toxinnachweis erschienen immunchemische Verfahren vielversprechend, um den HS-Einfluss zurückzudrängen. Es wurde u.a. ein direkter ELISA etabliert, der einen Nachweis von Toxin in bis zu $10\mu g/mL$ HS ermöglicht, aber nicht für stark HS-belastete Proben verwendet werden kann. Aus diesem Grund musste eine Aufarbeitung gefunden werden, die den HS-Toxin-Komplex aufbricht und damit den maskierenden Effekt unterbindet. Dazu wurde eine Methode etabliert, mit der TeTX reproduzierbar, quantitativ in Wasser und zu über 70% in Bodenproben nachgewiesen werden kann. Die Probe wird mit einer SDS-Lösung versetzt, wodurch das Toxin in eine SDS-Micelle gezwungen wird und so nicht mehr mit HS wechselwirken kann. Der Nachweis erfolgt anschließend über RP-HPLC mit einer C4-Säule und UV-Detektion bei 206nm.

Stichworte: Boden, Huminsäure, clostridiale Neurotoxine, TeTX, SDS, ELISA, PCR, RP-HPLC

Abstract

Michael Höfer

Chemical and microbiological detection of clostridial neurotoxins as potential biological weapons with special emphasis to the humic acid problem

The German government has categorised Botulinustoxin (BotTX) in addition to eight other toxins as potential biological weapons. Due to the high lethality of neurotoxins, a fast and sensitive method has to be applied, to prove toxins at low concentrations. This work studies clostridial neurotoxins, which consist of seven serotypes of BotTX and Tetanustoxin (TeTX) with a molecular mass of 150kDa. Today, detection of pure neurotoxins is a feasible task, but the downstream processing is the drawback especially when amounts of humic acids (HA) are involved.

The aim was to establish an extraction method that enables sensitive analysis of proteins from surface water and soil samples. This work is structured in two main parts. The first part tested the influence of HA particularly concerning optical analysis methods. Using 2D-Fluorescence it could be shown that the fluorescence of proteins is quenched even by small concentrations of HA. MALDI mass spectroscopy indicated the composition of a strong addition-complex between HA and proteins that was assigned to a pseudo micellar formation of HA. The objective of the second section was to establish various analytical methods that enables the repelling of HA influences and to break open the complex. An indirect detection method for toxins by means of PCR was developed in parallel by adding high concentrations of $MgCl_2$ and BSA that permits detection in highly HA loaded samples. For direct toxin detection immunological methods showed great promise to repress HA effects. Among others a direct ELISA was established that enables detection at concentrations up to $10\mu g/mL$ HA. To prevent the masking influence of HA a methods had to be found to force open the complex. A reproducible, in water samples quantitative method was evolved by adding SDS to the crude samples. The recovery rate of toxin in soil sample extract amounted to more than 70%. Toxins were driven into the SDS-Micelles so HA could not interact with them. The subsequent detection resulted from Reversed Phase (RP)-HPLC with a C4-column and UV-detection at 206nm.

Key words: soil, humic acids, clostridial neurotoxins, TeTX, SDS, ELISA, PCR, RP-HPLC

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung und Zielsetzung.....	1
2	Definieren von Modellorganismen und -systemen.....	2
3	Theoretische Grundlagen.....	3
3.1	Biologische Kampfstoffe	3
3.1.1	Geschichtlicher Abriss	3
3.1.2	Völkerrechtliche Abkommen	4
3.1.3	Vergleich biologischer Waffen (BW) und Toxinwaffen (TW).....	5
3.1.3.1	Bakterien	5
3.1.3.2	Toxine unter besonderer Berücksichtigung clostridialer Neurotoxine	6
3.1.4	Ausbringungsmöglichkeiten	9
3.2	Nachweis von BW und TW	9
3.3	Probleme des Nachweises von BW und TW durch Huminsäuren.....	10
4	Ergebnisse	12
4.1	Ermittlung von Störgrößen.....	12
4.1.1	Allgemeine Eigenschaften von Proteinen	12
4.1.2	Optische Methoden	12
4.1.2.1	Vergleich von Proteinschnelltests	14
4.1.2.2	2D-Fluoreszenz	16
4.1.3	MALDI-Massenspektroskopie.....	20
4.1.4	Bewertung und Folgerungen für das weitere Vorgehen	23
4.2	Nachweis proteolytischer Toxine.....	23
4.2.1	Indirekter Toxinnachweis über die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	23
4.2.1.1	Prinzip der PCR	24
4.2.1.2	Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese	25
4.2.1.3	Methodenentwicklung.....	26
4.2.1.4	Ergebnisse	29
4.2.2	Immunologische Nachweise aufgrund von Affinitätswechselwirkungen.....	31
4.2.2.1	ELISA	32
4.2.2.2	Halb-Quantitativer ELISA mit Nunc-Immuno Sticks	39
4.2.2.3	High Performance Monolithic Affinity Disk Chromatography	41
4.2.2.4	Vergleich der untersuchten immunologischen Methoden.....	45
4.2.3	Nachweis von TeTX durch RP-HPLC	45
4.2.3.1	Ziel	46
4.2.3.2	Etablieren einer Analytik mit BSA als Modellprotein.....	46
4.2.3.3	Übertragen der Ergebnisse von BSA auf TeTX als Zielprotein	54
4.2.3.4	Nachweis von TeTX in Realproben.....	55
4.2.3.5	Zusammenfassung der HPLC-Ergebnisse.....	58

5	Schlussbetrachtung	60
6	Ausblick	62
7	Anhang	63
7.1	Theorieteil	63
7.1.1	Pestepidemie im 14. Jahrhundert	63
7.1.2	Definition chemischer Kampfstoffe gemäß CWÜ	63
7.1.3	Letale Dosen ausgewählter CW und TW	64
7.1.4	Biologische Waffen des IRAK nach eigener Erklärung	64
7.1.5	Huminsäure	65
7.2	Optische Nachweise	66
7.2.1	UV/VIS-Spektren von Huminsäure	66
7.2.2	BCA-Test	66
7.2.3	Coomassie-Test.....	68
7.2.4	2D-Fluoreszenz	69
7.3	Massenspektrometrische Nachweise mit MALDI-MS	70
7.3.1	MALDI-Spektren der untersuchten Matrices	70
7.3.2	MALDI-Spektren von BSA und Huminsäure in unterschiedlichen Matrices	72
7.3.3	MALDI-Spektren von TeTX in Sinapinsäure.....	73
7.4	PCR	74
7.4.1	Gelelektrophorese	74
7.4.2	Medienzusammensetzung	74
7.4.3	Sequenz der ribosomalen 16S-rDNA von <i>Cl. formicoaceticum</i>	75
7.4.4	Formel zur Berechnung der Annealing-Temperatur von Oligonucleotiden	75
7.4.5	Sequenzierung des amplifizierten Templates.....	76
7.4.6	Vergleich verschiedener PCR-Kits	77
7.5	Immunochemische Nachweise.....	78
7.5.1	Eingesetzte Immunreagenzien	78
7.5.2	ELISA	79
7.5.2.1	Indirekter ELISA.....	79
7.5.2.2	Direkter ELISA	82
7.5.3	Diskchromatographie	86
7.5.3.1	Antikörper-Immobilisierung auf Disk	86
7.5.3.2	Schematischer Aufbau der chromatographischen Anlage	87
7.6	RP-HPLC	87
7.6.1	Huminsäure-Konzentrationen	87
7.6.2	Probenvorbereitung.....	87
7.6.3	Eingesetzte Detergenzien	88
7.6.4	Bodenparameter, Speyer	88
7.7	Abkürzungsverzeichnis	89
8	Literaturverzeichnis	92

1 Einleitung und Zielsetzung

Das Thema dieser Dissertation gewinnt durch die Ereignisse in den USA ungewollt an Aktualität. Biologische Waffen sind nicht erst seit den Milzbrandanschlägen in den USA in das Bewusstsein der Öffentlichkeit gedrungen.

1998 zitierte das Nachrichtenmagazin „Der Spiegel“ den ehemaligen stellvertretenden Leiter der sowjetischen Pharmaziebehörde, Biopreparatⁱ, Ken Alibek: „...dass die weltweit möglicherweise verbreitetste Biowaffe seinen Namen trägt: der Alibekov-Milzbrand, ein bernsteinfarbener Puder aus infektiösen Partikeln, die sich in der Luft blitzschnell extrem fein verteilen und dann kilometerweit mit dem Wind treiben können. Sowjetische Mikrobiologen ... könnten dieses Pulver nach dem Zusammenbruch der Sowjetunion in den Irak, nach Syrien, Libyen, China, Iran, vielleicht auch nach Israel oder Indien gebracht haben¹.“

Aber auch im terroristischen Bereich wurden bereits biologische Kampfstoffe eingesetzt. Vor ihrem Giftgasanschlag mit Sarin, 1995 in der Tokioer U-Bahn, soll die Aum-Sekte bereits mehrere vergebliche Anschläge mit bakteriologischen und chemischen Kampfmitteln durchgeführt haben. 1990 versuchte sie vier Angriffe auf die Tokioter Bevölkerung mit Botulinustoxin (BotTX)².

Die Bundesregierung hat BotTX neben 8 weiteren Toxinen als mögliche biologische Kampfstoffe eingestuft³. Es zählt neben Tetanustoxin (TeTX) zu den clostridialen Neurotoxinen, deren Nachweis Gegenstand dieser Arbeit ist.

Clostridiale Neurotoxine sind proteolytische Toxine mit einer Molekülmasse um 150 kDa. Ihr Nachweis als Reinsubstanz gehört zur Standardanalytik. Ein Nachweis aus Umweltproben wie Boden oder Wasser stellt den Analytiker allerdings vor kaum lösbare Probleme, vor allem im Hinblick auf die maskierenden Effekte der Huminsäuren (HS).

Ziel ist eine Aufreinigungsmethode, die die empfindliche Analytik von Proteinen aus Oberflächenwässern und Boden gewährleistet. Dazu sollen verschiedene Aufarbeitungs- und Analyseverfahren verglichen, optimiert und verifiziert werden. Nach dem Definieren von Modellsubstanzen und -systemen, die sich für die anstehenden Arbeiten eignen, soll der Einfluss von Huminsäure auf verschiedene Analysemethoden untersucht werden und eine quantitative Analytik zum Nachweis von Toxin in Boden- und Wasserproben etabliert werden.

ⁱ Geheimes Biowaffen-Programm der ehemaligen Sowjetunion

2 Definieren von Modellorganismen und -systemen

Die Arbeiten mit *Clostridium (Cl.) botulinum* und BotTX sind gemäß Infektionsschutzgesetzⁱⁱ in Laboratorien durchzuführen, die der Sicherheitsstufe 2 entsprechen. Da im Institut nur mit Substanzen und Organismen der Sicherheitsstufe 1 gearbeitet werden darf, wurde als Modellsubstanz für die Toxinanalytik das 50%-Homologe Tetanustoxin (TeTX) gewählt, das als ungiftiges Toxoid bezogen wurde und entsprechend eingestuft ist. Für allgemeine Fragestellungen zur Proteinanalytik wird Rinderserumalbumin (BSA) als Modellsubstanz eingesetzt. Für die mikrobiologischen Arbeiten mit Zellen und Zellfragmenten bzw. DNA wird statt *Cl. botulinum* das Bakterium *Cl. formicoaceticum* eingesetzt, das ebenfalls in der Risikogruppe 1 eingestuft ist.

Nach Etablieren der unterschiedlichen Analysemethoden, wird mit der Aufreinigung der Proben begonnen. Dazu werden Modellsysteme definiert, um mit einer überschaubaren Anzahl variabler Parameter reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten. Destilliertes Wasser wird mit verschiedenen Konzentrationen HS versetzt, die den HS-Gehalt verschiedener Wässer nachbilden. Der Gehalt beträgt zwischen 1 µg/mL und 200 µg/mL HS. Als Modell für Boden wird Quarzsand gewählt, der ebenfalls mit verschiedenen HS-Konzentrationen dotiert wird. Dadurch werden weitere störende Einflüsse wie Bodeninhaltsstoffe und die Mikrostruktur des Bodens ausgeschlossen.

Die im Anschluss untersuchten realen Wasserproben stammen aus der Umgebung Hannovers. Als Realboden wird Lösboden aus der Gegend um Speyer eingesetzt, dessen grundlegenden Parameter bekannt sind.

ⁱⁱ vormals Bundesseuchengesetz

3 Theoretische Grundlagen

Im folgenden werden Biologische Kampfstoffe sowie die Möglichkeiten ihres Einsatzes als biologische Waffen (BW) dargestellt. Was Deutschland betrifft, müssen die Gefahren, die von BW ausgehen, vor dem Hintergrund des internationalen Terrorismus und eines erweiterten und damit globalen Aufgabenspektrums der Bundeswehr gesehen werden⁴.

3.1 Biologische Kampfstoffe

BW oder andere Kampfstoffe biologischen Ursprungs sind in Bezug auf die benötigte Menge gefährlicher als chemische Kampfstoffe (CW)⁵. Die Bedrohung durch BW hat in den letzten Jahren zugenommen. Zum einen sind es die Fortschritte biochemischer und biotechnologischer Forschung, zum anderen werden zur Herstellung nur einmalig geringste Mengen eines Mikroorganismus benötigt, um ihn zu kultivieren. In der Folgezeit müssen zwar je nach Umfang größere Mengen notwendiger Medieninhaltsstoffe beschafft werden, um diese Organismen zu kultivieren, dabei handelt es sich aber um Substanzen, die als „dual-use“ Produkteⁱⁱⁱ problemlos auf dem zivilen Markt erhältlich sind und ebenso wie die zur Kultivierung benötigten Apparaturen, Gefäße und Trocknungsgeräte kaum überprüft werden können⁶. Daher ist es weitaus schwieriger, im Rahmen internationaler Exportkontrollen, Proliferation^{iv,7} wirksam einzudämmen.

3.1.1 Geschichtlicher Abriss

Mikroorganismen sind ein ständiger Begleiter des Menschen. Unsichtbar für das bloße Auge nützen sie uns, indem sie uns zum Beispiel bei der Verdauung unserer Nahrung helfen. Sie schädigen uns, weil sie Krankheiten auslösen vom einfachen Schnupfen bis zum furchtbaren Pesttod (s. Anhang 7.1.1). Schon früh hat sich der Mensch die krankmachenden Eigenschaften der Mikroorganismen zu Nutze gemacht, um gegenüber einem Feind einen Vorteil zu erlangen, obwohl er lediglich die Auswirkungen – die Krankheit, nicht aber den Verursacher – den Mikroorganismus kannte. Erst Ende des 19. Jahrhunderts kamen einige Wissenschaftler den Verursachern von Krankheiten auf die Spur und führten sie auf Bakterien und Viren zurück. 1877 isolierte Robert Koch den Milzbranderreger (*Bacillus anthracis*) und führte 1888 erste erfolgreiche Impfversuche an Tieren durch⁸. Erst dieses Wissen über die Auslöser von Krankheiten führte Anfang des 20. Jahrhunderts in den Ländern mit fortschrittlichster

ⁱⁱⁱ Die Eigenschaft sowohl militärisch als auch zivil genutzt zu werden

^{iv} Proliferation chemischer und biologischer Waffen beinhaltet die Weiterverbreitung des Besitzes oder die Fähigkeit sie herzustellen

Industrialisierung wie Japan, den USA und einigen europäischen Ländern zu gezielter militärischer Forschung⁹.

Im vergangenen Jahrhundert gab es mit Ausnahme Japans im 2. Weltkrieg keine nachweisbaren Großeinsätze von BW. Der Einsatz von BW in der jüngeren Geschichte entschied keine Schlacht und schon gar keinen Krieg, allerdings hatte der Besitz oder der vermutete Besitz eine große psychologische Wirkung auf die Kriegsgegner, eigene BW nicht einzusetzen. Ein Grund für das Zögern mag auch die Sorge einer unkontrollierten Ausbreitung der Krankheitserreger gewesen sein. In Großbritannien wurden 1942/43 auf der Insel Gruinard^v Effektivitätstests mit Anthrax-Sporen durchgeführt. Es dauerte fast 50 Jahre, bis die Insel 1990 wieder als milzbrandfrei an den ehemaligen Eigentümer zurückgegeben werden konnte¹⁰.

Im ausgehenden 20. Jahrhundert hat es jedoch viel Bewegung im Bereich BW gegeben. Geheime Programme wurden aufgedeckt und die Öffentlichkeit wendet sich dieser Thematik verstärkt zu. Für Aufsehen sorgt das geheime BW-Programm des Irak, das so weit gediehen war, dass sowohl Bakterien (Anthrax-Sporen) als auch Toxine (von *Clostridium perfringens* und *Clostridium botulinum*) als Waffen einsatzbereit waren¹¹. Der Einsatz von Milzbrandsporen und Botulinustoxin durch die japanische Aum-Sekte 1990 in Tokio¹² gehört zu den ersten umfangreichen Einsätzen biologischer Waffen durch Terroristen. 1993 gab der damalige russische Präsident Boris Jelzin zu^{vi}, dass die damalige SU entgegen völkerrechtlich verbindlicher Verträge offensiver BW-Forschung betrieben hat¹³. Einen Überblick über Einsätze von BW im 20. Jahrhundert gibt der FAO-Bericht von 1995¹⁴.

3.1.2 Völkerrechtliche Abkommen

Schon früh wurde versucht, den Einsatz von chemischen und biologischen Waffen zu verhindern. Ein erster Versuch chemische und biologische Waffen als Mittel der Kriegführung zu ächten, war die Genfer Konvention vom 17.6.1925, die den Gebrauch erstickender, giftiger oder anderer Gasen im Krieg, aber auch die bakteriologische Kriegführung verbot. 1972 wurde die Biological Weapons and Toxins Convention (BWTC). verabschiedet, die am 26.03.1975 in Kraft trat und bis heute von 144 Staaten ratifiziert wurde. Allerdings ist sie wegen fehlender Verifikationsmechanismen leicht zu umgehen¹⁵. In der BWTC nehmen Toxinwaffen (TW) eine besondere Rolle ein. Sie werden heutzutage aus historischen Gründen sowohl zu den biologischen aber auch den chemische Kampfstoffen gezählt. Da es sich um

^v im Nordosten Schottlands gelegen

^{vi} In einem Interview, das Jelzin 1993 der Zeitung *Komsomolskaya Pravda* gab und das am 27.05.1993 veröffentlicht wurde

Stoffwechselprodukte lebender Organismen handelt, fehlt ihnen die Möglichkeit, sich im befallenen Organismus zu vervielfältigen¹⁶ und damit die Voraussetzung, um als biologischer Kampfstoff eingeordnet zu werden. Sie werden allerdings in ähnlichen Einrichtungen hergestellt wie biologische Kampfstoffe und sind daher Bestandteil der BWTC^{vii}. Betrachtet man die Definition chemischer Kampfstoffe, wie sie im völkerrechtlich verbindlichen Chemiewaffenübereinkommen (CWÜ) von 1993 festgehalten wurde, müssen Toxine zu den chemische Kampfstoffen gezählt werden (Definition: s. Anhang 7.1.2).

3.1.3 Vergleich biologischer Waffen (BW) und Toxinwaffen (TW)

Unter biologischen Kampfstoffen versteht man krankheitserregende (pathogene) Bakterien und Viren. Dabei handelt es sich um lebende, sich reproduzierende Mikroorganismen, die den Körper eines Organismus infizieren und Tod oder Krankheit verursachen. Sie können ansteckend sein, müssen aber nicht. Seit Unterzeichnung des BWTC, 1972, zeichnete sich eine Interessenverschiebung von bakteriellen zu viralen BW ab¹⁷. Die Kultivierung viraler BW wie Variola (Pocken) und Ebola ist bedeutend gefährlicher, aber auch technologisch aufwendiger als die von Bakterien¹⁸. Daher ist eine Bedrohung bakterieller BW und TW durch Schwellenländer oder Terroristen wahrscheinlicher. Im Gegensatz dazu sind Toxine hochgiftige, biochemische Stoffwechselprodukte, die von lebenden Organismen stammen¹⁹. Auch hier zeichnet sich ein Schwerpunktverlagerung hin zu TW ab, da in den 60er Jahren nur zwei Toxine als TW angesehen wurden, in den 80ern schon mehr als zwanzig²⁰. Der Hauptgrund liegt darin, dass Toxine eine weitaus schnellere Wirkung zeigen als BW und damit von potentiell größerem Interesse für das Militär sind²¹.

3.1.3.1 Bakterien

Zu den bereits waffenfähigen Bakterien gehören unter anderen *Clostridium botulinum*, *Corynebacterium diphtheria*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis* und *Vibrio cholerae*²². Sie verursachen Botulismus, Diphtherie, Milzbrand, Pest, Tularämie und Cholera und damit Krankheiten, die vor allem die Zivilbevölkerung treffen und hier insbesondere Menschen, die über geringe Abwehrkräfte verfügen.

Bakterien an sich sind für Menschen ungefährlich. Ihre Pathogenität hängt von der Fähigkeit ab, krankmachende Toxine zu bilden. Als Beispiel sei hier das Anthrax-Bakterium erwähnt. Die japanische Aum-Sekte versuchte die Tokioter Bevölkerung durch Milzbrand-Sporen zu

^{vii} US Präsident Nixon entschied 1970, dass Vorbereitung und Einsatz von Toxinen von den USA als kriegerischer Akt betrachtet würden. Vgl. in „Background paper relating to the Convention on the Prohibition of the Development, Production and Stockpiling of Bacteriological (Biological) and Toxin Weapons and on the Destruction.“ UN document BWC/CONF.I/4, 20.02.1980

vergiften. Jahrelang forschten Wissenschaftler der Sekte im Auftrag ihres Gurus Asahara und kultivierten kiloweise Anthrax-Sporen. Versuche, die Sporen in Tokio zu verbreiten, sind mehrfach belegt. Glücklicherweise hat die Sekte anfänglich einen apathogenen Stamm erstanden und kultiviert, der das Toxin nicht bildet, so dass eine Milzbrand-Epidemie in Tokio ausblieb²³. Im Gegensatz dazu entwickelte die SU einen hochpathogenen Anthrax-Stamm, der nach seinem Entdecker als Alibekov-Milzbrand bezeichnet wird²⁴. Gerade sporenbildende Bakterien der Gattungen *Bacillus* und *Clostridium* sind besonders geeignet, da ihren Sporen große Temperaturschwankungen, Strahlung, geringer Sauerstoffgehalt und andere ungünstige Umgebungseinflüsse nichts ausmachen. Dazu kommt noch ihre lange Haltbarkeit, die Sporen zu idealen BW werden lassen. Dennoch bleiben Mikroorganismen unkontrollierbar. Die hohe Resistenz, die sich beispielhaft auf der Insel Gruinard gezeigt hat, schränken den Einsatz von BW wiederum ein, sofern der betroffene Bereich später wieder genutzt werden soll.

3.1.3.2 Toxine unter besonderer Berücksichtigung clostridialer Neurotoxine

Genauso wie Bakterien sind Toxine militärisch interessant. Sie sind ähnlich leicht verfügbar und besitzen bedingt durch ihre Stabilität eine nahezu unbegrenzte Haltbarkeit. Bei einem Einsatz von Bakterien oder Viren ist die Gefährdung eigener Kräfte nie völlig auszuschließen. Toxinwaffen (TW) haben den Vorteil eines berechenbaren Einsatzes. Sie zersetzen sich nach bestimmter Zeit durch Umwelteinflüsse wie UV-Einstrahlung, Temperaturschwankungen oder Hydrolyse. Doch das steigende Interesse der Militärs an Toxinen seit den 80er Jahren hat noch andere Gründe²⁵. Die Möglichkeiten der Gentechnik erlauben die Produktion großer Mengen, aber auch die Derivatisierung unter Beibehaltung oder Verstärkung der toxischen Wirkung. Da Toxine auch in der Medizin als therapeutische Arzneimittel eingesetzt werden, wie z.B. Botulinustoxin²⁶, könnten im Rahmen dieser dual-use Fähigkeit wissenschaftliche Erkenntnisse auch militärisch genutzt werden. Gegenüber einem chemischen Kampfstoff, wie z.B. der bisher toxischste Nervenkampfstoff VX^{viii}, besitzen die meisten Toxine eine um Potenzen höhere Toxizität (s. Anhang, Tabelle 18). Im folgenden Abschnitt werden clostridiale Neurotoxine eingehender betrachtet.

Clostridiale Neurotoxine

Die von den obligat anaeroben Bakterien *Clostridium botulinum* und *tetani* produzierten Neurotoxine sind die stärksten uns bekannten Gifte. Während es nur ein Tetanusneurotoxin (TeTX) gibt, das Wundstarrkrampf verursacht, kennt man 7 strukturell ähnliche, aber antigen

^{viii} Methylphosphonsäure-O-ethyl-(diisopropylaminoethyl-)thiolester

unterschiedliche Botulinusneurotoxine (BotTX), die zu Botulismus führen. Aufgrund der ähnlichen Architektur, Verteilung funktioneller Domänen und der einheitlichen Wirkung der Proteasen, muss davon ausgegangen werden, dass sie sich aus einem Ursprungsgen entwickelt haben^{27,28}. Allen gemeinsam ist, dass sie an den neuromuskulären Knotenpunkten binden, wo sie in das Motoneuron internalisiert werden. Das TeTX wird retrograd axonal mit anschließender Transcyotose in die Interneuronen des Rückenmarks oder der Hirnrinde transportiert. Die sieben Serotypen des BotTX verbleiben am Eintrittsort und agieren direkt in der Nähe der Motoneuron-Membran. Die Serotypen des BotTX (A-G) verhindern die Ausschüttung des Neurotransmitters Acetylcholin (ACh) an den neuromuskulären Synapsen, wodurch die Muskelkontraktion verhindert wird²⁹. Dem entgegen verhindert TeTX die Ausschüttung inhibierender Neurotransmitter wie Glycin und γ -Aminobuttersäure (GABA), wodurch eine Muskeler schlaffung verhindert wird.

TeTX und die Serotypen A, B, E und F des BotTX sind für den Menschen gefährlich. Die Serotypen C und D verursachen hauptsächlich bei Tieren Botulismus. BotTX wirkt bei intravenöser und intraperitonealer Injektion oder bei Inhalation des Aerosols³⁰.

Strukturelle Eigenschaften

Alle clostridialen Neurotoxine werden als 150 kDa große einkettige Proteine synthetisiert, wobei die genetischen Sequenzen an verschiedene Stellen lokalisiert werden können. TeTX und BotTX G befinden sich auf Plasmiden, BotTX C und D auf Bakteriophagen, wohingegen die Serotypen A, B, E und F chromosomal vorliegen³¹. Die Toxine werden erst nach proteolytischer Spaltung in zwei Ketten durch bakterielle Proteasen wirksam (nicking). Die kleinere L-Kette hat eine Molekülgröße von 50kDa, die schwerere H-Kette von 100kDa. Sie kann noch weiter in zwei sich autonom faltende Domänen aufgeteilt werden, H_C und H_N. Die H_C-Domäne bindet das Toxin an die Nervenzelle, während die H_N-Domäne für die Translokation durch die Zellmembran verantwortlich ist. Im reduzierenden Cytosol wird die Disulfid-Brücke, die beide Ketten zusammengehalten hat und somit essentiell für die Toxizität ist³², gelöst.

Infektionswege

Es gibt drei mögliche Infektionswege. Wundstarrkrampf durch Tetanustoxin³³ und Wundbotulismus³⁴ treten durch Infektion nicht ausreichend gereinigter Wunden auf, aber auch durch Abszesse oder Tierbisse. Der Tod tritt bei 90% aller Fälle durch Herz-/Kreislaufversagen oder Atemlähmung ein³⁵. Durch den Verzehr nicht ausreichend konservierte Lebensmittel wie Wurstkonserven tritt Nahrungsmittelbotulismus auf (Botulus: griechisch Wurst), wobei hitzestabile Sporen nicht abgetötet wurden, auskeimen und die Bakterien sich vermehren kön-

nen. Das Toxin selbst ist hitzelabil und wird bei T: 80°C, über 5-10 min denaturiert³⁶. Neonataler Botulismus betrifft Säuglinge im ersten Lebensjahr, die die Sporen durch die Nahrung (z.B.: Honig) aufnehmen. Da Säuglinge eine noch nicht ausgereifte Darmflora besitzen, können die Sporen im Darmtrakt nicht verdaut werden und die Kinder erkranken³⁷.

Wirkung in der Nervenzelle

Clostridiale Neurotoxine wirken in 3 Teilschritten: Der erste Schritt beinhaltet die Bindung des Toxins an die Nervenzelle. Im zweiten Schritt erfolgt die Translokation der L-Kette durch die Zellmembran unter proteolytischer Spaltung des Toxins im reduzierenden Milieu des Cytosols und schließlich abhängig vom Serotyp die Vergiftung im Cytosol durch Exocytose und

damit Blockade der Neurotransmitter-Ausschüttung³⁸. Dies ist auf gezielte Proteolyse einzelner an der vesikulären Exocytose beteiligten Proteine durch die einzelnen Toxine zurückzuführen. TeTX und die Serotypen B, D, F und G des BotTX spalten an verschiedenen Stellen eine Peptidbindung des Vesikel-assoziierten Membranproteins (VAMP/Synaptobrevin 2). Die Serotypen A und E des BotTX spalten das Synaptosomen-assoziierte Protein von 25 kDa (SNAP-25)^{ix} an zwei verschiedenen Stellen innerhalb des C-Terminus

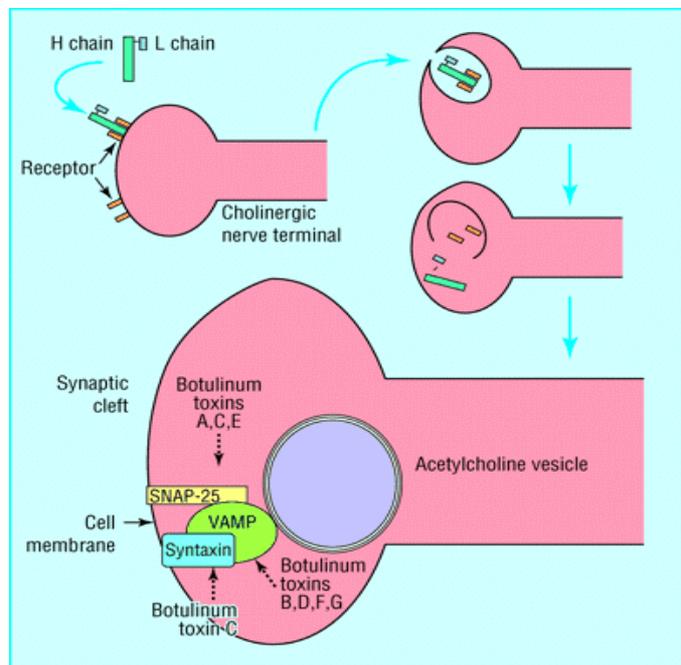


Abb.: 1, Wirkmechanismus nach Moore

und der Serotyp C das in der präsynaptischen Membran verankerte Protein Syntaxin^{39,40}.

Schutz und Heilung

Durch Impfung mit ungiftigem Tetanustoxoid wird ein wirksamer Schutz vor Wundstarrkrampf erreicht, der zu einer andauernden Immunisierung führt, die etwa alle 10 Jahre aufgefrischt werden muss. Gegen Botulismus ist ein Schutz durch Botulinum-Antiserum nur gegen die Typen A-E möglich⁴¹. Der Einsatz ist allerdings umstritten, da keine ausreichenden Erkenntnisse über Nebenwirkungen vorliegen.

Nach Auftreten der Symptome ist eine Behandlung nur noch mit bestimmten Antidoten mög

^{ix} synaptosomal associated protein 25 kDa

lich, die freies nicht vom Nervengewebe aufgenommenes Toxin binden können. Im fortgeschrittenen Stadium hilft bei Wundstarrkrampf lediglich die Gabe von Muskelrelaxantien. An Botulismus Erkrankte bedürfen der Intensivpflege durch künstliche Beatmung und Ernährung.

3.1.4 Ausbringungsmöglichkeiten

Wie die vergeblichen Versuche der japanischen Aum-Sekte gezeigt haben, ist nicht nur die Pathogenität einer Substanz entscheidend für den Erfolg oder Misserfolg eines militärischen oder terroristischen Anschlags, sondern auch die Art und Weise, wie eine biologische Waffe verteilt wird. Der Irak hat nach UNSCOM-Berichten große Anstrengungen unternommen und verschiedene einfache Ausbringungsmethoden untersucht, aber auch schon Anthrax-Sporen, Botulinus- und Aflatoxin einsatzbereit vorliegen gehabt (s. Anhang 7.1.4). Einsatzfähig waren Gefechtsköpfe für ballistische Kurz- und Mittelstreckenraketen, Bomben für Abwürfe aus der Luft und Sprühvorrichtungen, um BW/TW mit Hubschraubern auszubringen. Für Terrorattentäter, deren Ziel die Verbreitung von Angst ist, reicht die Möglichkeit eines vergleichsweise einfachen Einsatzes von Hubschraubern oder mit Artilleriegranaten völlig aus. Die Einsatzarten zeigen, dass sich der ausgebrachte BW/TW für einen gewissen Zeitraum als Aerosol in der Luft befinden wird, sich dann aber vor allem auf dem Boden oder in Bodennähe wiederfinden wird. Jeder Windstoss wird Sporen und TW in Bodennähe aufwirbeln. Die Versuche, die Großbritannien 1942/43 auf der Insel Gruinard durchgeführt hat, zeigen eindrücklich, wie lange ein ausgebrachter BW in der Umwelt überleben kann und welche Anstrengungen notwendig sind, um einen verseuchten Bereich wieder bewohnbar zu machen.

3.2 Nachweis von BW und TW

Der Nachweis biologischer Agenzien muss vor allem schnell erfolgen. Einer schnellen und eindeutigen Detektion eines pathogenen Organismus oder Substanz kann eine zielgerichtete und damit deutlich erfolgreichere Therapie folgen. Viele der heute verfügbaren Tests sind zeitintensiv und benötigen Stunden, zum Teil sogar Tage, bevor ein Ergebnis vorliegt. Eine weitere Anforderung an den Nachweis ist, dass er keine hohe Störanfälligkeit besitzen darf und einfach in der Handhabung sein muss. Im Bereich der Bundeswehr werden unter anderem nachfolgende Methoden einzeln oder in Kombination als erfolgversprechend eingestuft⁴²:

- Partikelzählgeräte wie Durchflußzytometer
- DNA-Nachweise wie PCR
- Massenspektroskopische Methoden
- Immuno-Assays

Analysemethoden, die Gegenstand dieser Arbeit sind, werden in den entsprechenden Kapiteln vorgestellt. Generell steht und fällt der Erfolg eines Nachweises mit der Reinheit des Analyten. Doch gerade Umweltproben zeichnen sich durch Heterogenität aus. Im Rahmen dieser Arbeit ist vor allem der maskierende Einfluss der Huminsäure (HS) Gegenstand der Untersuchungen und soll kurz betrachtet werden.

3.3 Probleme des Nachweises von BW und TW durch Huminsäuren

Das Wissen über Huminsäuren im Sinne einer umfassenden physikalisch-chemischen Stoffkenntnis ist immer noch unbefriedigend. Huminsäuren sind Biopolymere, die neben anderen Huminstoffen beim postmortalen Abbau biogener Materie, vor allem Lignin (s. Anhang Abb. 7.1: Strukturausschnitt eines Ligninmoleküls), gebildet werden⁴³. Sie sind allgegenwärtig in Boden, Sediment und Wasser. Huminstoffe machen bis zu 70% der organischen Bodensubstanz aus⁴⁴. Sie treten vergesellschaftet mit den restlichen 30% sogenannten Nicht-Huminstoffe auf, die zu den bekannten Klassen biochemisch synthetisierter Moleküle wie Aminosäuren, Kohlenhydrate, Proteine, Fette, Wachse, Lignin und ihren Ab- und Umwandlungsprodukten im Boden gehören⁴⁵. Damit manifestiert sich auch das Problem des Nachweises proteolytischer Toxine in einer humushaltigen Matrix. Da Huminstoffe in unterschiedlichen Milieus aus vielfältigen natürlichen Substanzen entstanden sind, weisen sie starke Unterschiede in ihrer chemischen Zusammensetzung, Struktur und Konfiguration auf und stellen stets Gemische von physikalischen und chemisch heterogenen organischen Verbindungen mit relativ hoher Molmasse und gelber bis schwarzer Farbe dar⁴⁶. Allgemeine Kennzeichen sind, dass die Farbintensität von Huminstoffen mit ansteigendem pH-Wert des Mediums zunimmt. Ihre Molmassen unterscheiden sich je nach Quelle, Methode der Extraktion und Bestimmungsweise erheblich voneinander. Es wurde eine mittleren Molmasse von 500 – 200000 Dalton (Da) [$1 \text{ Dalton} = 1,65 \cdot 10^{-24} \text{ g}$] ermittelt⁴⁷. Man teilt Huminstoffe in alkaliunlösliche Humine, alkali- und säurelösliche Fulvosäuren und alkalilösliche und säurefällbare Huminsäuren ein⁴⁸. Sie besitzen eine große spezifische Oberfläche, können zu kolloidalen Teilchen aggregiert sein und sind in der Lage, Wasser und Ionen reversibel anzulagern⁴⁹. Die Huminsäuren stellen im natürlichen Stoffwandlungsprozess von Biomaterie keineswegs stabile Endzustände dar. Schon sehr geringe Milieuänderun-

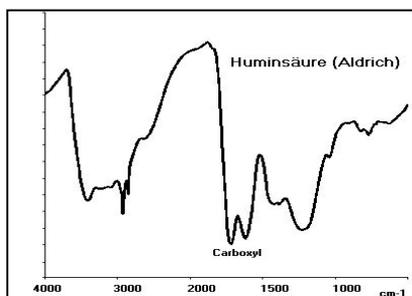


Abb. 2, IR-Spektrum, HS

minstoffe in unterschiedlichen Milieus aus vielfältigen natürlichen Substanzen entstanden sind, weisen sie starke Unterschiede in ihrer chemischen Zusammensetzung, Struktur und Konfiguration auf und stellen stets Gemische von physikalischen und chemisch heterogenen organischen Verbindungen mit relativ hoher Molmasse und gelber bis schwarzer Farbe dar⁴⁶. Allgemeine Kennzeichen sind, dass die Farbintensität von Huminstoffen mit ansteigendem pH-Wert des Mediums zunimmt. Ihre Molmassen unterscheiden sich je nach Quelle, Methode der Extraktion und Bestimmungsweise erheblich voneinander. Es wurde eine mittleren Molmasse von 500 – 200000 Dalton (Da) [$1 \text{ Dalton} = 1,65 \cdot 10^{-24} \text{ g}$] ermittelt⁴⁷. Man teilt Huminstoffe in alkaliunlösliche Humine, alkali- und säurelösliche Fulvosäuren und alkalilösliche und säurefällbare Huminsäuren ein⁴⁸. Sie besitzen eine große spezifische Oberfläche, können zu kolloidalen Teilchen aggregiert sein und sind in der Lage, Wasser und Ionen reversibel anzulagern⁴⁹. Die Huminsäuren stellen im natürlichen Stoffwandlungsprozess von Biomaterie keineswegs stabile Endzustände dar. Schon sehr geringe Milieuänderun-

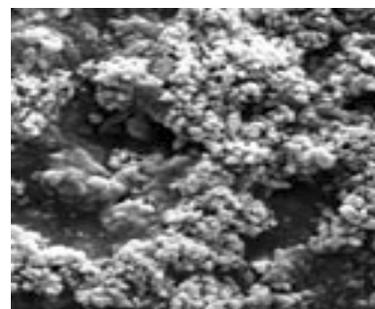


Abb. 3, SEM Bild (~ 2000x) von fester HS

gen sind in der Lage, Wasser und Ionen reversibel anzulagern⁴⁹. Die Huminsäuren stellen im natürlichen Stoffwandlungsprozess von Biomaterie keineswegs stabile Endzustände dar. Schon sehr geringe Milieuänderun-

gen, wie Änderungen des pH-Wertes oder der Ionenstärke, sind imstande, strukturelevante, innermolekulare Veränderungen einzuleiten, beispielsweise die Aufspaltung von Ester- oder Wasserstoffbrückenbindungen. Dadurch kann sich das einem Wollknäuel gleichende Makromolekül soweit entfalten, dass vordem sterisch gehinderte oder gebundene funktionelle Gruppen freigesetzt und sogar die Fragmentierung des Huminsäure-Makromoleküls eingeleitet werden kann⁵⁰. Wässrige HS besitzt selbst in geringen Konzentrationen von 5-10 µg/mL Detergenz-Eigenschaften, die als Bildung huminartiger „Pseudomicellen“ beschrieben wird. Dieser Effekt wird durch die Anwesenheit mehrwertiger Kationen wie Mg^{2+} noch verstärkt. Fulvosäuren besitzen diese Eigenschaften nicht⁵¹. Die maskierenden Eigenschaften von Proteinen im Boden können daher Huminsäuren zugeschrieben werden.

4 Ergebnisse

In einem ersten Arbeitsteil wird festgestellt, ob und ab welcher Konzentration HS einen Toxinnachweis stört. Als Modellsubstanz kommt ungiftiges Tetanustoxoid (TeTX) zum Einsatz. Allgemeine Untersuchungen, die sich auf Wechselwirkungen zwischen HS und Proteinen beziehen, werden aus Kostengründen mit Rinderserumalbumin (BSA) durchgeführt, die Ergebnisse dann mit TeTX verifiziert.

Im Anschluss werden verschiedene Analyseverfahren etabliert, um den Einfluss der Huminsäure auf das Toxin zu unterdrücken. Ziel ist ein quantitativer Nachweis des Toxins in Realproben.

4.1 Ermittlung von Störgrößen

Im ersten Teil dieses Abschnitts wird untersucht, inwieweit Huminsäure aufgrund seiner starken Eigenfärbung vor allem in wässrigen Lösungen optische Analysen stört. Im weiteren Verlauf werden die Ergebnisse massenspektrometrischer Untersuchungen mittels MALDI-MS herangezogen, um das Vorliegen einer möglichen Bindung zwischen Huminsäure und Analyt nachzuweisen.

4.1.1 Allgemeine Eigenschaften von Proteinen

Die für die folgende Analytik wichtigen Struktureigenschaften von Proteinen werden im folgenden kurz angesprochen. Proteine setzen sich aus 20 genetisch codierten α -Aminosäuren zusammen. Die primäre Bindung erfolgt über die Bildung des Säureamids zwischen den Carboxy- und Aminogruppen der verschiedenen Aminosäuren, die als Peptidbindung bezeichnet wird. Per Definition werden Polypeptide, die ab einer Größe von etwa 100 Aminosäuren im wässrigen Medium eine dreidimensionale Struktur annehmen, als Proteine bezeichnet⁵². Diese Struktur ist sehr empfindlich, da sie hauptsächlich auf schwachen innermolekularen Wechselwirkungen beruht. Temperaturen ab 65°C führen zum Aufbrechen eines Teils dieser Wechselwirkungen, was als Denaturieren bezeichnet wird⁵³. Eine Denaturierung ist u.a. auch mit den folgenden Chemikalien möglich: Guanidinchlorid, Harnstoff, Natriumdodecylsulfat (SDS), Triton X oder Säuren.

4.1.2 Optische Methoden

Die Peptidbindungen der Proteine absorbieren eingestrahktes UV-Licht im Wellenlängenbereich von 190 – 220 nm besonders stark⁵⁴. Deshalb wird oftmals ein UV-Detektor zur Identifikation und zum quantitativen Nachweis von Proteinen verwendet. Die meisten Proteine ent-

halten außerdem eine variierende Anzahl der Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin, die durch ihre aromatischen Seitenketten eine messbare Eigenfluoreszenz besitzen, dessen Anregungswellenlänge bei 280-290 nm liegt und dessen Emissionswellenlänge zwischen 322 und 342 nm liegen. Für denaturierte Proteine wurde ein Emissionsmaximum von 345 nm gefunden⁵⁵.

Neben UV-Absorption und Fluoreszenz werden zwei Proteintests untersucht, mit denen quantitativ der Proteingehalt einer wässrigen Lösung bestimmt werden kann. Zu Anfang wird ein UV/VIS-Spektrum mit unterschiedlichen Huminsäurekonzentrationen gegen Wasser aufgenommen^x, um abzuschätzen, wie groß das Hintergrundrauschen bei den nachfolgenden Messungen sein wird. Im Anhang (Abb. 7.2) finden sich die Gesamtspektren über einen Wellenlängenbereich von 190 – 900 nm. Da bei der photometrischen Detektion von Proteinen vor allem drei Wellenlängen zur Auswertung verschiedener Analysemethoden zum Einsatz kommen, werden sie im folgenden näher untersucht.

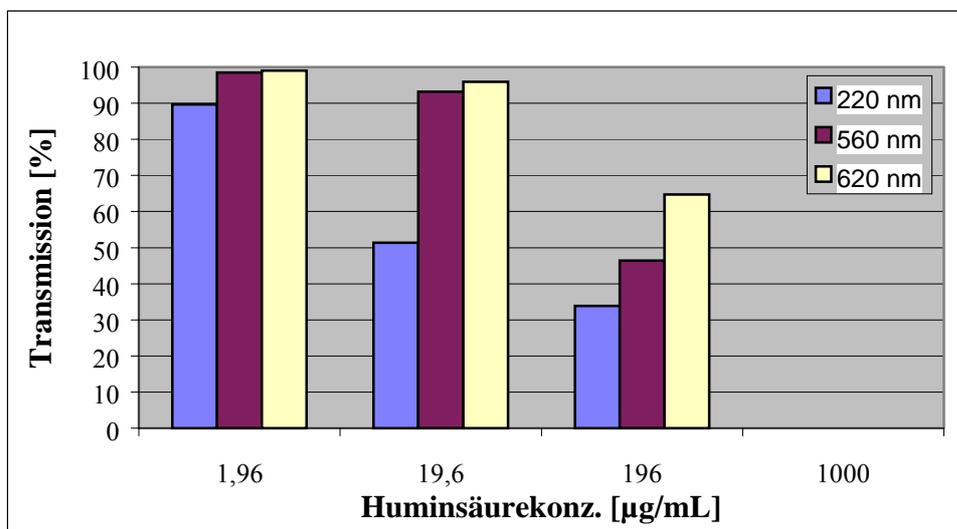


Abb. 4, UV/VIS-Transmission von Huminsäure gegen Wasser

In der Proteinanalytik mittels HPLC wird standardmäßig ein UV-Detektor eingesetzt und die Absorption/Transmission bei 220 nm gemessen. Aus den Messwerten in Abb. 4 zeigt sich, dass bereits ein Huminsäuregehalt von 1,96 $\mu\text{g/mL}$ zu einer 10%igen Abnahme der UV-Transmission führt, die bei 19,6 $\mu\text{g/mL}$ mit 51% lediglich die Hälfte des UV-Lichts durchlässt und bei 196 $\mu\text{g/mL}$ nur noch 33% des UV-Lichtes. Das bedeutet, dass eine Proteinanalytik im Beisein hoher Huminsäurekonzentration mittels HPLC allenfalls qualitativ möglich ist.

^x UV-VIS-Photometer, Varian Cary 50, Quarzküvette, 1 cm Schichtdicke; Datenaufnahme mit Cary WinUV Version 2.0

Bei 562 nm liegt das Absorptionsmaximum des BCA-Komplexes, auf dem der BCA-Proteintest basiert. Die Festwellenlänge des eingesetzten Plattenreaders liegt bei 560 nm. Es zeigt sich, dass die Eigenabsorption der Huminsäure bei dieser Wellenlänge bis zu einer Konzentration von 19,6µg/mL nur 7% beträgt. Bei einem Gehalt von 196µg/mL HS sinkt die Transmission auf 46%. Damit kann diese Wellenlänge zum optischen Nachweis in stark HS-belasteten Lösungen nicht verwendet werden.

Das Absorptions-Maximum des Komplexes, das mit dem Pierce Coomassie Plus Protein Assay ausgenutzt wird, liegt bei 595 nm. Da die verfügbare Festwellenlänge des Plattenreaders 620 nm beträgt, wird dieser Bereich überprüft. Analog der für den BCA-Test betrachteten Wellenlänge liegt der Fehler bis zu einer Konzentration von 19,6µg/mL Huminsäure lediglich bei 4% und befindet sich damit im Bereich photometrischer Assays. Darüber beträgt die Transmission noch 65%, so dass eine Verwendung für stark Huminsäure belastete Lösungen ausgeschlossen werden muss.

4.1.2.1 Vergleich von Proteinschnelltests

Ein Nachweis nicht aufgereinigter Analytlösungen bis zu einer Konzentration von 19,6µg/mL sollte nach den oben durchgeführten photometrischen Gesichtspunkten möglich sein. Im folgenden werden die beiden bereits angesprochenen Proteintests im Hinblick auf ihren Einsatz als erstes Screening untersucht.

Beim BCA-Test reduzieren Proteine Cu^{2+} zu Cu^+ , das mit Bicinchoninsäure einen purpurfarbenen Komplex mit einer Nachweisgrenze von 5µg/mL Gesamt-Protein bildet. Detergenzien stören den Test nicht⁵⁶. Im Beisein von Cu-chelatisierenden Substanzen kann die Konzentration der Cu^{2+} -Lösung um 200% erhöht werden. Der Test wird auf 96-well Mikrotiterplatten durchgeführt^{xi}. Die Änderung der optimalen Wellenlänge von 562 auf 560 nm hat keinen Einfluss auf das Ergebnis (Anhang Abb. 7.4).

^{xi} Die Durchführungsbestimmungen finden sich im Anhang: 7.2.2: BCA-Test

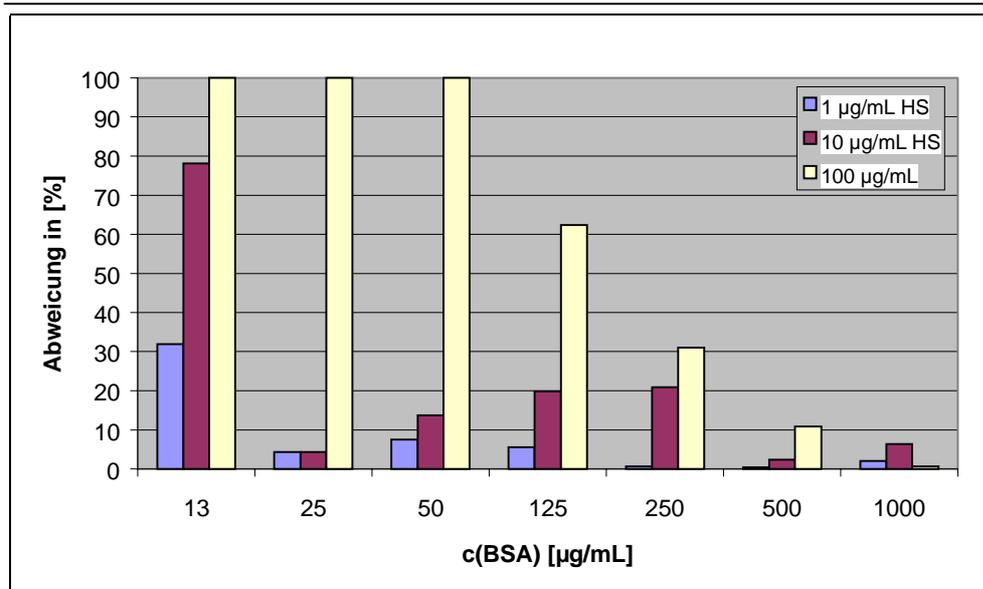


Abb. 5, prozentuale Abweichung der Messwerte in bezug auf Wasser

Vergleicht man die Transmission verschiedener BSA-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Huminsäure-Konzentration, zeigt sich, dass die durch Huminsäure verursachten Abweichungen der Messwerte selbst, nur bei einer HS-Konzentration von 1 µg/mL bis 25 µg/mL BSA tolerabel sind. Niedrigere BSA-Konzentrationen können nicht mehr quantitativ nachgewiesen werden. Bei höheren HS-Konzentrationen nimmt der Fehler so weit zu, dass die Ergebnisse nicht auswertbar sind. Die Erklärung ist in der bereits unter 3.3 beschriebenen Pseudomicellenbildung von Huminsäure zu finden, die durch mehrwertige Kationen noch verstärkt wird. Als Fazit kann festgehalten werden, dass der BCA-Test als Nachweismethode ausscheidet, wenn der Huminsäuregehalt einer Probe nicht bekannt ist.

Beim Coomassie-Test nach Bradford^{xii} bindet die anionische Form des Coomassie-Reagenz (Strukturformel s. Anhang Abb.: 7.5) in saurer Lösung an basische und aromatische Seitenketten der Proteine. Bei der Komplexbildung findet eine Verschiebung der Absorption statt, dessen Maximum bei 595nm gemessen wird. Vorteil dieses Tests ist, dass reduzierende Verbindungen nicht stören, dafür aber Detergenzien⁵⁷. Dieser Effekt scheint der Grund dafür zu sein, dass sich bereits im Beisein von 1µg/mL Huminsäure keine verwertbaren Ergebnisse ergeben. Ein weiterer Nachteil ist die höhere Nachweisgrenze, sie beträgt 100µg/mL Protein. Der Test scheidet aus und wird nicht weiter betrachtet.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass beide Tests für ein Screening nicht herangezogen werden können. Huminsäure muss von Proteinen abgetrennt werden, um verwertbare Ergebnisse zu erzielen.

^{xii} Die Durchführungsbestimmungen finden sich im Anhang: 7.2.3: Coomassie-Test

4.1.2.2 2D-Fluoreszenz

Auf die Grundlagen der Fluoreszenz und speziell der 2D-Fluoreszenz wird hier nur kurz eingegangen und auf die entsprechende Literatur verwiesen⁵⁸. Stattdessen sollen relevante Aspekte im Hinblick auf die vorliegende Huminsäure Problematik betrachtet werden.

Bei der Fluoreszenz werden Atome und Moleküle durch eingestrahktes Licht auf ein energetisch höheres Niveau gebracht. Danach fallen sie innerhalb von 10^{-8} s über ein Intermediärniveau wieder in den Grundzustand zurück. Die Fluoreszenzwellenlänge ist immer länger (energieärmer) als die eingestrahkte Anregungswellenlänge, $\lambda_{\text{Fluoreszenz}} > \lambda_{\text{Absorption}}$ (Stokesche Verschiebung)⁵⁹. Die Intensität der Fluoreszenz steht in verdünnten Lösungen im linearen Zusammenhang mit der Konzentration des Fluorophors, wobei dessen Fluoreszenz von verschiedenen Parametern in der Matrix abhängig ist. Das können Temperatur, pH-Wert, Polarität des Lösungsmittels und evtl. vorhandene andere Fluorophore in Lösung (z.B. Detergenzien) sein. Eine Deaktivierung durch strahlungslosen Energietransfer auf andere Moleküle wird als Fluoreszenzlöschung (Quenching) bezeichnet⁶⁰. Dabei wird zwischen der dynamischen Fluoreszenzlöschung durch Kollisionsprozesse und der statischen Fluoreszenzlöschung durch Komplexbildung unterschieden, die beide von der Konzentration der Löschermoleküle (Quencher) abhängig sind. Wird emittierte Fluoreszenzstrahlung zur Anregung weiterer Fluorophore reabsorbiert, spricht man von einem Kaskadeneffekt, der eine geringere Konzentration des zuerst angeregten Fluorophors vortäuscht⁶¹.

Mit der 2-dimensionalen Fluoreszenzspektroskopie wird die schnelle Aufnahme von Fluoreszenzspektren über einen weiten Exzitations- und Emissionsbereich ermöglicht. Simultan werden mehrere Analyte sowohl qualitativ durch die Lage in der Matrix als auch quantitativ über die Fluoreszenzintensitäten erfasst. Der Wellenlängenbereich der Exzitation deckt den Bereich von 250-550 nm ab, der der Emission den von 260-600 nm. Für die hier durchgeführten 2D-Fluoreszenzmessungen wurde das Fluoreszenz-Spektralphotometer F-4500 der Firma Hitachi verwendet. Für die durchgeführten Küvettenmessungen sind Exzitationslichtquelle und Photomultiplier im Winkel von 90° angeordnet. Als Lichtquelle dient eine 150Watt Xenonlampe. Die Auswahl der unabhängig einstellbaren Exzitations- und Emissionswellenlängen erfolgt über Gittermonochromatoren, die Bandbreite der ausgewählten Wellenlängen („Slit“) kann ebenfalls variiert werden. Als Detektionssystem dient ein Gittermonochromator mit Photomultiplier. Gerätesteuerung und Datenaufnahme erfolgen über PC. Die Küvettenmessung erfolgt mit einer 1,5 mL Quarzglasküvette mit 1 cm Schichtdicke. Die Messbedingungen sind im Anhang unter 7.2.4 aufgeführt.

Die Spektren werden ähnlich einer topographischen Karte mit Höhenlinien zur Verdeutlichung der Intensitätsverteilung dargestellt. Die senkrechte Achse entspricht jeweils dem Exzitationswellenlängenbereich, die waagerechte Achse dem Emissionswellenlängenbereich. Die Farblegende neben dem Spektrum ermöglicht eine Zuordnung der im Spektrum vorkommenden Farben zu den jeweiligen Fluoreszenzintensitäten, aus denen die Peakhöhe bestimmt werden kann. Blaue Bereiche kennzeichnen geringste, rote die höchste Fluoreszenzintensität. Ziel dieser 2D-Fluoreszenz-Küvettenmessungen war es festzustellen, ob die Fluoreszenz von Proteinen gestört wird und ob es noch andere Anregungswellenlängen für Proteine gibt, bei denen Huminsäure nicht stört. Im ersten Spektrum wird BSA in einer Konzentration von 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vermessen (s. Abb.: 6). Das Maximum der Exzitation liegt bei 280nm, das der Emission bei 335nm.

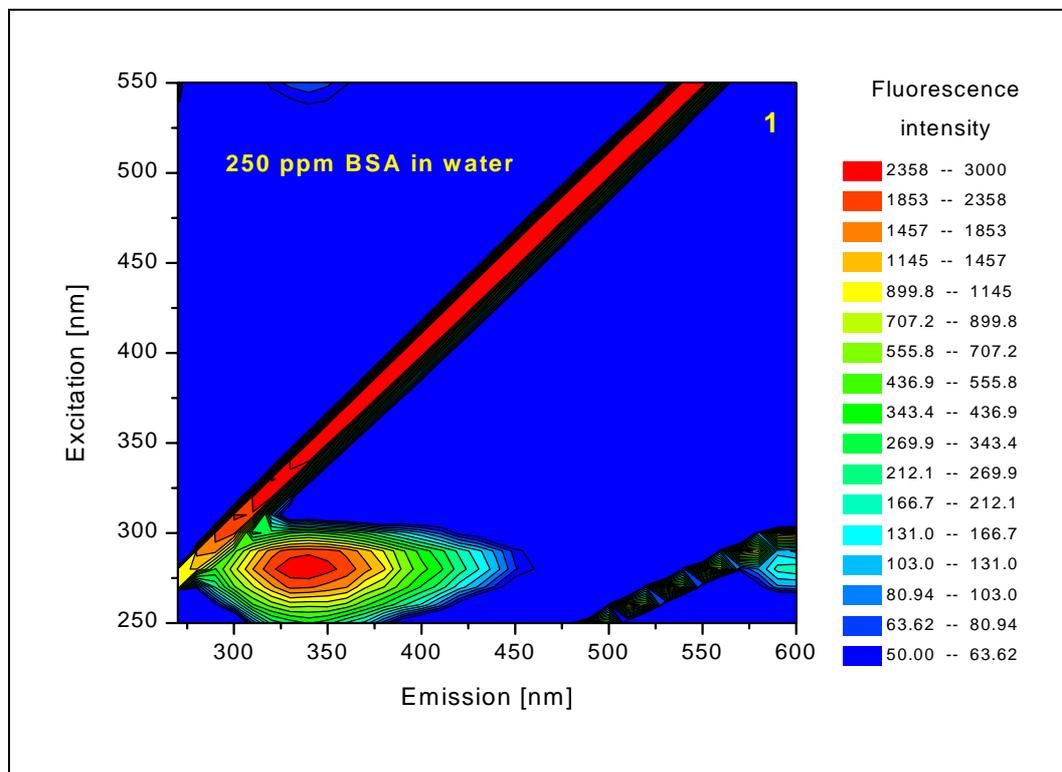


Abb. 6, 2D-Fluoreszenzspektrum, BSA in Wasser

Das folgende Spektrum (Abb.: 7) zeigt eine wässrige Lösung von 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA in 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Huminsäure. Aufgrund der relativ geringen Konzentration des BSA kann bei der Halbierung der eingesetzten Konzentration von einem linearen Zusammenhang der Fluoreszenz ausgegangen werden.

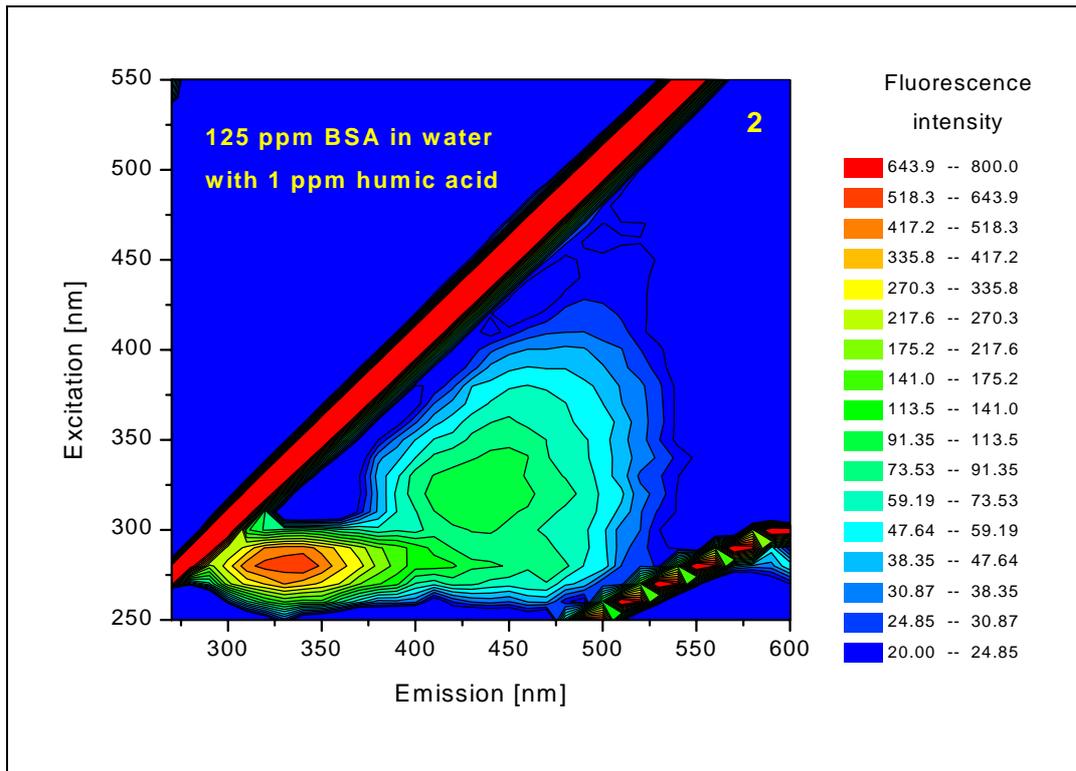


Abb. 7, 2D-Fluoreszenzspektrum, BSA in Huminsäure (1 μ g/mL)

Im Gegensatz zum Spektrum ohne HS hat sich die Intensität des BSA-Peaks auf ein Viertel erniedrigt. Das deutet darauf hin, dass bereits die um den Faktor 125 niedrigere HS-Konzentration die durch BSA emittierte Fluoreszenzstrahlung reabsorbiert. Aus dem Spektrum lässt sich eine Anregungswellenlänge der Huminsäure von 325 bis 350 nm erkennen, die der Emissionswellenlänge von BSA entspricht. Durch den hier auftretenden Kaskadeneffekt wird eine geringere als die tatsächliche vorliegende BSA-Konzentration vorgetäuscht.

Wie aus dem nächsten Spektrum (Abb.: 8) deutlich abzulesen ist, wird der BSA-Peak bei einer HS-Konzentration von 10 μ g/mL vollständig gequenchet. Inwieweit es sich um statisches oder dynamisches Quenching handelt, wird im folgenden noch geklärt.

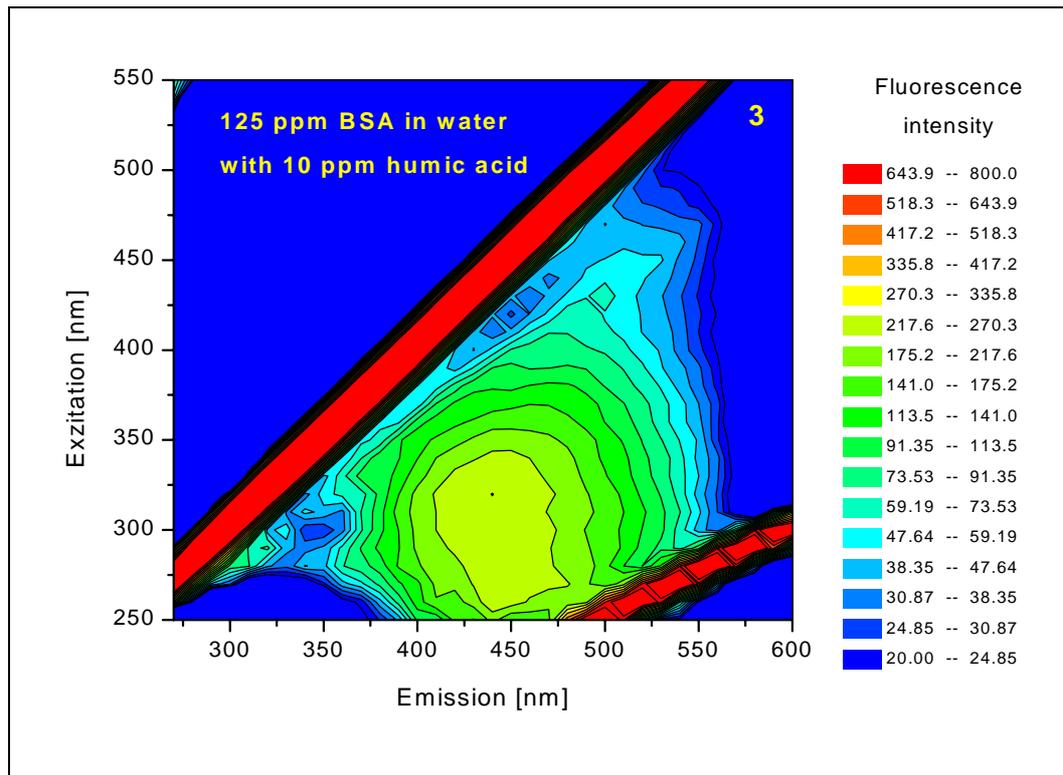


Abb. 8, 2D-Fluoreszenzspektrum, BSA in Huminsäure (10 μ g/mL)

Als Ergebnis dieser Messungen lässt sich folgendes festhalten:

1. Es gibt keine weiteren Fluoreszenzbereiche, in denen BSA gemessen werden kann, ohne dass Huminsäure stört.
2. Nur durch Trennung der Huminsäure vom Protein sind quantitative Ergebnisse bei optischen Nachweismethoden zu erwarten.
3. Es bleibt zu klären, inwieweit Proteine durch Huminsäure komplexiert werden.

4.1.3 MALDI-Massenspektroskopie

Mit MALDI-MS (Matrix assisted Laser Desorption / Ionization–Massenspektroskopie) sind qualitative Aussagen über die Gesamtmasse eines Moleküls möglich. Durch diese Analyse-methode kann die Frage einer Komplexierung von Proteinen durch Huminsäure geklärt werden. Aufgrund des apparativen und präparativen Aufwands eignet sich MALDI-MS nicht für den erwünschten schnellen Toxinnachweis. Sie dient hier zur Aufklärung der Molekülgröße und beantwortet die Frage, ob statisches Quenching bei der 2D-Fluoreszenz vorliegt.

Am Anfang wird ein kurzer theoretischer Überblick zur Massenspektroskopie und der MALDI-MS im besonderen gegeben. MS ist eine Analyse-methode, bei der die auf verschiedene Arten erzeugten Molekülionen mit einem Massenanalysator nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) aufgetrennt werden⁶². Die ionisierten Teilchen müssen ohne Kollision mit anderen Teilchen am Detektor ankommen. Das bedingt, dass die mittlere freie Weglänge mindestens der Entfernung von der Ionisationsquelle zum Detektor entsprechen muss, was nur durch ein Hochvakuum zu erreichen ist. Eine Detektion hochmolekularer Moleküle wie Proteine ist nur mit speziellen Methoden möglich, die weniger starke Fragmentierungen des Analyten zulassen. Neben der Elektrospray Ionisations-MS, dessen Spektren immer noch viele mehrfach geladene Peaks zeigen, ist vor allem die 1985 von Karas und Hillenkamp⁶³ entwickelte Technik der MALDI-MS geeignet, die im Idealfall nur einen einfach geladenen Molekülpeak enthält⁶⁴. Die Ionen werden direkt aus der kondensierten Phase erzeugt. Als Matrix dient eine kristalline, aromatische Karbonsäure, deren Adsorptionsmaximum der Wellenlänge des benutzten Lasers entspricht. Aufgrund der heterogenen Analytverteilung im Kristall ist eine quantitative Aussage nur selten möglich.

Die Probenpräparation ist entscheidend für den Erfolg der Messung. Schlechte Präparation oder eine ungeeignete Matrix führen zu schlechten oder unbrauchbaren Ergebnissen. Die Matrix muss auf den zu untersuchenden Analyten optimiert werden⁶⁵. Für die verwendete Wellenlänge (337 nm) haben sich die folgenden Substanzen als besonders geeignet erwiesen⁶⁶: 2-methoxy-Salicylsäure, Gentisinsäure, 3-Hydroxy-Picolinsäure, Sinapinsäure^{xiii}.

Für die hier durchgeführten Messungen wurde jede Matrix in einer Mischung aus Acetonitril (ACN) und 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) im Verhältnis 2:1 (v/v) gelöst und in vier verschiedenen Konzentrationen (5, 10, 15, 50 mg/mL) auf einen Edelstahlträger aufgegeben. Für die Arbeiten war es unerheblich, ob die Matrix-Lösungen vor den Messungen frisch zubereitet oder mehrere Tage bei +4°C gelagert wurden. Die Konzentration des Analyten betrug zwi-

^{xiii} Spektren mit Strukturformel, Trivial- und IUPAC-Namen im Anhang Abb.: 7.7-7.10

schen 0,1 und 0,5 mg/mL. Probenpräparation fand nach der „dried-droplet“ (DD) Methode⁶⁷ auf einem Edelstahlträger mit 10 Probenspots statt^{xiv}.

Desorption erfolgt durch Schwingungsanregung der Matrixmoleküle. Die Matrixkristalle verdampfen durch Laserpuls, wobei auch Analytmoleküle mitgerissen werden. Durch Stöße mit Matrixmolekülen im Übergangsbereich zwischen kondensierter und Gasphase kommt es zu Protonierungs-/Deprotonierungsreaktionen des Analyten.

Die Analysen wurden mit einem Kompakt-Maldi 3 von Kratos Analytical durchgeführt, das in der Lage ist, Massen bis 273 kDa zu detektieren. Ionenbeschleunigung erfolgt durch Anlegen einer 20 kV Spannung. Bestrahlungsquelle ist ein UV-Stickstoff-Laser (337 nm), der über eine Lichtoptik in seiner Intensität abgeschwächt werden kann. Die Bestrahlungsstärke ist dadurch in einem Bereich von 0-180 relativen Einheiten zu variieren, wobei die ursprüngliche Laserstärke reduziert wird. Massentrennung erfolgt im Linearmodus (1m Flugstrecke). Zur Steuerung und Datenaufnahme ist eine Sun-SPARCstation mittels optischem Leiter mit dem MALDI verbunden. Auswertung der Daten fand mit der Win-Software, Kompact ver. 2.0.3, Dezember 2000, von Kratos Analytical statt. Die Kalibration der aufgenommenen Spektren wurde manuell durchgeführt, indem mindestens zwei Peaks eines Moleküls bekannter Masse, die korrekten Massen zugewiesen wurden.

Um eine Aussage über die Komplexierung des BSA durch HS treffen zu können, wurde BSA mit 1, 10 oder 100 µg/mL HS dotiert. Zuerst wurden vier unterschiedlichen Matrices auf ihre Eignung hin untersucht. Die Spektren, die mit 2-Hydroxy-5-methoxy-Benzoesäure, Dihydroxy-Benzoesäure, 3-Hydroxy-Picolinsäure als Matrix aufgenommen wurden, ergaben keine verwertbaren Ergebnisse. Sie wiesen einen sehr hohen Hintergrund auf, zeigten nur geringe Peakintensitäten und generierten durch viele unspezifische Peaks über den gesamten Massenbereich nicht auswertbare Spektren. (s. Anhang: Abb. 7.11). Als geeignet erwies sich Sinapinsäure sowohl für BSA als auch für TeTX, wobei die optimale Konzentration der Matrix 15mg/mL für BSA und 50 mg/mL für TeTX betrug (s. Anhang: Abb.: 7.12, 7.13, 7.14). Weitere Vorteile der Sinapinsäurematrix sind das Vorhandensein zweier charakteristischer Peaks bei 207 und 224 m/z, die zur Kalibration benötigt werden und die geringe Ionisierungsneigung des Analyten, was zu wenigen Analytpeaks (M^+ , M^{2+}) führt.

^{xiv} Jeder Probenspot ist in 1000 Positionen aufgeteilt, die durch einen Stellmotor in 5er Schritten angefahren werden können.

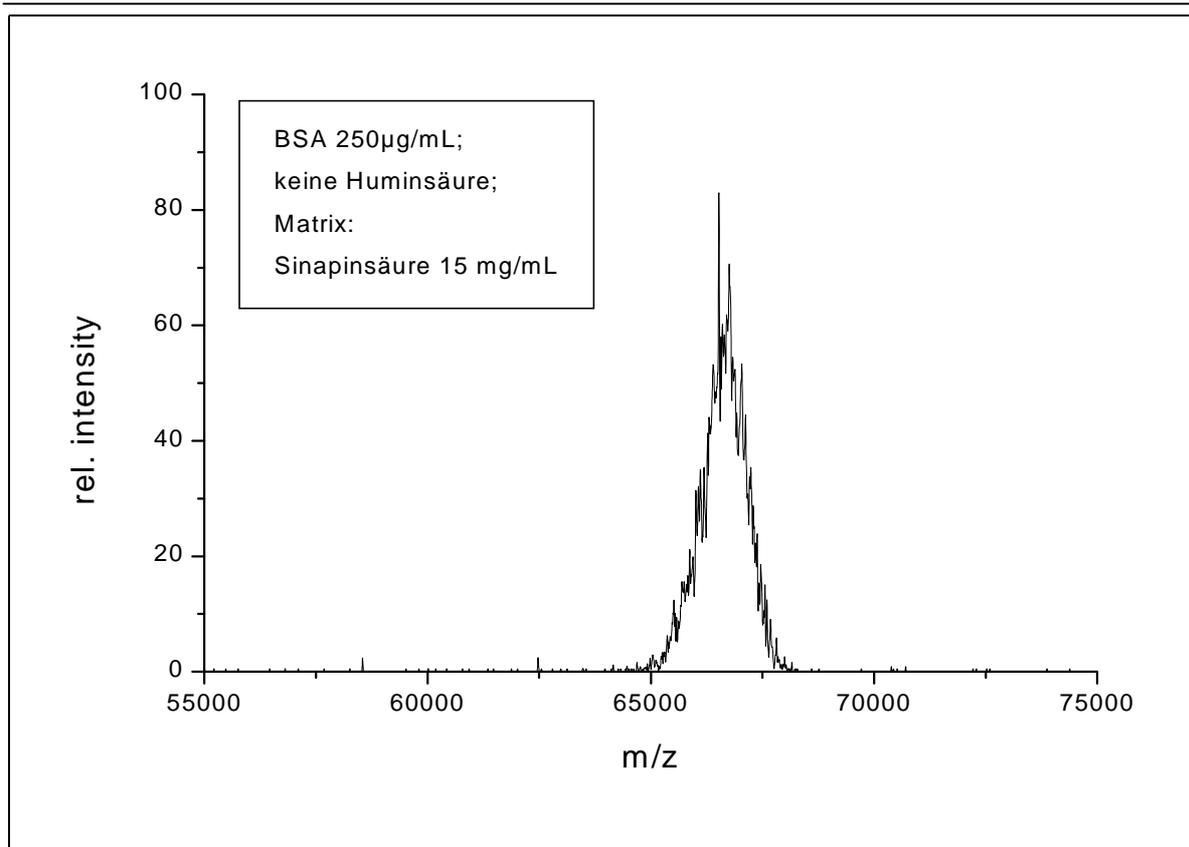


Abb. 9, MALDI-Spektrum BSA in Sinapinsäure-Matrix

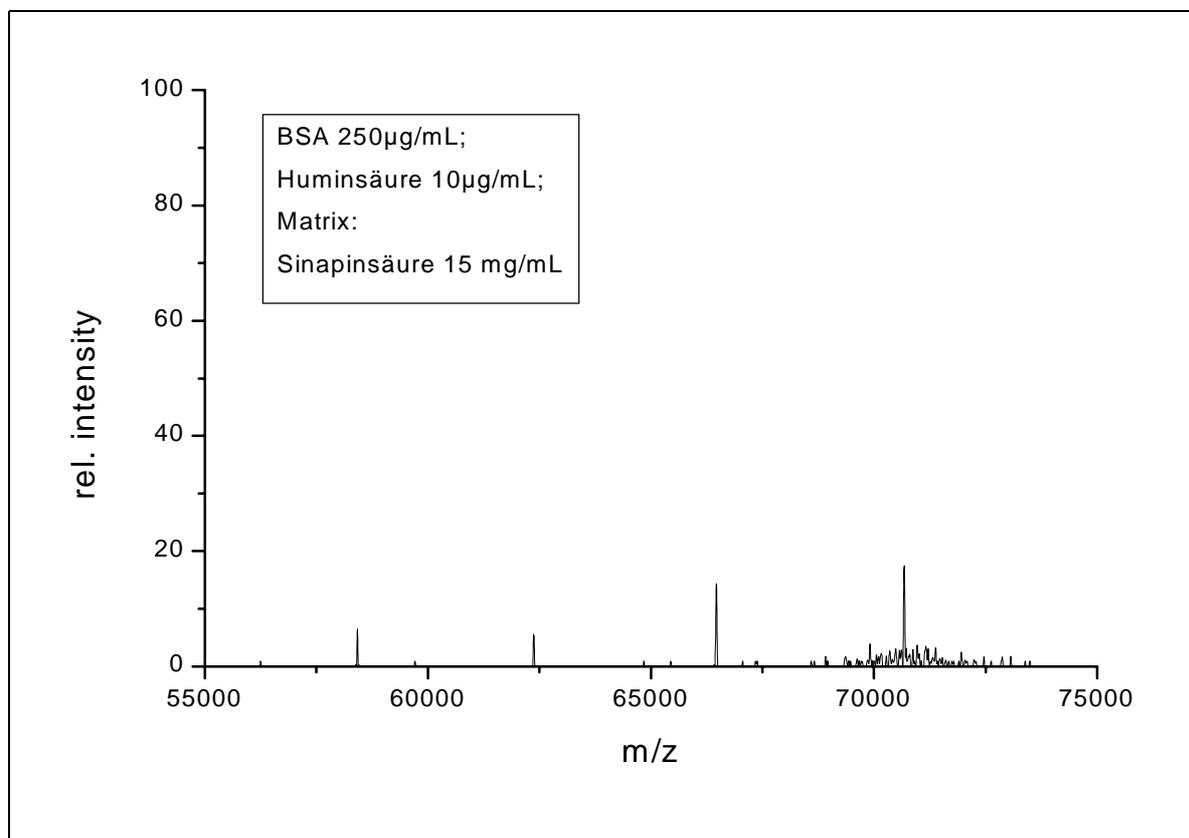


Abb. 10, MALDI-Spektrum BSA mit Huminsäure in Sinapinsäure-Matrix

Wie aus den Spektren in Abb.: 9 und 10 zu sehen, zeigen sich durch Zugabe von 10 µg/mL HS zum BSA-Standard bereits große Unterschiede bei ansonsten gleichen Messbedingungen [Bestrahlungsstärke (Power) 110 mV; 50 Einzelspektren (ES)]. Es kommt zu einer Verschiebung des BSA-Peaks um ~4200 m/z hin zur höheren Masse. Das lässt darauf schließen, dass sich hier ein stabiler Anlagerungskomplex zwischen BSA und der Huminsäure gebildet hat. Die Intensität dieses Peaks ist von der Intensität ca. 75% niedriger, als der BSA-Peak ohne Huminsäure. Ein schwacher Peak findet sich bei 66400 m/z, der auf freies BSA hindeutet. Eine Erhöhung der Konzentration auf 100 µg/mL Huminsäure ergab keine verwertbaren Spektren.

4.1.4 Bewertung und Folgerungen für das weitere Vorgehen

Die Ergebnisse zeigen, dass Huminsäure bereits in geringen Konzentrationen von 1-2 µg/mL einen quantitativen Nachweis von Proteinen mit optischen Methoden verhindert und nur qualitative Aussagen zulässt. Zum einen stört Huminsäure durch starke Eigenabsorption, zum anderen bildet Huminsäure einen sehr stabilen Anlagerungskomplex. Ein Gehalt von 3-6 µg/mL entspricht dem HS-Gehalt, der beispielsweise im Rhein gefunden wurde⁶⁸. Bei einem Gehalt von 10 µg/mL sind ohne aufwendige Aufarbeitungsschritte keine analytischen Aussagen möglich. Eine solche HS-Konzentration ist beispielsweise in stehenden Gewässern zu finden⁶⁹. In Böden sind HS-Gehalte von über 100 µg/mL üblich⁷⁰, hier versagen alle untersuchten Methoden.

4.2 Nachweis proteolytischer Toxine

Basierend auf diesen Ergebnissen werden im weiteren Verlauf drei Strategien zur Bestimmung von Toxin neben Huminsäure verfolgt:

- Indirekter Nachweis des Toxins über die entsprechende Gensequenz
- Unterdrücken des Huminsäureeffekts durch Wahl einer optimierten Umgebung
- Trennen von Huminsäure und Toxin

Der genetische Nachweis des Toxins erfolgt mittels PCR. Der Einsatz immunochemischer Ansätze erscheint für ein Unterdrücken des HS-Effekts am vielversprechendsten, wohingegen sich chromatographische Methoden anbieten, um eine Trennung zu erreichen.

4.2.1 Indirekter Toxinnachweis über die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Ziel der hier durchgeführten Untersuchungen ist es festzustellen, ob PCR als Ergänzung zum Toxinnachweises in Gegenwart von Huminsäure eingesetzt werden kann und inwieweit es

möglich ist, den HS-Effekt zu unterdrücken. Hauptaugenmerk ist der schnelle Nachweis der Zielsequenz ohne aufwendige Aufarbeitung der Probe.

Wie bereits im Theorieteil erwähnt, kann über die genetischen Sequenzen auf die hier untersuchten proteolytischen Toxine geschlossen werden. Die Vorteile eines genetischen Nachweises liegen vor allem in der höheren chemisch-physikalischen Stabilität der DNA gegenüber Proteinen. Hinzu kommt eine weitaus tiefere Nachweisgrenze, als sie in der Proteinanalytik möglich ist. Unter Idealbedingungen reicht eine einzige DNA-Sequenz, um ein positives Signal zu erzeugen⁷¹.

Damit eine PCR Erfolg hat, muss die nachzuweisende DNA möglichst rein vorliegen. Bodeninhaltsstoffe wie Huminstoffe⁷² oder Eisenverbindungen⁷³ inhibieren den DNA-Nachweis. Einen Überblick über entwickelte Extraktionsmethoden gibt das „Molecular microbial ecology manual“⁷⁴. Nachteil vieler etablierter Methoden ist, dass sie zeitintensiv sind. Schnelle Extraktionen erreichen nur eine geringe DNA-Ausbeute, so dass die Empfindlichkeit sinkt. Kommerzielle DNA-Kits, die auf Bodenproben zugeschnitten sind, können noch nicht erworben werden.

4.2.1.1 Prinzip der PCR

Im folgenden wird das Prinzip der PCR kurz dargestellt. Sie stellt im wesentlichen *in vitro* die Vorgänge der DNA-Replikation während der Zellteilung nach. Mit Hilfe hitzestabiler DNA-Polymerasen wird die DNA in mehreren aufeinanderfolgenden Zyklen vervielfältigt. Dabei beinhaltet jeder Zyklus drei Phasen, deren Abfolge durch die jeweilige Temperatur im Reaktionsgefäß gesteuert wird. Temperatursteuerung sowie Anzahl der Zyklen werden mittels Thermocycler automatisch geregelt. Schematisch läuft eine PCR-Vervielfältigung wie in Abb.: 11 dargestellt ab.

- Ausgehend vom DNA-Doppelstrang (Template) erfolgt eine Erhitzung der Probe auf ~94°C, wodurch die DNA in Einzelstränge aufgeschmolzen wird (Denaturierung).
- Die Probe wird dann auf eine Temperatur abgekühlt (~50 – 60°C), bei der eine sequenzspezifische Anlagerung der Primer an die Einzelstränge erfolgt (Primer-Annealing).
- Durch eine Temperaturerhöhung auf 72°C wird die Polymerase aktiviert, die ausgehend von den Primern den zum Einzelstrang komplementären Strang (das Amplikon) synthetisiert (Elongation).

Das Resultat eines Zyklus⁷ ist eine Verdopplung der durch Primer definierten Zielsequenz. Eine Vervielfältigung erfolgt in ~30-40 Zyklen, was zu einer exponentiellen Anreicherung bis auf maximal 10^9 Kopien der Zielsequenz im Reaktionsgefäß führt⁷⁵.

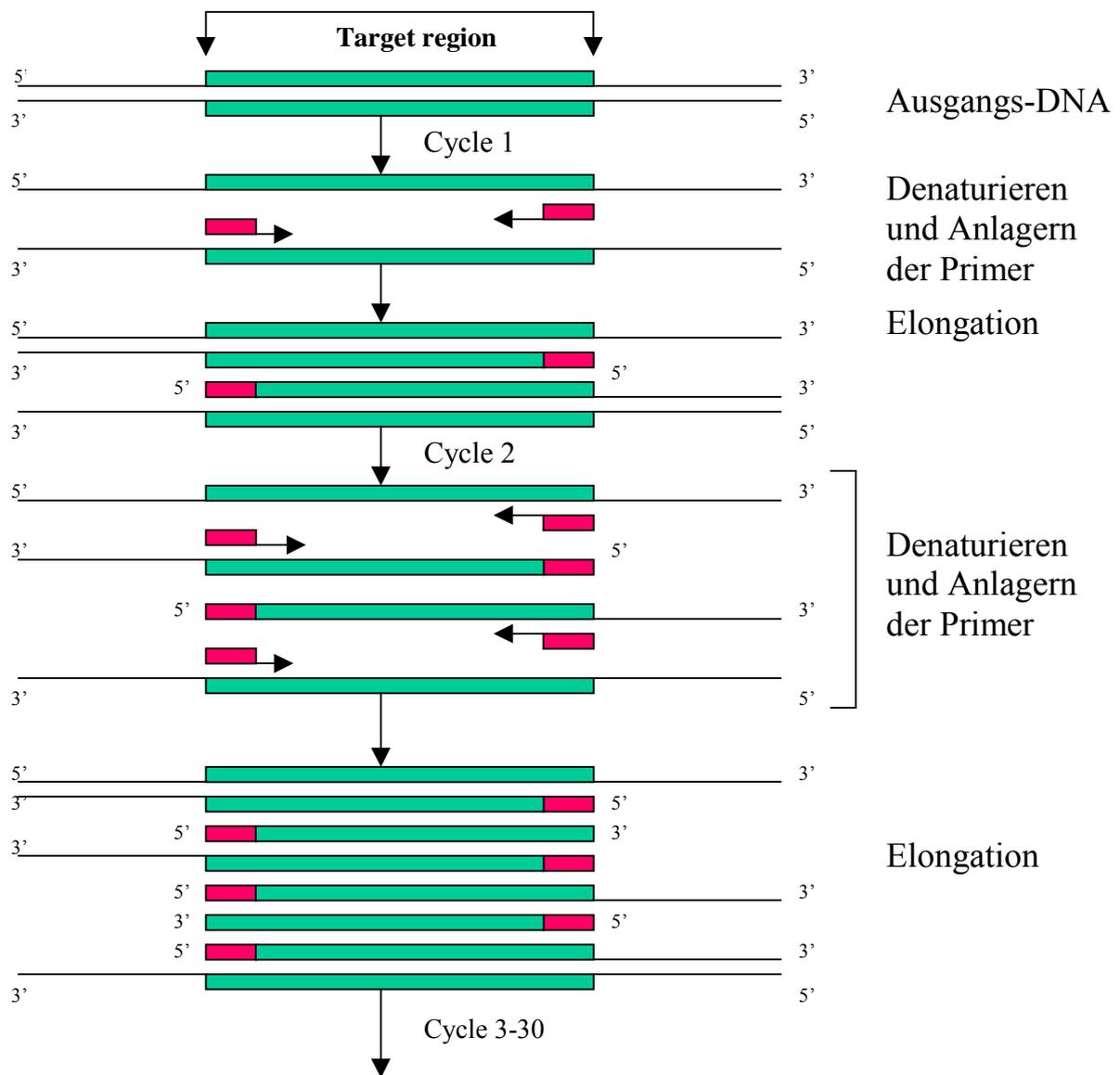


Abb. 11, Prinzip der PCR

4.2.1.2 Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese

Die hier eingesetzte PCR wird erst durch die Kombination mit der Agarose-Gelelektrophorese zu einem vollständigen analytischen Nachweissystem. Sie wird allgemein zur Identifikation, Trennung und Reinigung von DNA-Fragmenten verwendet. Dabei wandert DNA in einem elektrischen Feld aufgrund negativ geladener Phosphatgruppen zur Anode. Die Mobilität hängt von der Molekülgröße und der Dichte der Gelmatrix ab. Zur DNA-Trennung werden 0,8-1,25%ige Agarosegele verwendet⁷⁶. Im vorliegenden Fall wird ein Ethidiumbromid gefärbtes 1,2 %iges Gel benutzt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und macht so die

Banden bei der nachfolgenden Bestrahlung mit UV-Licht (254nm)^{xv} sichtbar. Mit Hilfe eines DNA-Markers lässt sich die Molekülgröße von DNA-Fragmenten durch einen Vergleich der Laufstrecke bestimmen. Die Auswertung erfolgt qualitativ. (Gießen eines Agarose-Gels und Durchführung der anschließenden Gelelektrophorese s. Anhang 7.4.1).

4.2.1.3 Methodenentwicklung

Als Ausgangstemplate wird *Cl. formicoaceticum*⁷⁷ aus einer Vorkultur⁷⁸ eingesetzt^{xvi}. Der DNA-Nachweis mittels PCR lässt sich in die folgenden Schritte unterteilen:

1. Bestimmen der optimalen Annealing-Temperatur
2. Auswahl der geeigneten PCR-Kits der verschiedenen Hersteller
3. Feststellen des Einflusses der Huminsäure auf die PCR
4. Minimierung der Effekte durch Variation der Reaktionslösung

Eingesetzte Templates

Cl. formicoaceticum wird wegen der nicht ausreichenden Sicherheitseinstufung des Instituts^{xvii} statt *Cl. botulinum* eingesetzt. Ziel der hier durchgeführten Untersuchungen ist es, clostridiale DNA neben Huminsäure nachzuweisen. Die DNA-Sequenzen clostridialer Neurotoxine sind an verschiedenen Stellen in der Zelle lokalisiert. Als Zielsequenz wird daher ein Ausschnitt der 16S rDNA (Sequenz s. Anhang 7.4.3) gewählt, die zum allgemeinen Bakteriennachweis dient. Mit 1500 Nukleotiden besitzt sie eine ausreichende Informationsdichte, um Bakterien zu unterscheiden. Die größte 16S rDNA Datenbank (Ribosomal Database Project) enthielt mit Stand 1999 6205 Einträge⁷⁹, so dass genügend Informationen verfügbar sind, um die Zielsequenz den Bakterienstämmen richtig zuzuweisen. Die Zellzahl der hier eingesetzten Templates beträgt zwischen $2 \cdot 10^5$ und $2 \cdot 10^3$ Zellen/PCR-Ansatz.

PCR-Bedingungen

Die Zellzahl der ersten Untersuchungen beträgt $2 \cdot 10^5$ Zellen / PCR-Ansatz. Da die eingesetzten Bakterienzellen zum großen Teil noch intakt sind, wird vor der eigentlichen PCR ein Denaturierungsschritt von 10 min bei 94°C durchgeführt. Das Erhitzen der Zellen ist der einfachste und schnellste Weg des Zellaufschlusses. Andere Verfahren wie Ultraschall und

^{xv} Herolab Transilluminator, mit 6 UV-Röhren à 8W @ 254 nm

^{xvi} Medienzusammensetzung s. Anhang 7.4.2

^{xvii} Im Institut sind nur Arbeiten zulässig, die Sicherheitsstufe 1 zugeordnet sind. *Cl. botulinum* ist in Stufe 2 eingestuft, so dass mit diesem Organismus nicht gearbeitet werden darf; vgl. dazu: Infektionsschutzgesetz, das Bundesseuchengesetz und GenTSV abgelöst hat: http://www.rki.de/INFEKT/IFSG/IFSG_BGBL.HTM [05.03.2002]

Freeze/thaw zeigten keine Verbesserung der PCR. Primer werden erst nach der Denaturierung zugegeben. Als Thermocycler wird ein Primus 25 Legal PCR System der Firma MWG eingesetzt. Aus Tabelle 1 ist das benutzte PCR-Protokoll ersichtlich. Da das Amplikon eine Größe von 701 Basenpaaren (bp) besitzt, reicht bei Einsatz der AGSGold™ DNA Polymerase eine Elongationszeit von 30 sec. aus⁸⁰.

Tabelle 1, PCR-Protokoll

Zyklus	PCR-Phase	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Bemerkung
	Denaturierung	94	600	Zell-Lyse
1	Denaturierung	94	30	
	Annealing	50 – 58	30	Je nach Ansatz
	Elongation	72	30	
2-30	Denaturierung	94	30	
	Annealing	50 – 58	30	Je nach Ansatz
	Elongation	72	30	
31	Elongation	72	600	
31	Kühlung	4	- ∞	

Primer

Primer werden aus der NCBI-Datenbank⁸¹ mit dem Programm Primer3⁸² ausgewählt. Der linke Primer startet bei 579bp und hat eine Länge von 26 Basen, der rechte bei 1287bp mit einer Länge von 27 Basen. Die Schmelztemperatur der Primer wurde nach der G-/C-Regel berechnet^{xviii} (Formel s. Anhang 7.4.4).

Tabelle 2, PCR-Primer

Bezeichnung	Sequenz	Schmelztemperatur
Linker Primer 26 Basen	5'> CAA TAA AGT CTA GGG TGA AAG GCT AC <3	59,98°C
Rechter Primer 27 Basen	5'> GAC TTT ATG AGA TTC GCT CCA GAT TAC <3'	61,83°C

Primer wurden von der Fa. Carl Roth, Karlsruhe synthetisiert. Die Konzentration der Primer im PCR-Ansatz beträgt jeweils 200fmol. Die optimale Annealing-Temperatur (T_a) sollte 5°C unter der errechneten Schmelztemperatur (T_m) der Primer liegen⁸³.

Bestimmen der Annealing Temperatur

In einem ersten Schritt wird die Annealing-Temperatur optimiert. Da kein Gradienten-Cycler zur Verfügung steht, werden mehrere PCR-Läufe mit Annealing-Temperaturen von 50° - 58°C durchgeführt. Es wird AGSGold™ DNA Polymerase der Firma Hybaid eingesetzt.

^{xviii} mit dem Internetprogramm primer3 v0.2 berechnet

Tabelle 3 PCR-Ansatz

Eingesetzte Menge (µL)	Substanz
1	Template DNA (Zellzahl: $5 \cdot 10^5$ / Ansatz)
1	3'-Primer (Konzentration 200 fmol)
1	5'-Primer (Konzentration 200 fmol)
1	dNTP-Mix (Konzentration 800 µM)
1	Taq-Polymerase (1 unit)
5	Reaktionspuffer, komplett (MgCl ₂ -Gehalt: 1,5 mM)
40	H ₂ O, bidest

Die Wahl der Temperatur ist für diese Applikation aufgrund der guten Amplifizierung wenig kritisch. Die gewählten Primer weisen über den gesamten Temperaturbereich deutlich sichtbare Banden auf. Für die weiteren Applikationen wird als Annealing-Temperatur 55°C gewählt, da sie die stärkste Bande im Gel ergibt (s. Anhang Abb.: 7.15). Damit entspricht das Ergebnis auch den theoretischen Berechnungen.

Vergleich verschiedener PCR-Kits

Nach Feststellen der optimierten Annealing-Temperatur werden PCR-Kits verschiedener Hersteller - wie in Tabelle 4 aufgeführt - unter vergleichbaren Bedingungen getestet.

Tabelle 4, verwendete PCR-Kits

Hersteller	Produkt
Hybaid	AGS Gold DNA Polymerase (Taq)
Hybaid	AGS Proof Sprinter DNA Polymerase (Taq/Pwo Mix)
Biozym	Master Amp PCR Core Kit (Taq)
Takara	Taq
Takara	Ex-Taq

Die Konzentration der Ausgangstemplates beträgt $2 \cdot 10^5$, $2 \cdot 10^4$ und $2 \cdot 10^3$ Zellen. Es werden PCR-Ansätze ohne Zugabe von Huminsäure und mit 1, 10 und 100 µg/mL Huminsäure durchgeführt. Dabei ergeben alle untersuchten Kits bei einer Zellzahl von $2 \cdot 10^5$ Zellen in etwa gleich starke Banden. Mit dem MasterAmp PCR Core Kit ohne Enhancer kann auch bei einer Zellzahl von $2 \cdot 10^3$ Zellen/Ansatz und einer HS-Konzentration von 1 µg/mL im Ausgangstemplate (= 20 ng/mL im PCR-Ansatz) eine starke Bande nachgewiesen werden. Alle anderen PCR-Kits, einschließlich des MasterAmp PCR Core Kit mit Enhancer, ergeben keine oder nur schwache Banden im Gel, da Huminsäure die PCR erheblich inhibiert (Auswertung im Anhang, Tabellen: 21-26). Dieses Ergebnis bestätigt einschlägige Literaturangaben⁸⁴. Für die folgenden Arbeiten wird das MasterAmp PCR Core Kit, ohne Enhancer, eingesetzt.

Optimierung durch Zugabe von BSA und MgCl₂

Anhand der MALDI-Spektren konnte gezeigt werden, dass Huminsäure BSA komplexiert. Basierend auf diesem Befund wird BSA in unterschiedlichen Konzentrationen zum Template-Ansatz gegeben. Sollte Huminsäure mit BSA einen stärkeren Anlagerungskomplex bilden als mit der zu amplifizierenden DNA, kann dadurch eine Verbesserung der PCR im Beisein höherer Huminstoff-Konzentrationen erreicht werden. Außerdem wird die MgCl₂-Konzentration variiert, da Mg²⁺-Ionen die Enzymaktivität der Polymerase beeinflussen. Sie bilden mit den Nukleotiden einen löslichen Komplex, wodurch das Substrat gebildet wird, das durch die Polymerase erkannt wird. In der Regel wird eine Konzentration von 1,0 bis zu 2,5 mM MgCl₂/Ansatz eingesetzt, da ein Überschuss freier Mg²⁺-Ionen zu unspezifischen PCR-Produkten führt. Für diese Untersuchungen wird der Standard PCR-Ansatz gemäß Tabelle 5 geändert.

Tabelle 5

PCR-Ansatz mit BSA und erhöhtem MgCl₂-Zusatz

1 µl Template (s. Tabelle)
2 µl Taq (1 unit)
3 µL Primer-Mix (je 300fmol)
4 µl DNTP-Mix (800µM)
5 µl 10fach Puffer (Zusammensetzung s. Anhang)
3,5 / 7 µL / 10 µL 25 mM MgCl ₂ (∞ 1,75/3,5/5 mM)
ad 50 µl H ₂ O

4.2.1.4 Ergebnisse

Wie aus den Tabellen 6 – 8 ersichtlich, lässt sich eine Änderung der Produktmenge durch Veränderung der BSA-Konzentrationen erst ab einer HS-Dotierung von 10 bzw. 100µg/mL im Ausgangstemplate feststellen. Hier zeigt sich der Einfluss von BSA auf die PCR, wobei eine Konzentration von 500µg/mL optimal ist. Selbst bei hohen HS-Konzentrationen von 100 µg/mL, wie sie normalerweise nur in Grundwasser⁸⁵ und Böden vorkommen, war die PCR erfolgreich. Allerdings wird mit einer BSA-Konzentration von 500 µg/mL auch ein Optimum erreicht, da die PCR bei einer Erhöhung auf 1 mg/mL inhibiert wird.

Huminsäuren komplexieren Alkali- und Erdalkaliionen⁸⁶, so dass auch die Veränderung der MgCl₂-Konzentration die PCR beeinflussen kann. Für den gewählten PCR-Ansatz ist die optimale MgCl₂-Konzentration 3,5mM pro PCR-Ansatz und liegt damit über den üblichen Werten für einen PCR-Ansatz. Der Unterschied zwischen 1,75mM und 3,5 mM pro PCR-Ansatz wird erst ab einer HS-Konzentration von 10µg/mL im Ausgangstemplate sichtbar. Eine Konzentration von 5 mM MgCl₂ unterdrückt die PCR.

Tabelle 6

c(HS) BSA [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	0 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	10 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	100 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	c(MgCl ₂) = 1,75 mM/50 μL
0	1	6	11	16	Stammlsg. 10% verdünnt
100	2	7	12	17	31 μM / PCR-Ansatz
250	3	8	13	18	77 μM / PCR-Ansatz
500	4	9	14	19	154 μM / PCR-Ansatz
1000	5	10	15	20	308 μM / PCR-Ansatz

Tabelle 7

c(HS) BSA [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	0 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	10 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	100 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	c(MgCl ₂) = 3,50 mM/50 μL
0	1	6	11	16	Stammlsg. 10% verdünnt
100	2	7	12	17	31 μM / PCR-Ansatz
250	3	8	13	18	77 μM / PCR-Ansatz
500	4	9	14	19	154 μM / PCR-Ansatz
1000	5	10	15	20	308 μM / PCR-Ansatz

Tabelle 8

c(HS) BSA [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	0 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	10 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	100 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	c(MgCl ₂) = 5,00 mM/50 μL
0	1	6	11	16	31 μM / PCR-Ansatz
100	2	7	12	17	77 μM / PCR-Ansatz
250	3	8	13	18	154 μM / PCR-Ansatz
500	4	9	14	19	308 μM / PCR-Ansatz
1000	5	10	15	20	31 μM / PCR-Ansatz

*Legende:

	Starke Bande im Gel
	Deutliche Bande
	Schwache Bande
	Kein Amplifikat

Die Inhibierung der PCR wurde von McGregor et.al. der Anlagerung von Huminstoffen an die Polymerase bzw. die Ziel-DNA zugesprochen. Sie konnten durch Zugabe von 100 μM BSA den inhibierenden Effekt von mindestens 4 μg Huminsäure aufheben⁸⁷. Allerdings arbeiteten sie bei konstanter MgCl₂-Konzentration (2,5mM). Eine Folgerung der hier durchgeführten Untersuchungen ist, dass eine Variation der MgCl₂-Konzentration ein weiterer wichtiger Faktor ist, um den Einfluss der Huminsäure auf die PCR zu unterdrücken. Huminstoffe wirken auch über Metalle auf die Effektivität von Enzymen. Die im Überschuss zum Reaktionsansatz gegebenen Kationen werden von der Huminsäure komplexiert, was eine Konformitätsänderung bewirkt und zur Aufhebung der Enzyminhibierung führen kann⁸⁸. Durch die Kombination einer BSA-Zugabe von 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zum Ausgangstemplate (\approx 140 μM

BSA/PCR-Ansatz⁸⁹⁾ zusammen mit einer 3,5mM MgCl₂-Konzentration im PCR-Ansatz kann die PCR im hier untersuchten Fall im Beisein hoher Huminsäure-Konzentrationen optimiert werden. Damit kann die PCR als Methode eine wichtige Ergänzung beim Nachweis clostridialer Neurotoxine sein.

4.2.2 Immunologische Nachweise aufgrund von Affinitätswechselwirkungen

Immunologische Nachweisverfahren basieren auf der Fähigkeit von Antikörpern, Substanzen spezifisch zu binden und spielen seit langem⁹⁰ eine Rolle in der Proteinanalytik. Sie werden vor allem in der medizinischen Diagnostik und der Lebensmittelanalytik eingesetzt. Antikörper, die aus dem Blut eines immunisierten Tieres gewonnen werden, sind polyklonal, da sie von vielen verschiedenen B-Zellklonen gebildet wurden, von denen jeder für ein bestimmtes Epitop des zur Immunisierung verwendeten Antigens spezifisch ist⁹¹. Nach einer bereits 1975 entwickelten Methode⁹² entstehen aus der Fusion von Lymphozyten des immunisierten Tieres und Myelomzellen sogenannte Hybridomazellen, die Antikörper produzieren, die nur von einem Zellklon stammen und deshalb als monoklonal bezeichnet werden. Vorteil dieser Antikörper gegenüber polyklonalen sind ihre Homogenität und eine z.T. bessere Spezifität⁹³.

Als immunologische Reaktionen werden reversible Assoziationsreaktionen bezeichnet, die zwischen hydratisierten Immunoglobulinen und ihren ebenfalls hydratisierten Antigenen ablaufen und zur Bildung von Immunkomplexen führen. Die Bindungskräfte, die dabei eine Rolle spielen, sind schwache Wechselwirkungen, wie Coulomb und Van der Waal'sche Kräfte sowie Wasserstoffbrücken- und hydrophobe Bindungen⁹⁴. Das ermöglicht die Trennung immunologisch gebundenem von ungebundenem Material während des Analyseverfahrens und bietet im hier untersuchten Fall eine Möglichkeit, Toxin von HS zu trennen. Dabei ist die Trennung abhängig von der reproduzierbaren Adsorption des Reaktanden auf der Oberfläche eines Trägers.

Abschnitt 3.1 zeigte, dass die nachzuweisenden proteolytischen Toxine durch Huminsäure komplexiert werden und damit einen Nachweis verhindern. Der Vorteil der Affinitätstrennung ist eine sehr hohe Selektivität, mit der aus komplexen Mischungen ein Protein in einem einzigen Schritt isoliert werden kann⁹⁵. Ziel der Untersuchungen im folgenden Abschnitt ist es daher festzustellen, inwieweit Affinitätswechselwirkungen zwischen Antikörpern (AB) und dem Zielprotein ausgenutzt werden können, um den maskierenden Effekt der Huminsäure zu eliminieren, so dass ein schneller und empfindlicher Nachweis des Toxins unabhängig von der HS-Konzentration verwirklicht werden kann, ohne langwierige Aufarbeitungsmethoden vorschalten zu müssen.

Als Antigen (AG) wird weiterhin ungiftiges Toxoid eingesetzt, das in *E. coli* exprimiert wurde. Als Antikörper werden ein monoklonaler Antikörper aus Maus und ein polyklonaler aus Pferd verwendet (s. Anhang 7.5.1).

4.2.2.1 ELISA

Der ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ist in der Medizin bzw. Immunologie ein routinemäßig durchgeführtes Verfahren zum Nachweis von Antikörpern bzw. Antigenen. Dabei wird die Eigenschaft von Proteinen (einschließlich Antikörpern) ausgenutzt auf einer Kunststoffoberfläche physisorbiert zu werden. In einem folgenden Schritt werden die freien Bindungsstellen blockiert und danach ein komplementäres, Enzym markiertes (gelabeltes) Antigen bzw. Antikörper zugegeben. Das so immobilisierte Enzym wandelt geeignete Substrate in einen Farbstoff um, der wiederum photometrisch vermessen werden kann. Es gibt vier verschiedene ELISA-Typen: direkte, indirekte, Sandwich- und kompetitive⁹⁶.

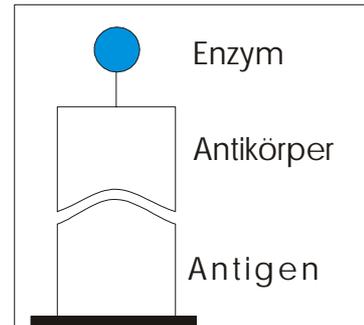


Abb. 12, Bindungsprinzip direkter ELISA

Im Rahmen dieser Arbeit sind ein indirekter und ein direkter ELISA etabliert worden. Bei beiden wurde das Antigen (in diesem Fall TeTX) auf der Polystyroloberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Beim indirekten ELISA wird ein primärer (1°) Antikörper zugegeben, der an dieses Antigen bindet. Nach Abwaschen nicht gebundener Antikörper wird ein gelabelter sekundärer (2°) Antikörper, der spezifisch mit dem primären reagiert, zugegeben. Als Enzym wird Meerrettichperoxidase (horseradishperoxidase, HRP) eingesetzt. Nach weiterer Inkubationszeit und anschließendem Waschschrift wird als Farbsubstrat TMB, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Strukturformel s. Anhang, Abb.: 7.17), zugegeben und die Absorption bei 450 nm gemessen. Im Unterschied dazu ist beim direkten ELISA der primäre Antikörper bereits mit HRP gelabelt. Es kann nach Zugabe des Antikörpers und anschließendem Waschschrift sofort das Farbagens zugegeben und die Absorption gemessen werden.

Im Gegensatz zu diesen beiden Methoden wird beim Sandwich-ELISA zuerst ein Antikörper auf der entsprechenden Oberfläche immobilisiert. Nach dem Waschen wird die Analytlösung mit dem gesuchten Antigen zugegeben und nach weiterem Waschen ein zweiter Antikörper, der spezifisch mit dem gesuchten Antigen reagiert. Die Farbreaktion kann hier

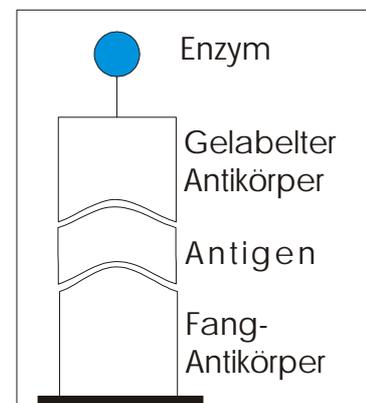


Abb. 13, Bindungsprinzip Sandwich-ELISA

wiederum direkt oder indirekt über einen dritten Antikörper erfolgen. Der Vorteil des Sandwich-ELISA gegenüber den einfachen ist die geringere Gefahr unspezifischer Antigen-Antikörper-Reaktionen ist. Allerdings ist eine Voraussetzung für das Gelingen des Assays, dass ausreichend freie Bindungsstellen vorhanden sind, die nicht bereits belegt sind. Beim kompetitiven ELISA konkurrieren zwei Reaktanden um einen dritten. Auch hier gibt es wieder direkte bzw. indirekte Ansätze.

Einfluss von Huminsäure

Vorteil eines indirekten ELISA gegenüber einem direkten ist, dass durch Einsatz des sekundären Antikörpers mit einem Assay mehrere Toxine gleichzeitig nachgewiesen werden können, solange der primäre Antikörper von einer Tierart gewonnen wurde. Um das Ausmaß der Störung von Huminsäure zu bestimmen, muss das Verhältnis des primären zum sekundären AB optimiert werden. Als primärer Antikörper wird ein monoklonaler AB aus Maus, als sekundärer ein monoklonaler aus Ziege (s. Anhang 7.5.1), eingesetzt.

TeTX (100µL/well) physisorbiert über Nacht (16h) bei +4°C auf einer 96well Polystyrol-Mikrotiterplatte^{xix}. Für die meisten Proteine wird eine optimale Adsorption bei einer Konzentration von 1-10µg Protein/mL coating-Puffer^{xx}erreicht⁹⁷, weshalb hier eine Konzentration von 3µg/mL gewählt wird. Der Assay wird nach einem Standardprotokoll durchgeführt, das im Anhang unter 7.5.2 beschrieben ist.

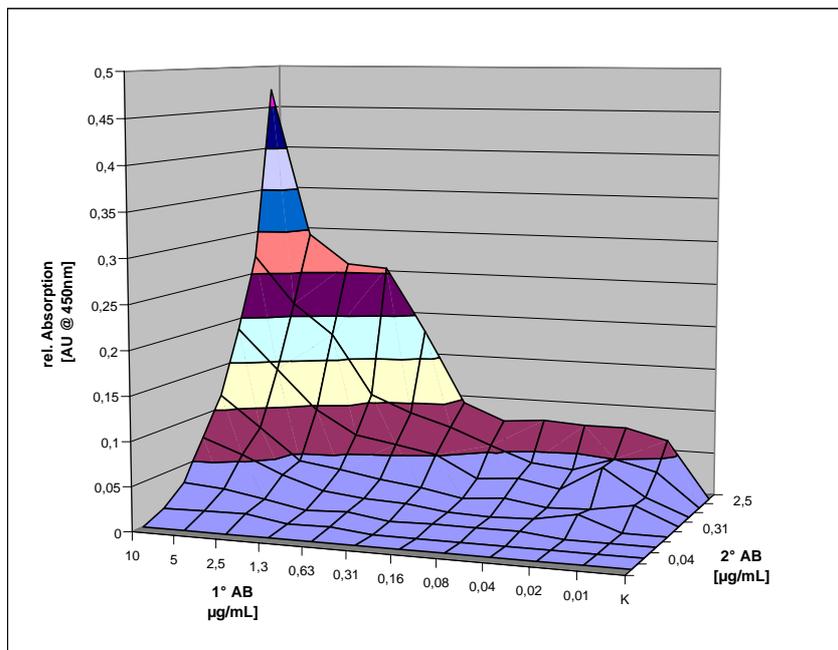


Abb. 14, Auswahl des optimalen Verhältnisses 1°-/2°-Antikörper

^{xix} PS-Mikroplatte, Greiner

^{xx} HCO₃⁻-Lösung, pH 8,3

Als Ergebnis kann festgehalten werden, dass eine Konzentration von 2,5 $\mu\text{g/mL}$ für 1°AB und 2°AB eine ausreichend hohe Absorption für die folgenden Untersuchungen besitzt. Bei einer Belegung von 3 $\mu\text{g/mL}$ Antigen wird eine relative Absorption von 0,26AU @450nm erreicht. Um Erkenntnisse über die Bindungsfähigkeit des TeTX im Beisein von HS zu erhalten, werden in einem weiteren Assay Huminsäurelösungen unterschiedlicher Konzentration von 2 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$ und 200 $\mu\text{g/mL}$ mit TeTX (c_0 :36 $\mu\text{g/mL}$) dotiert. Die TeTX-Konzentration im coating-Puffer beträgt 3,6 $\mu\text{g/mL}$, wobei der pH-Wert auf 8,3 eingestellt wird. Die Immobilisierung erfolgt über Nacht (16h) bei +4°C. Der Assay wird wie in Anhang 7.5.2 durchgeführt, wobei unterschiedliche Antikörper-Konzentrationen eingesetzt werden: für den 1° AB 2,5 $\mu\text{g/mL}$ bzw. 1,25 $\mu\text{g/mL}$ und für den 2° AB: 2,5 $\mu\text{g/mL}$ bzw. 1,25 $\mu\text{g/mL}$. Der Assay wird unabhängig von der Konzentration der Huminsäure fast vollständig inhibiert. Bei einer Konzentrationen von 2 $\mu\text{g/mL}$ Huminsäure wird der ELISA um über 80% inhibiert und suggeriert damit einen viel zu niedrigen Toxingehalt. Die Positivkontrollen (ohne HS) bestätigen die Ergebnisse des 2D-ELISA.

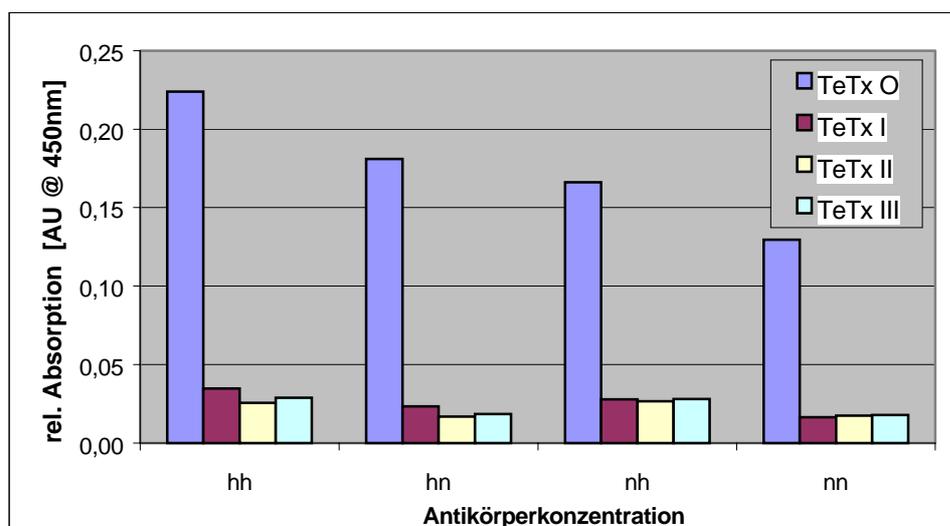


Abb. 15, Immobilisierung des Antigens in Abhängigkeit von der Konzentration der Huminsäure

*Legende:

hh:	2,5 $\mu\text{g/mL}$ 1°AB	2,5 $\mu\text{g/mL}$ 2°AB
hn:	2,5 $\mu\text{g/mL}$ 1°AB	1,25 $\mu\text{g/mL}$ 2°AB
nh:	1,25 $\mu\text{g/mL}$ 1°AB	2,5 $\mu\text{g/mL}$ 2°AB
nn:	1,25 $\mu\text{g/mL}$ 1°AB	1,25 $\mu\text{g/mL}$ 2°AB

TeTX O:	keine Huminsäure
TeTX I:	2 $\mu\text{g/mL}$ Huminsäure
TeTX II:	20 $\mu\text{g/mL}$ Huminsäure
TeTX III:	200 $\mu\text{g/mL}$ Huminsäure

Aufreinigung

Es wurden verschiedene Verfahren untersucht, um den unter 3.1 ermittelten Huminsäure-Toxin-Komplex vor der Analytik aufzubrechen. Mit keinem der untersuchten Verfahren war

eine Trennung möglich. Aufgrund der Größe der hier eingesetzten Huminsäure (~4kDa) und des untersuchten Toxins (~150kDa) bieten sich Verfahren an, die auf dem Größenausschlussprinzip basieren. Für grundlegende Untersuchungen wurde auf BSA als Modellprotein zurückgegriffen. Der Nachweis erfolgte über den BCA-Test. So wurden Ultrafiltrationen (cut-off 30 kDa) und Dialyse (cut-off 25 kDa) durchgeführt.

Auf einer BioLogic LP FPLC-Anlage (BioRad) kamen verschiedene chromatographische Trennverfahren wie Ionenaustausch-/Hydrophobic-Interaction und Gelchromatographie zum Einsatz. Eine Trennung des Huminsäure-Protein-Komplexes konnte nicht erreicht werden. Mit Ultraschall- und Freeze-/thaw-verfahren wurden ebenfalls keine Ergebnisse erzielt. Auch die Kombination von Freeze-/thaw mit Ultraschall, anschließender Ultrafiltration und verschiedenen chromatographischen Trennverfahren über FPLC (mit BioRad EconoPac High Q, CHT II, Methyl HIC, t-Butyl HIC Säulen) ermöglichte keine Trennung des Komplexes.

Optimierung der Versuchsbedingungen

Da mit den zuvor genannten Methoden keine Trennung des Komplexes erreicht wurde, war Ziel der Optimierung, den maskierenden Effekt der Huminsäure soweit zurückzudrängen, dass Toxin in wässrigen Proben nachgewiesen werden kann. Dazu werden verschiedene Zusätze und Puffer untersucht und ein Vergleich verschiedener Parameter wie Zeit, Temperatur und pH-Wert vorgenommen. Neben dem indirekten ist ein direkter ELISA etabliert worden.

Statt einer über Nacht Immobilisierung bei +4°C wurde eine 60-minütige Immobilisierung bei 37°C im Schüttelschrank durchgeführt. Die Ergebnisse sind vergleichbar, sowohl im Hinblick auf Empfindlichkeit als auch Störung der Huminsäure, so dass im folgenden diese Parameter zur Immobilisierung benutzt werden. Vergleiche zwischen PBS, pH 7,4 und HCO₃⁻-Lösung, pH 8,3 zeigen, dass TeTX in PBS nicht auf der Mikrotiterplatte immobilisiert wird. Nach Optimierung der Molarität des Immobilisierungspuffers auf 0,5M (Ergebnisse s. Anhang Abb. 7.18) werden pH-Wert und Puffer optimiert. Dazu wird die bis dahin eingesetzte HCO₃⁻-Lösung mit einem HCO₃⁻/CO₃²⁻-Puffersystem, das den pH-Bereich von pH 9-11 abdeckt, verglichen. Die eingesetzte Toxin-Konzentration beträgt 2 µg/mL.

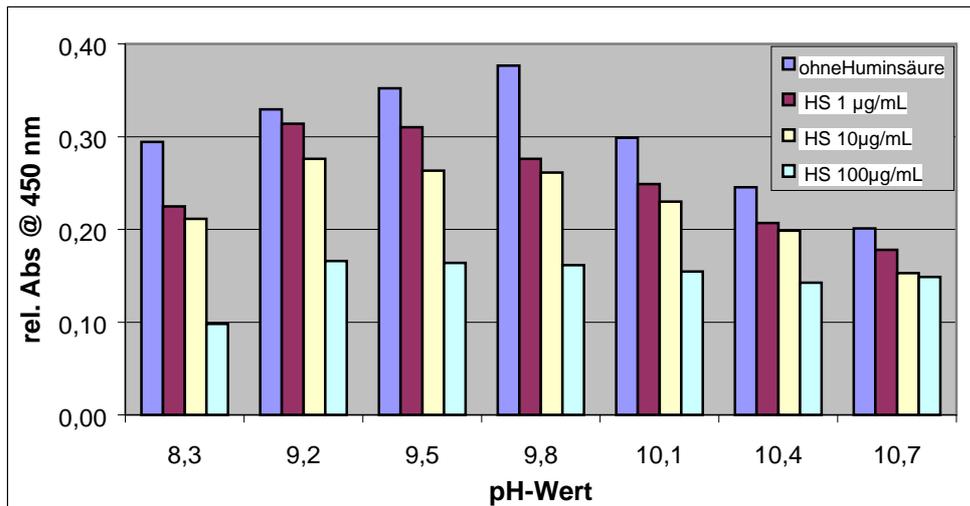


Abb. 16, Immobilisierung von TeTX bei verschiedenen pH-Werten

Das $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ -Puffersystem eignet sich über den ganzen betrachteten pH-Bereich besser als HCO_3^- -Lösung. Die beste Reproduzierbarkeit bis zu einem HS-Gehalt von $10\mu\text{g/mL}$ wird bei pH 9,2 erreicht. Der Fehler liegt bei 6,6%. Bei gleichem pH-Wert nimmt die Absorption in $100\mu\text{g/mL}$ HS um 50% ab. Damit kann bis zu $10\mu\text{g/mL}$ HS noch quantitativ, darüber nur qualitativ gemessen werden. Möglicherweise sind die Bindungsstellen zwischen monoklonalem AB und Toxin durch Huminsäure sterisch blockiert. Der Vorteil polyklonaler gegenüber monoklonalen AB ist, dass sie an mehreren Epitopen des Zieltoxins binden können. In den folgenden Arbeitsschritten wird ein polyklonaler AB eingesetzt, da damit eine größere Wahrscheinlichkeit gegeben ist, dass er im Beisein von HS an ein nicht komplexiertes Epitop bindet.

Um die Analysedauer weiter zu reduzieren, wurde ein direkter ELISA etabliert, der zu einer Zeitersparnis von ~60min führt. Dazu wurde der aufgereinigte polyklonale Antikörper mit E/Z-aktivierter Peroxidase (Pierce, 31489) gelabelt⁹⁸ (s. Anhang, Abb.: 7.16). Das Versuchsprotokoll des direkten ELISAs entspricht dem des indirekten, wobei der Bindungsschritt des 2°AB mit dem 1°AB wegfällt (s. Anhang 7.5.2.2). Zur Ermittlung des optimalen AB*/AG-Verhältnis wird wiederum ein 2D-ELISA durchgeführt (s. Anhang, Abb.: 7.19). Bei einem Ansatz von $2,5\mu\text{g/mL}$ AB* (* = HRP-gelabelt) und $2,5\mu\text{g/mL}$ TeTX beträgt die relative Absorption 0,28AU, so dass die Empfindlichkeit dem des indirekten ELISA entspricht.

Durch Veränderung der Messwellenlänge des Plattenreaders von 450 auf 405nm wird eine deutliche Verbesserung der Empfindlichkeit des Assays erreicht (s. Abb.: 17). Beispielsweise sinkt die Nachweisgrenze ($\text{NWG} \propto 3\text{facher Blindwert}$) des Assays beim Einsatz von $5\mu\text{g/mL}$ AB* von 80ng TeTX auf $24,2\text{ng}$ und damit um den Faktor 3,3. Daher wird für alle weiteren Assays eine Wellenlänge von 405nm zur Auswertung benutzt.

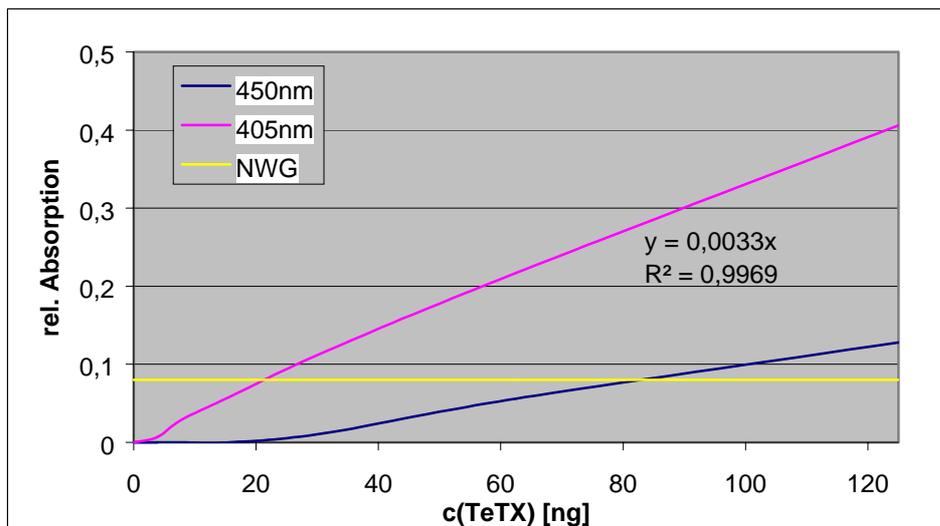


Abb. 17, Absorption bei 405 und 450nm

Um das Hintergrundsignal, das durch unspezifische Bindung des AB* auftritt, noch weiter zu verringern, werden zwei Mikrotiterplatten der Firma NUNC eingesetzt. Die eine, Maxisorp, besitzt eine hohe Bindungsspezifität für G-Proteine, die andere, Polysorp, hingegen eine niedrige⁹⁹. Des Weiteren wird die Effektivität des Waschpuffers mit bzw. ohne Tween-20 untersucht. Die eingesetzte TeTX-Konzentration beträgt 50ng, die AB*-Konzentration 250ng. (Versuchsprotokoll: s. Anlage 7.5.2.2).

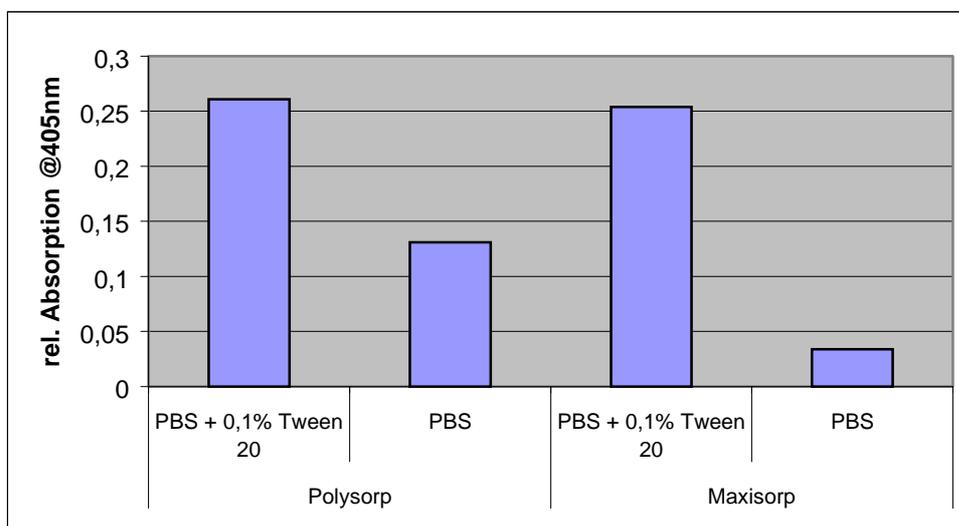


Abb. 18, Optimierung durch Variation von Puffern und Oberfläche

Bei Einsatz von Waschpuffer mit Tween-20 zeigen sich für beide Platten keine Unterschiede in der Absorptionsmessung. Wird nur PBS als Waschpuffer eingesetzt, sind die Unterschiede gravierend. Polysorp bindet das Toxin ~4mal besser als Maxisorp, erreicht aber aufgrund des hohen Hintergrundsignals eine nur halb so große Intensität wie mit Tween-20. Das bedeutet, dass die Waschschritte mit Tween-20-haltigem Waschpuffer nicht abgegebene AB sehr effektiv entfernen. Im Umkehrschluss heißt das außerdem, dass die Blockierung (BSA, 1%ig in

PBS, pH 7) nicht ausreicht, um alle unbesetzten Stellen auf der Plattenoberfläche nach Immobilisierung des Antigens abzusättigen.

Daher wird im folgenden Schritt die Blockierung unbesetzter Stellen durch BSA und FKS (fetales Kälberserum^{xxi}) optimiert. Als Puffer wurde PBS (pH 7) eingesetzt. Unterschiedliche Konzentrationen der untersuchten Proteine führen ebenfalls zu keiner signifikanten Verbesserung (s. Anhang, Abb.: 7.20). Es zeigt sich außerdem, dass die Anzahl der Blockierungsschritte zwischen den einzelnen Immunreaktionen keinen Einfluss auf das Ergebnis hat. Der Einsatz von Carbonatpuffer, pH 9,3, zusammen mit der Polysorp-Mikrotiterplatte führt zu einer deutlich besseren Absättigung. Durch das Unterdrücken unspezifischer Wechselwirkungen wird das Hintergrundsignal soweit vermindert, dass eine Intensitätserhöhung um 45% erreicht wird.

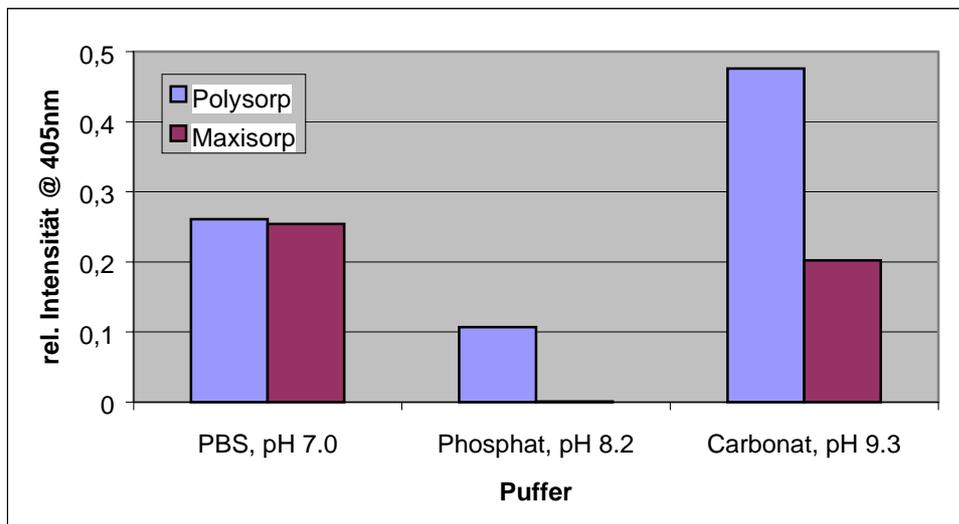


Abb. 19, Einsatz verschiedener Blockierungs-Puffer und Mikrotiterplatten

Auf weiterhin durchgeführten Untersuchungen wird nur am Rande eingegangen, da sie zu keiner signifikanten Verbesserung des Assays führten:

- Der Zusatz unterschiedlicher $MgCl_2$ -Konzentrationen zur Ausgangslösung, die bei der PCR (s. Abschnitt 3.2.1) zu einer Erhöhung der Amplifikate führte, konnte den Assay ebenfalls nicht verbessern. (Ergebnisse s. Anhang, Abb.: 7.21)
- Der Versuch, die Immobilisierungszeit noch weiter zu verkürzen führt zu einer deutlichen Abnahme der Intensität und zu allenfalls qualitativen Ergebnissen. (Versuchsbedingungen s. Anhang, Abb.: 7.22)

^{xxi} Sigma-Aldrich Feinchemikalien, Deisenhofen

Zusammenfassung und Folgerungen

Unter den gegebenen Bedingungen ist ein direkter ELISA aufgrund der Zeitersparnis einem indirekten vorzuziehen, zumal die Empfindlichkeit vergleichbar ist. Der Assay auf TeTX ist wie folgt durchzuführen:

- (1) Nunc Polysorp-Mikrotiterplatte
- (2) 100 μL TeTX immobilisieren mit Immobilisierungspuffer ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$), pH 9,2 für 60min bei 37°C, Schüttelschrank 100 rpm (Certomat H, B.Braun Biotech International)
- (3) Waschen mit Waschpuffer PBS in 0,1% Tween20 (4x à 300 μL)
- (4) Blockieren mit 250 μL BSA 1% in Carbonat-Puffer (0,05M) pH 9,2 für 30min bei RT, Thermomixer (Eppendorf, 5436) (waschen, 4x)
- (5) 100 μL des HRP-gelabelten polyklonalen AB aus Pferd in PBS⁺ für 60min bei RT, Thermomixer (waschen, 4x)
- (6) 100 μL TMB-Substrat, für 20 min bei 37°C, Thermomixer

Die hier vorgenommenen Optimierungen ermöglichen den quantitativen Nachweis von 8,5ng TeTX bis zu einem HS-Gehalt von 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Mit diesem etablierten ELISA auf TeTX kann innerhalb von 3h TeTX mit einer Nachweisgrenze (NWG \approx 3facher Blindwert) von 8,5ng TeTX (Anhang, Abb.: 7.23) nachgewiesen werden. Eine quantitative Aussage kann in bis zu 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ huminsäurehaltiger Lösung getroffen werden (Anhang, Abb.: 7.24). Darüber hinaus sind qualitative Aussagen möglich.

4.2.2.2 Halb-Quantitativer ELISA mit Nunc-Immuno Sticks

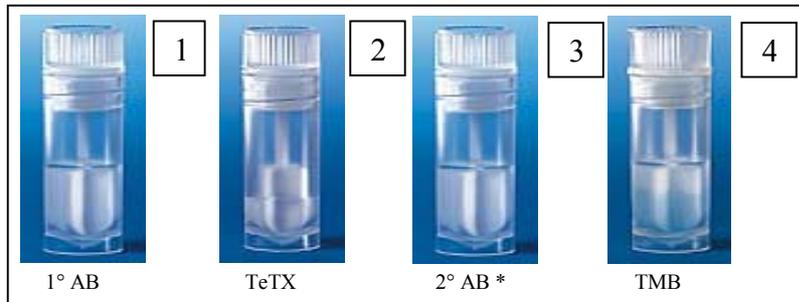
Diese sogenannte Dip-Stick Methode basiert auf einem direkten Sandwich-ELISA. Ziel ist eine Verkürzung der Analysezeit auf 90 min, im Idealfall kombiniert mit einem Einsatz außerhalb des Labors.

Aufbau des Assays

Der Aufbau des Assays wurde von der Firma NUNC übernommen¹⁰⁰. Der erste Schritt ist die Immobilisierung des AB (1mL AB-Lösung, c: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) wie auf Bild 1 gezeigt. Sie erfolgte auf einer G-Protein affinen Polystyroloberfläche (Maxisorp). Dem schließt sich ein Blockierungsschritt mit 1 mL 0,5%iger BSA-Lösung an. Danach muss der Dip-Stick getrocknet werden. Die folgenden Schritte können alle außerhalb des Labors durchgeführt werden.

Vor Ort werden 0,5 mL des Analyten zugegeben (Bild 2) und der Stick für 30 –60 min bei RT inkubiert. Die anschließenden Waschschrte können nach Aussage von NUNC statt mit

Waschpuffer auch mit Leitungswasser durchgeführt werden. Im Anschluss soll 1 mL des gelabelten AB* (Bild 3) zugegeben werden. Nach weiteren 30-60min wird nicht abgebundener AB abgewaschen und wiederum mit Leitungswasser abgespült. Danach folgt Zugabe von 1mL Farbsubstrat (Bild 4). Beim Vorhandensein von Toxin färbt sich der Dip-Stick blau, wobei die obere Hälfte der Kontrolle unspezifischer Bindungen dient.



Störungen

Generell ist ein qualitativer Nachweis von TeTX mit der von Nunc empfohlenen Standardmethode möglich. Allerdings sind vor allem für einen empfindlichen Nachweis folgende Einschränkungen zu machen: Die Flügelfläche von 5,2 cm² ist zu groß und führt zu einer geringeren Empfindlichkeit. Es ist eine eindeutige Negativkontrolle notwendig, um Falsch-Positiv-ergebnisse ausschließen zu können. Wie im vorhergehenden Kapitel festgestellt, kommt dem Waschschritt große Bedeutung zu. Durch den von NUNC empfohlenen Einsatz von Leitungswasser wird nicht abgebundener Antikörper nur unvollständig entfernt, so dass es bei der Negativkontrolle zu leichten Blaufärbungen durch die Reaktion mit TMB-Substrat kommt. Mit Waschpuffer (0,1% Tween20 in PBS) wird die Abgrenzung zwischen Negativkontrolle und Probe schärfer. In der praktische Anwendung hat sich eine mit Puffer gefüllte Spritzflasche als zweckmäßig erwiesen. Ein weiteres Problem ist die Kontamination an der Gefäßwand, da unspezifische Bindungen zu einer Blaufärbung der Lösung führen. Abhilfe schafft nach Zugabe der Probe nur der Wechsel des Reaktionsgefäßes. Vorheriges Absättigen des Reaktionsgefäßes mit Blockierungspuffer (1%-5% BSA in Carbonatpuffer) reicht nicht aus, um die Kontaminationen zu verhindern. Ein weiterer negativer Effekt ist der zu geringe Abstand der Flügelränder zur Gefäßwand. Durch Kapillareffekte im Zwischenraum „wandert“ der Immun-Farbkomplex nach oben und führt so zu unscharfen Grenzen.

Ergebnisse und Ausblick mit Optimierungsmöglichkeiten

Aufgrund der oben angesprochenen Probleme ist ein eindeutiger Nachweis von Toxin mit den NUNC Immunosticks noch nicht möglich. Voraussetzungen für einen halbquantitativen As-

say sind deutlich verkleinerte Flächen, was am besten durch Einsatz eines runden oder flachen Sticks erreicht wird, wodurch auch der Abstand zwischen Stick und Gefäßwand deutlich vergrößert wird. Das eingesetzte Gefäß muss glatt und ohne Proteinbindungsfähigkeit sein.

Diese Optimierungsmöglichkeiten sind behelfsmäßig durchgeführt worden, indem 2 der 4 Flügel abgeschnitten und die verbleibenden Flügel an den Seiten halbiert wurden, so dass sich die Fläche auf $\sim 1,5\text{cm}^2$ verringert. Das Gefäß wurde nach jedem Reaktionsschritt gewechselt. Als Ergebnis ist festzustellen, dass es an den Schnittflächen zu Abbindungsreaktionen des AB* mit der Gefäßwand kommt, weshalb eine Blaufärbungen nicht vollständig unterdrückt und diese Methode allenfalls für ein erstes Screening eingesetzt werden kann.

4.2.2.3 High Performance Monolithic Affinity Disk Chromatography

Der im ersten Abschnitt etablierte direkte ELISA ermöglicht einen quantitativen Nachweis von TeTX in Huminsäure belasteten Proben bis zu einem HS-Gehalt von $10\mu\text{g/mL}$. Ziel der hier durchgeführten Untersuchungen ist eine deutliche Verkürzung der Analysezeit unter Inkaufnahme eines erhöhten apparativen Aufwands.

Anfang der 90er Jahre entwickelte Tennikova et al.¹⁰¹ die High Performance Monolithic Affinity Disk Chromatography (HPMADC). Dabei handelt es sich um ein affinitätschromatographisches Trennverfahren, dessen Vorteile gegenüber säulenchromatographischen Verfahren bei verschiedenen Anwendungen^{102,103} bestätigt wurden. Dies sind hohe Flussraten bei geringem Druckaufbau, kurze Analysezeiten und die Möglichkeit der Aufkonzentrierung gering konzentrierter Proteinlösungen. Im vorliegenden Fall werden die biospezifischen Wechselwirkungen zwischen Antikörper und Toxin genutzt, um TeTX selektiv aus einer aufgegebenen Probe heraus zu adsorbieren.. Das Prinzip basiert darauf, dass ein Fangantikörper kovalent auf einer GMA-EDMA- (Glycidylmethacrylat-coethylendimethacrylat-)Disk^{xxii} gebunden wird (s. Anhang, Abb.: 7.25). Die Elution des TeTX erfolgt durch Konformationswechsel aufgrund pH-Wert Änderung.

Nachweis von TeTX in huminsäurehaltiger Lösung

Die Bindungsreaktion des Antikörpers auf die epoxy-aktivierte Disk erfolgt in Anlehnung an die von Kasper beschriebene Methode und ist im Anhang 7.5.3 aufgeführt. Als Antikörper wird der gleiche aufgereinigte polyklonale AB eingesetzt, der auch für den direkten ELISA verwendet wurde.

Der apparative Aufbau der Affinitätsdisk-Chromatographie zur Bestimmung von TeTX ent

^{xxii} Bezug über Firma. BIA.doo, Ljubliana, Slowenien

spricht der im Anhang, Abb.: 7.26 schematisch dargestellten Anlage. Über eine Gradientenpumpe können Proben mit binärem Gradienten chromatographiert werden. Die Gradientenformung erfolgt Software-gesteuert^{xxiii} über eine CIM-Box, Datenaufnahme über eine CSI-Box, die mit Rechner und Detektor verbunden ist. Zur Datenaufnahme und –auswertung wird APEX-Software^{xxiv} eingesetzt und als Detektor ein Fluoreszenz-Detektor mit λ_{EX} :280nm, λ_{EM} :340nm verwendet.

In der von Kasper¹⁰⁴ beschriebenen Elutionsmethode wird PBS-Puffer (150mM NaCl in 10mM Phosphatpuffer), pH 7, als Beladungspuffer eingesetzt, die Elution erfolgt mit HCl (10mM), pH 2, bei einer Flussrate von 2 mL/min. Die Analysezeit beträgt 4 min. Aufgrund eigener Ergebnisse bei der Immobilisierung von TeTX auf Mikrotiterplatten werden verschiedene Beladungspuffer verglichen. Wie aus Abb. 20 ersichtlich, schwankt das Messsignal für die betrachteten Beladungspuffer im pH-Bereich von 6,5-9,5 um 8%. Damit befindet sich die Schwankung im Bereich der Reproduzierbarkeit der Methode, deren Gesamtfehler bei ~10% liegt. Bei pH 10,7 kann lediglich 1/3 des aufgegebenen Toxins am immobilisierten AB binden. Alle weiteren Messungen werden mit PBS, pH 6,5 als Beladungspuffer durchgeführt.

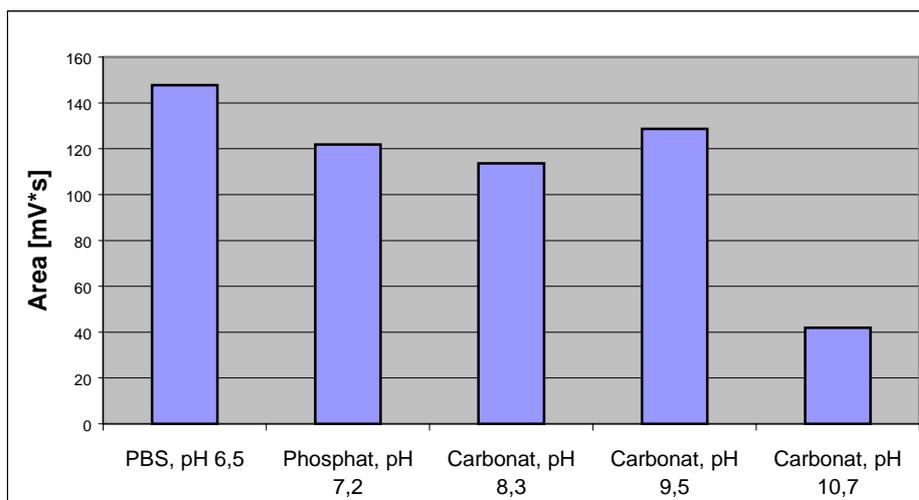


Abb. 20, TeTX (5µg) in verschiedenen Beladungspuffern

Im folgenden Versuch wird TeTX in Huminsäure dotiertem Wasser nachgewiesen. Messbedingungen werden gleich gehalten. Die TeTX-Konzentration beträgt 5µg/mL. Nach Ultrafiltration mit Eppendorf 0,5mL Centrifugal Filter Tubes (MWCO: 30kDa) in einer Eppendorf Centrifuge (5415C) wird der Filtrerrückstand in 100µL PBS aufgenommen und auf die HPLC gegeben.

^{xxiii} mit der Software M320-A, HPLC Gradient Workstation Version 2.17, Autochrom Inc., USA

^{xxiv} M625-1, Version 2.15, Autochrom Inc., USA

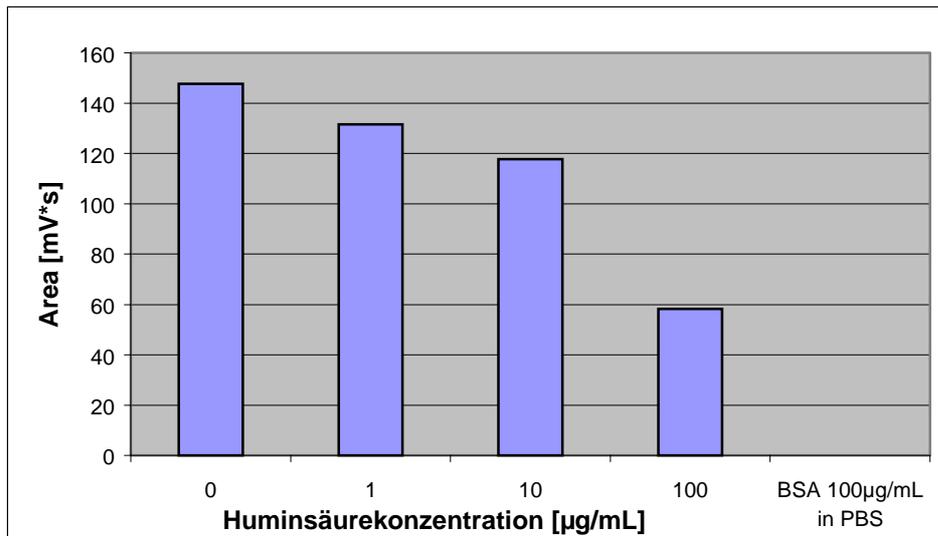


Abb. 21, TeTX (5µg) in verschiedenen HS-Konzentrationen

Bis zu einer Konzentration von 10µg/mL Huminsäure beträgt der Fehler der Messwerte unter 8%. Bei einer Huminsäurekonzentration von 100µg/mL wird noch die Hälfte des Toxins auf der Disk gebunden, was einen qualitativen Nachweis von TeTX in Huminsäure ermöglicht (s. Abb.: 21). Als Negativprobe wurde BSA (100µg/mL in PBS) vermessen. Wie aus den Spektren (Abb. 22 und 23) ersichtlich, wird BSA im Gegensatz zu TeTX gleich am Anfang eluiert und bindet nicht auf der Disk.

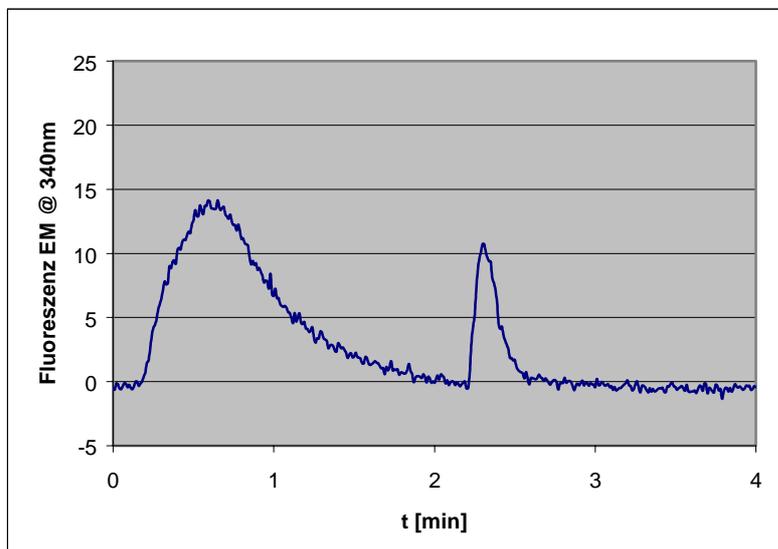


Abb. 22, TeTX (5µg) mit Disk-Chromatographie

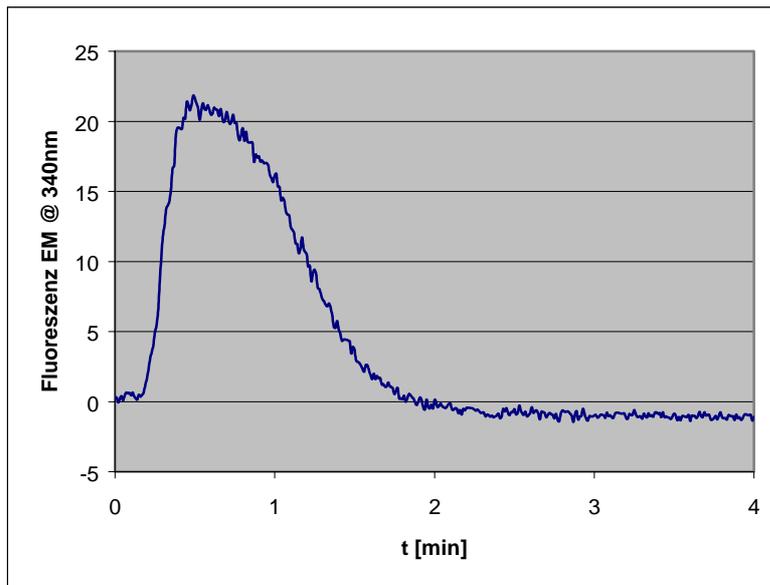


Abb. 23, BSA mit Disk-Chromatographie

In weiteren Versuchen wird die Flussrate auf 4mL/min erhöht, was die Analysezeit zwar auf 2 min reduziert, aber aufgrund der nicht ausreichenden Pulsationsdämpfung der verwendeten Pumpe zu einer deutlichen Abnahme der Nachweisgrenze führt.

Durch Mehrfachbeladung der Disk konnte die Menge gebundenen TeTX auf der Disk erhöht werden. Dabei wurde die Disk mit zwei verkürzten HPLC-Läufen von jeweils 2 min mit je 5µg/mL TeTX beladen. Nach einer weiteren Beladung mit ebenfalls 5µg/mL TeTX erfolgt Elution mit HCl, pH 2. Die Ergebnisse waren nicht reproduzierbar und werden im Rahmen dieser Untersuchungen nicht weiter verfolgt.

Eignung der HPMADC zum Nachweis von TeTX in Wasser

Die hier vorgestellte Methode eignet sich zur direkten Toxinbestimmung in Wasser, wobei ein quantitativer Nachweis von 5µg/mL TeTX in Lösungen mit einem Huminsäuregehalt bis 10µg/mL möglich ist, qualitativ bis 100µg/mL Huminsäure. Die Leistungsfähigkeit der HPMADC ist noch nicht ausgereizt, da durch Optimierung der Immobilisierungsreaktionen, des Puffersystems und höheren Flußraten die Nachweisgrenze und Analysezeit deutlich vermindert werden könnte. Die Haltbarkeit der Disks ist zufriedenstellend, da mit einer Disk drei Monate gemessen wurde, ohne eine Abnahme der Empfindlichkeit festzustellen. Denkbar wäre eine kontinuierliche Trinkwasserüberwachung in Leitungen oder Zisternen, da der HS-Gehalt dort sehr niedrig sein wird. Um dies zu realisieren, muss die NWG weiter erniedrigt werden, was mit der hier untersuchten Methode nicht möglich war. Außerdem muss die Reproduzierbarkeit der Messwerte bei Mehrfachbeladungen erreicht werden.

4.2.2.4 Vergleich der untersuchten immunologischen Methoden

Die hier untersuchten immunchemischen Nachweissysteme decken die beiden wichtigsten analytischen Felder ab –Empfindlichkeit und Schnelligkeit, allerdings diametral. Der schnelle Nachweis der Diskchromatographie erreicht keine ausreichende Nachweisempfindlichkeit; der um den Faktor 500 empfindlichere direkte ELISA benötigt ~3h bis Ergebnisse vorliegen. Dieser Wert relativiert sich, wenn viele Proben vorliegen, die dann gleichzeitig abgearbeitet werden können. Ein passabler Kompromiss wäre der halbquantitative Sandwich-ELISA mit NUNC Dip-Sticks. Eine Weiterentwicklung ist nach Aussage von NUNC, Deutschland aber nicht geplant¹⁰⁵, so dass sie auf absehbare Zeit keine brauchbare Alternative darstellen.

Allen Verfahren gemeinsam ist, dass sie bis zu einem Huminsäuregehalt von 10µg/mL quantitative Ergebnisse liefern, darüber hinaus jedoch nur für qualitative Aussagen verwertet werden können und damit nur Analysen in wässrigen Medien durchführbar sind.

Als Fazit kann festgehalten werden, dass ohne ein wirkungsvolles Aufbrechen des Huminsäure-Toxin-Komplexes keine sicheren Aussagen über Toxin in Umweltproben getroffen werden können. Dieser Umstand liegt darin begründet, dass für einen immunchemischen Nachweis das native Toxin benötigt wird und so in recht engen Grenzen bezüglich Temperatur, Druck, pH-Wert, Puffersystem und Zusätzen gearbeitet werden muss.

4.2.3 Nachweis von TeTX durch RP-HPLC

Ein Vorteil der HPLC gegenüber den zuvor behandelten immunchemischen Verfahren ist, dass der Nachweis nicht von den biologischen Eigenschaften der Analyten abhängt. Damit sind Einschränkungen wie beispielsweise Temperatur und pH-Wert, die für die Immunchemie gelten, nur noch von untergeordneter Relevanz. Der Nachweis der Analyten wird im vorliegenden Fall optisch durch UV-Absorption oder Fluoreszenz durchgeführt. Doch auch hier stört HS erheblich, wie im Abschnitt 4.1 dargelegt. Ziel ist daher die Auftrennung des HS-Proteinkomplexes, da nur so ein reproduzierbares Ergebnis mittels HPLC möglich ist. Die bereits in Abschnitt 4.2.2 angesprochenen Untersuchungen zur chromatographischen Trennung mit FPLC in verschiedenen Puffersystemen führten zu keinen verwertbaren Ergebnissen.

Soweit für die Untersuchungen wichtig, werden die wichtigsten Grundlagen der HPLC und speziell Reversed Phase (RP)-HPLC im folgenden angesprochen. Unter den vielen verschiedenen Eigenschaften der Proteine sind vor allem Größe, Form, Ladung, Hydrophobizität und Funktionalität zu berücksichtigen. Auf jede dieser Eigenschaften lässt sich ein chromatographisches Trennverfahren anwenden. Stellvertretend seien hier nur einige genannt, wie

Größenausschluss-, Ionenaustausch-, Ionenpaar-, Reversed Phase- und Affinitätschromatographie. Die theoretischen Grundlagen und zahlreiche praktische Anwendungen sind in der Literatur nachzulesen¹⁰⁶.

Die am weitesten verbreitete Technik zum Proteinnachweis mit HPLC ist die RP-Chromatographie. Das Säulenmaterial besteht aus Silica mit kovalent gebundenen Alkylresten unterschiedlicher Länge. Diese sind verantwortlich für die besonderen Eigenschaften der Säule. Die am häufigsten genutzten sind n-Octadecyl- (C-18), n-Octyl- (C-8) und n-Butyl- (C-4)-Gruppen. Die Retention des Analyten auf RP-Säulen hängt oftmals direkt von seiner Größe und damit steigender Hydrophobizität ab. Daher ergeben kurze Alkylreste (C-4) bessere Ergebnisse mit hydrophoben Proteinen, wohingegen Säulen mit C-18 Ketten eher für Peptide und hydrophile Proteine verwendet werden. Je größer der Alkylrest ist, um so stärker sind die hydrophoben Wechselwirkungen mit den Proteinen, was zu einer deutlichen Abnahme der Bioaktivität führen kann.

Der Trennmechanismus basiert auf der Adsorption des Analyten an der hydrophoben Oberfläche des Säulenmaterials. Erst bei einer ausreichend hohen Konzentration des organischen Lösungsmittels wird er vom Eluenten ersetzt. Danach sind Wechselwirkungen mit der stationären Phase vernachlässigbar¹⁰⁷. Damit ist auch die Leistungsfähigkeit dieser Methode verständlich, da bereits eine geringe Änderung der Konzentration des organischen Lösungsmittels im Eluenten zu einer Trennung der untersuchten Proteine führt. Die am häufigsten eingesetzten mobilen Phasen sind wässrige Acetonitril Lösungen, die 10mM Trifluoressigsäure (TFA) enthalten¹⁰⁸.

4.2.3.1 Ziel

In den durchgeführten Untersuchungen kommt es darauf an, den Huminsäure-Protein-Komplex aufzutrennen und das Protein reproduzierbar, wenn möglich quantitativ, nachzuweisen.

Dazu wird folgende Strategie verfolgt:

- Optimieren der Messwellenlänge
- Auswahl der geeigneten Säule
- Schnelle Aufreinigung zum Schutz der Säule
- Übertragen der Ergebnisse von BSA auf TeTX als Zielprotein
- Übertragen der Modellsysteme auf reale Wasser- und Bodenproben

4.2.3.2 Etablieren einer Analytik mit BSA als Modellprotein

Aus Kostengründen erfolgten erste Versuche, Toxin in einer Huminsäurematrix nachzuweisen, wieder mit BSA als Modellsubstanz. Zu diesem Zweck wurden Standardlösungen un-

terschiedlicher Huminsäurekonzentrationen (s. Anlage Tabelle 27) hergestellt und mit 200µg/mL BSA dotiert. Nach gründlicher Durchmischung mittels Vortexer wurden die Proben aufgearbeitet und im Anschluss mit der HPLC vermessen.

Die im Vorfeld untersuchten Chromatographiemethoden wie SEC und IEX ergaben keine verwertbaren Ergebnisse. Der Einsatz der für die Proteinanalytik gängigen RP-Chromatographie mit einer C4-Säule (Alltech Prosphere 300 C4 5µ) erbrachte aufgrund der von Alltech empfohlenen Eluentenkombination Wasser/Isopropanol (i-PrOH) keine Ergebnisse, da sich durch Erhöhung des i-PrOH Anteils im Eluenten ein so hoher Rückdruck vor der Säule aufbaute, dass das System abschaltete und eine Chromatographie nicht möglich war. Nach dem Wechsel von i-PrOH auf Acetonitril (ACN), verminderte sich der Druck im System auf ~140 bar, so dass erste reproduzierbare Ergebnisse mit BSA als Modellprotein möglich wurden.

Eingesetzte Geräte

Die nachfolgende HPLC-Analytik wird auf einem Merck-Hitachi HPLC-System der Serie LaChrom 7000 etabliert, das mit den in Tabelle 9 aufgeführten Komponenten ausgestattet ist.

Tabelle 9, verwendete HPLC-Anlage¹⁰⁹

Gerät	Bezeichnung
Solvent Degasser	Hitachi Merck L7612
HPLC-Pumpe	Hitachi Merck L7100
Autosampler	Hitachi Merck L7250
Säulenofen	Hitachi Merck L7300
UV-Detektor	Hitachi Merck L7400
Dioden-Array-Detektor (DAD)	Hitachi Merck L7455
Interface zum PC	Hitachi Merck D7000

Für den Nachweis wurden verschiedene Säulen untersucht. Dabei kamen sowohl selbstgepackte, vor allem aber gekaufte C4- und C18-Säulen zum Einsatz. Alle Eluenten wurden 0,2µm filtriert und mit Helium entgast.

Tabelle 10, benutzte Säulen

Bezeichnung	Alkylrest	ID	Partikelgröße	Porengröße	Säulenlänge	Bemerkungen
Prospere Alltech	C-4	4,6 mm	300Å	5µ	125 mm	Säulenmaterial, Lot No: 1107, selbstgepackt
Cromolith Merck	C-18	4,6 mm	300Å	5µ	150 mm	
Jupiter Phenomenex	C-4	2,0 mm	300Å	5µ	150 mm	

Die Auswertung erfolgte mit der Merck-Hitachi Software: HPLC System Manager, Modell D-7000, Version 4.0, 2000¹¹⁰ auf einem IBM kompatiblen PC mit WinNT 4.0, SP6a, als Betriebssystem.

Optimieren der Messparameter

Im allgemeinen wird bei Verwendung eines UV-Detektors eine Messwellenlänge von 220nm benutzt, mit der die UV-Absorption der Proteine gemessen wird. Durch Einsatz eines Dioden-Array-Detektors (L7455, Merck) wird die Meßwellenlänge des UV-Detektors optimiert.

Tabelle 11, Messbedingungen

Messbedingungen	
Säule	Chromolith C18 150mm x 4,6mm
Eluent A	H ₂ O mit 0,1% TFA, pH 2
Eluent B	Acetonitril (ACN) mit 0,1% TFA

Die hier verwendete Chromolith-Säule ist ein monolithischer Stab aus hochporösem Kieselgel und zeichnet sich dadurch aus, dass hohe Flussraten von bis zu 9mL/min genutzt werden können, um die Analysezeit bei gleicher Auflösung deutlich zu reduzieren¹¹¹. Voraussetzung ist eine Pumpe, die derart hohe Flüsse ohne Schwankungen halten kann. Mit der eingesetzten HPLC-Pumpe (L7100, Merck) sind bereits bei Flussraten von 4mL/min Pulsationsschwankungen festzustellen. Ein weiterer Nachteil ist die Ansprechzeit der Niederdruckmischkammer. Die Ventile der Mischkammer benötigen 6sec um das neue Mischungsverhältnis der Eluenten einzustellen. Eine Flussrate von 2mL/min hat sich als zweckmäßiger Kompromiss erwiesen, da innerhalb der Analysezeit von 10 min eine ausreichende Trennung der Analyten gegeben ist.

Tabelle 12, HPLC-Gradient für Chromolith-Säule

%B	t (min)	Flussrate (mL/min)
0	0	2,0
0	2	2,0
100	6	2,0
100	8	2,0
0	8,1	2,0
0	10	2,0

Das Verhältnis von Totzeit zu Netto-Retentionszeit ist als der Retentionsfaktor k definiert und sollte zwischen 1 und 10 liegen¹¹². Mit einem Retentionsfaktor von $k = 5,80$ (s. Gleichung 1) wird BSA unter Berücksichtigung einer ausreichend kurzen Analysezeit ausreichend aufgetrennt.

Berechnung des Retentionsfaktors¹¹³:

$$k = (t_R - t_0) / t_0 = (5,17 \text{ min} - 0,76 \text{ min}) / 0,76 \text{ min} = 5,80 \quad (1)$$

Legende:

t_0 = Totzeit; die Zeit, die die mobile Phase benötigt, um durch die Trennsäule zu wandern

t_R = Retentionszeit; die Zeit, die vom Einspritzen eines Stoffes bis zur Registrierung seines Peakmaximums verstreicht

Wie aus dem Spektrum in Abb. 24 zu sehen, führt eine Veränderung der Wellenlänge von 220 nm auf 206 nm zu einer Erhöhung des Messsignals um den Faktor 2,35.

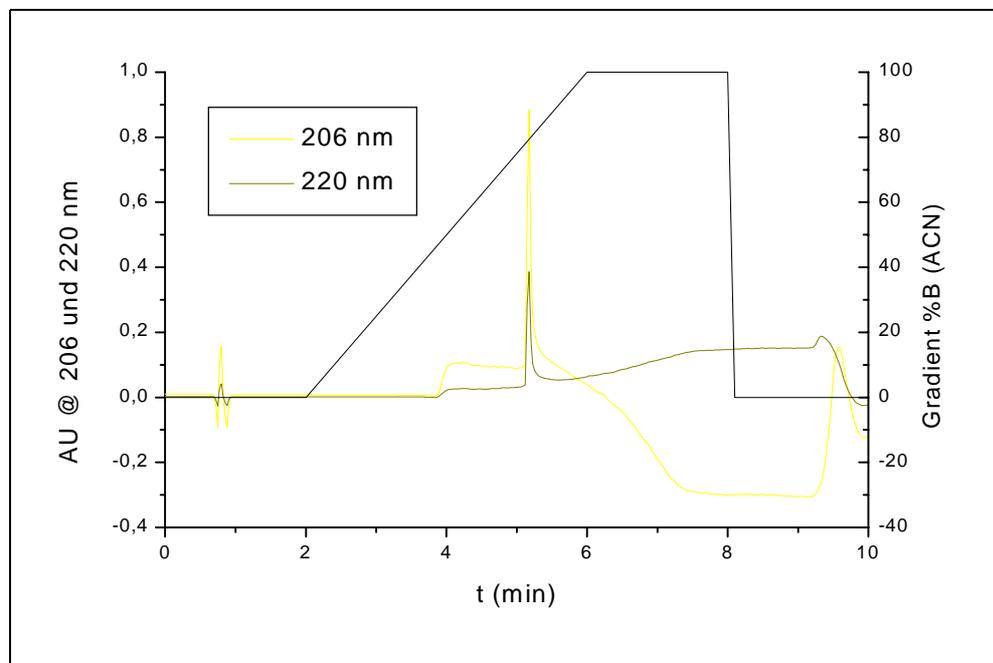


Abb. 24, BSA 200µg/mL in H₂O, Injektionsvolumen: 10µL

Die UV-Absorption nimmt bei verschiedenem HS-Gehalt des Analyten von geringem zu hohem HS-Gehalt zwar wie erwartet ab, die verhältnismäßige Intensitätssteigerung von 220 auf 206 nm ist davon aber unabhängig, wie Abb. 25 zeigt. Der Abweichung beträgt 2,12%.

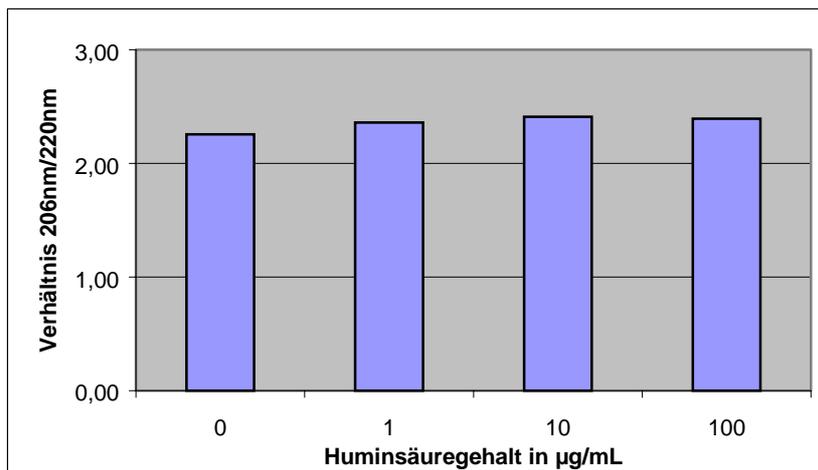


Abb. 25, Verstärkung des UV-Signals bei Variation der Wellenlänge

Aufreinigung der untersuchten Wässer und Böden

Nach Etablieren der unterschiedlichen Analysemethoden wird mit der Aufreinigung von Bodenproben begonnen. Dazu wird ein Modellboden definiert, um mit einer überschaubaren Anzahl variabler Parameter reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten. Als Modellboden wird Quarzsand^{xxv} mit Huminsäure^{xxvi} dotiert. Der mit Huminsäure dotierte Quarzsand wird mit einer definierten Menge BSA gespiked (50µL eines BSA-Standards (4mg/mL) und 950µL Lösungsmittel, Wasser oder Puffer) und danach gründlich gevortext, um eine möglichst homogene Durchmischung zu erreichen. Zu Beginn der danach folgenden Aufarbeitung wird das Gemisch für 10min bei RT in ein Ultraschallbad gegeben und im Anschluss 10 min bei 13,000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird mit einer steril verpackten Einwegspritze aufgenommen und durch einen Spritzenfilter mit Porengröße 0,2µm gegeben, um mögliche kolloidale Partikel zurückzuhalten. Das Filtrat wird in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß bis zur Analyse bei +4°C dunkel gelagert.

Tabelle 13, Aufarbeitungsschritte vor der Analyse

Aufreinigungsschritt	Gerät und Hersteller	wichtige Parameter
Ultraschallbad	Sonorex Super Rk 510H Bandelin	t=10min, T=RT
Zentrifugieren	Centrifuge 5415C, Eppendorf	t=10min, T=RT, v=13krpm
Überstand aufnehmen	2,5 mL Einwegspritze	
Filtrieren	Spritzenfilter 0,2 µm	
Filtrat bis zur Analyse lagern	Eppendorf-Reaktionsgefäßen	+4°C, dunkel

^{xxv} Seesand, p.a., mit Säure gewaschen und gegläht (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

^{xxvi} Humussäure, Natriumsalz, technisch Sigma-Aldrich Feinchemikalien, Deisenhofen

Vergleich verschiedener Extraktionsmittel und Abhängigkeit vom pH-Wert

Es werden verschiedene Puffersysteme im pH-Bereich von 4,0 bis 10,5 in bezug auf ihre Eignung als Extraktionspuffer untersucht. Als 100%-Wert wird BSA in Wasser gelöst und eine Verdünnungsreihe aufgenommen. Aus dem Vergleich der Messwerte mit den Standards ergibt sich die Wiederfindungsrate (in %) der einzelnen Ansätze.

Der pH-Bereich von 4,0 bis 5,5 wird mit Acetatpuffer abgedeckt. Hier sind keine Peaks detektierbar. Verwertbare Ergebnisse gibt es ausschließlich in einem pH-Bereich von pH 7,0 bis 9,0, die im folgenden diskutiert werden. Auch der pH-Bereich von 9,5 bis 10,5 führt zu keinen verwertbaren Peaks. Unabhängig vom Puffer führt die Erhöhung des pH-Werts im Puffersystem (beispielsweise Phosphatpuffer Bereich pH 6 bis 8) zu einer Farbintensivierung des Extraktes, also einer stärkeren Herauslösung der dotierten Huminsäure.

Tabelle 14, Extraktionspuffer

Puffersystem	pH-Bereich
Acetat	4,0 – 5,5
Phosphat	6,0 – 8,0
Trizma-Base/HCl	7,2 – 8,8
Glycin/NaOH	8,5 – 10,5

Die Probenvorbereitung wird gemäß Anhang 7.6.2 durchgeführt. Im Anschluss wird die mit BSA-dotierte huminsäurehaltige Lösung wie in Tabelle 13 aufgearbeitet. Die Messbedingungen werden nicht geändert (s. Tabelle 11); als Detektor wird ein UV-Detektor (L7400, Merck) eingesetzt. Jede Probe wird dreimal gemessen und aus dem Mittelwert die WFR bestimmt.

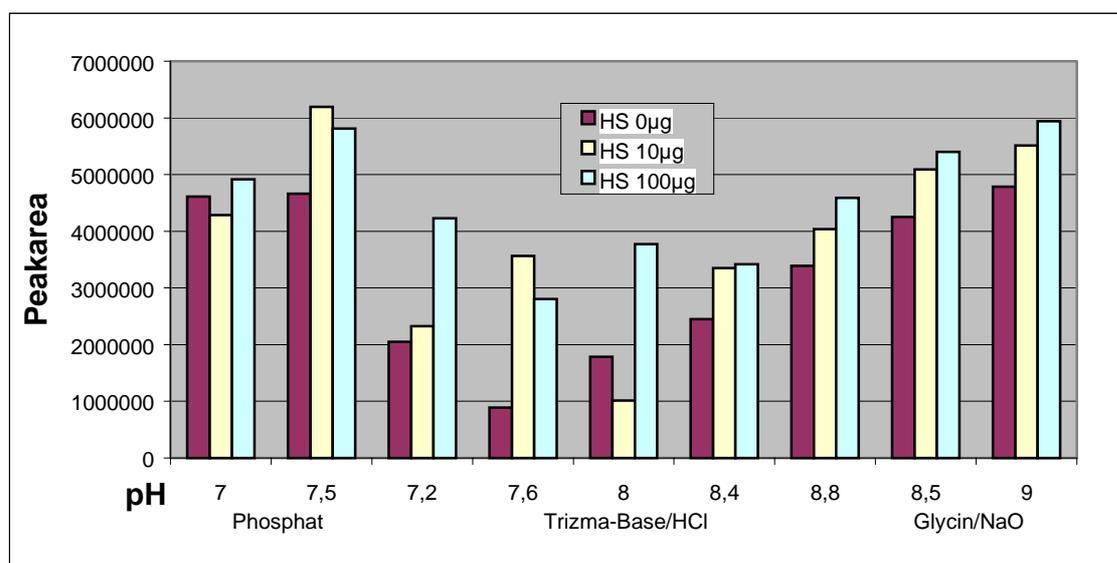


Abb. 26, BSA-Gehalt in Abhängigkeit von Puffer und pH-Wert

Es zeigt sich, dass das Puffersystem Trizma-Base/HCl (pH 7,2 – 8,8) für die Aufarbeitung huminsäurehaltiger Proben ungeeignet ist. Dafür lässt sich der Trend bestätigen, dass in einem betrachteten Puffersystem mit steigendem pH-Wert auch die Peakintensität des gesuchten Proteins steigt. Generell ist festzuhalten, dass mit steigendem pH-Wert eines Puffers der Anteil der extrahierten Huminsäure ebenfalls ansteigt und so zu falschen Ergebnissen führt. Die Puffersysteme Phosphat und Glycin/NaOH zeigen weitaus höhere Messwerte, wobei eine Reproduzierbarkeit bei unterschiedlichen Huminsäurekonzentrationen lediglich in Phosphatpuffer, pH 7,0, mit einem Fehler von 5% gegeben ist. Das deutet daraufhin, dass die Einhaltung eines sehr engen pH-Optimums bei einer Aufarbeitung mit Realboden ein kritischer Faktor sein wird, zumal Struktur und Inhaltsstoffe in Boden noch weitaus größeren Einfluss haben werden, als mit Modellboden simulierbar. Eine vollständige Auftrennung des Huminsäure-Protein-Komplexes ist mit der etablierten Aufarbeitung und nachfolgender HPLC-Analytik nicht zufriedenstellend. Vor allem hier nicht dargestellte Ergebnisse mit Huminsäurekonzentrationen von 100 µg/mL, wie sie in stark Huminsäure belastetem Wasser und in Boden vorkommen, führen zu nicht auswertbaren Ergebnissen. Für das untersuchte Modellsystem Quarzsand mit Aldrich-Huminsäure kann festgehalten werden, dass mit Phosphatpuffer pH 7,0 eine WFR von 69% im Vergleich zum Standard erreicht wird und der Fehler zwischen unbelastetem und huminsäurehaltigem (<10 ng/mL) Extrakt unter 5% liegt.

Um den Komplex unabhängig von der Bodenbeschaffenheit aufzubrechen, wird der denaturierende Einfluss der Detergenzien Na-Dodecylsulfat (SDS) und Triton X-100 untersucht (Strukturformeln: s. Anhang 7.6.3). SDS ist ein sehr starkes Detergenz, das fast alle nicht kovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört¹¹⁴. Als amphiphiles Molekül bildet es sogenannte Micellen, in denen hydrophobe und hydrophile Gruppen optimal miteinander wechselwirken können. Damit eine Micelle gebildet werden kann, muss eine kritische Micellkonzentration überschritten werden, die für SDS bei ≈ 1 mM (288 mg/mL) liegt¹¹⁵.

Die Messbedingungen werden für diese Analytik nicht verändert (s. Tabelle 11, UV-Detektor). Die Probenvorbereitung wird dahingehend geändert, dass zur Modellbodenprobe je Probe 950 µL der Extraktionsmittel aus Tabelle 15 zugegeben werden. Die BSA-Konzentration beträgt weiterhin 200 µg/mL. Alle Proben werden gevortext und nach der etablierten Methode aufgereinigt. Nach der Aufarbeitung werden von jeder Probe wiederum drei Messungen bei unveränderten Messbedingungen durchgeführt.

Tabelle 15, Extraktionsmittel

Extraktionsmittel
Wasser
Phosphatpuffer, pH 7,0
1,0 % SDS in Wasser gelöst
0,5 % SDS in Wasser gelöst
0,25 % SDS in Wasser gelöst
0,2 % Triton X-100 in K-Phosphatpuffer, pH 7,4, gelöst

Aus dem Balkendiagramm (Abb.: 27) lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

Triton-Phosphat Puffer erschwert den Nachweis von Proteinen. Die Extraktion mit Wasser zeigt die bereits mehrfach angesprochenen Unzulänglichkeiten selbst bei einer Huminsäurekonzentration von 1 µg/mL. Phosphatpuffer, pH 7,0, eignet sich für den Nachweis bis 10 µg/mL, führt aber zu keinen Ergebnissen bei zehnfach höherer Huminsäurekonzentrationen wie sie üblicherweise im Boden vorkommen.

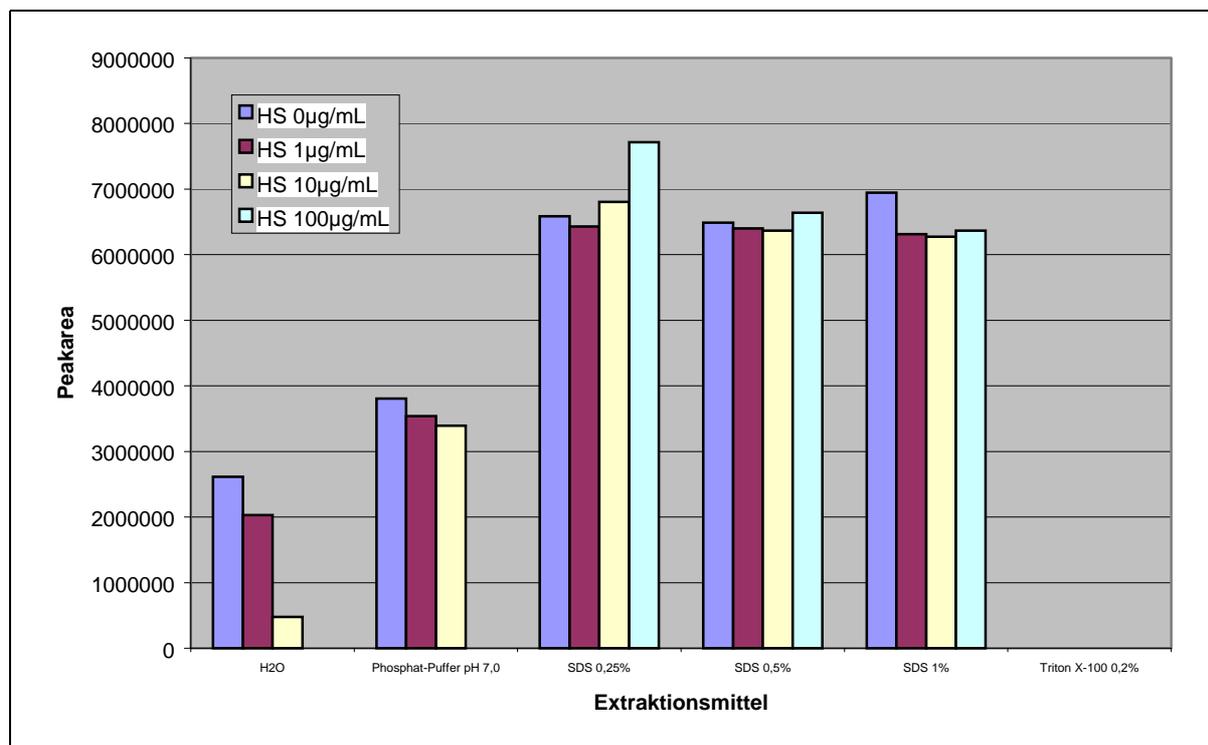


Abb. 27, Nachweis von BSA in huminsäurehaltigen Proben mit unterschiedlichen Extraktionsmitteln

Im Gegensatz dazu führt der Einsatz von SDS zu sehr guten Ergebnissen. Die mittlere Abweichung der Extraktion mit 0,5% SDS beträgt unabhängig vom Huminsäuregehalt der untersuchten Probe weniger als 4 Prozent. Damit ist ein Mittel gefunden, das durch Denaturieren des gesuchten Proteins ein Aufbrechen des Huminsäure-Protein-Komplexes ermöglicht und so die Voraussetzung für eine Trennung mittels RP-HPLC darstellt. SDS ist ein Detergenz, das sehr fest an Proteine bindet und sie in eine stabähnliche Form zwingt. Die SDS-Behandlung zerstört die nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten des Pro-

teins (Quartärstruktur)¹¹⁶ und damit die gleichen Bindungen, die zwischen Protein und Huminsäure auftreten.

4.2.3.3 Übertragen der Ergebnisse von BSA auf TeTX als Zielprotein

Die zuvor eingesetzte Chromolith-Säule hat sich für die weitere Analytik mit TeTX als nicht geeignet erwiesen. Aus diesem Grund wurde auf eine C4-Säule von Phenomenex gewechselt (s. Tabelle 10). Retentionszeit und Gradient wurden ebenso wie die Flussrate der neuen Säule angepasst. Die Probenvorbereitung entspricht der von BSA. Als Detektor wurde ein UV-Detektor eingesetzt.

Tabelle 16, Gradient zur Ermittlung der Retentionszeit von TeTX

%B (ACN)	t (min)	Flussrate (mL/min)
20	0	0,5
20	2	0,5
100	20	0,5
100	25	0,5
20	25,1	0,5
20	30	0,5

Um die Ergebnisse auf die neue Säule und auf TeTX übertragen zu können, werden zuerst die Retentionszeiten von BSA und TeTX ermittelt. Aufgrund der unterschiedlichen Größe und Ladungsverteilung wird TeTX deutlich später eluiert als BSA. TeTX wird nach 12,9 min eluiert, BSA bereits nach 9,5 min (s. Abb.: 28). Die Retentionsfaktoren k sind für BSA 5,87 und für TeTX 8,24. Damit kann mit diesem Gradienten gearbeitet werden.

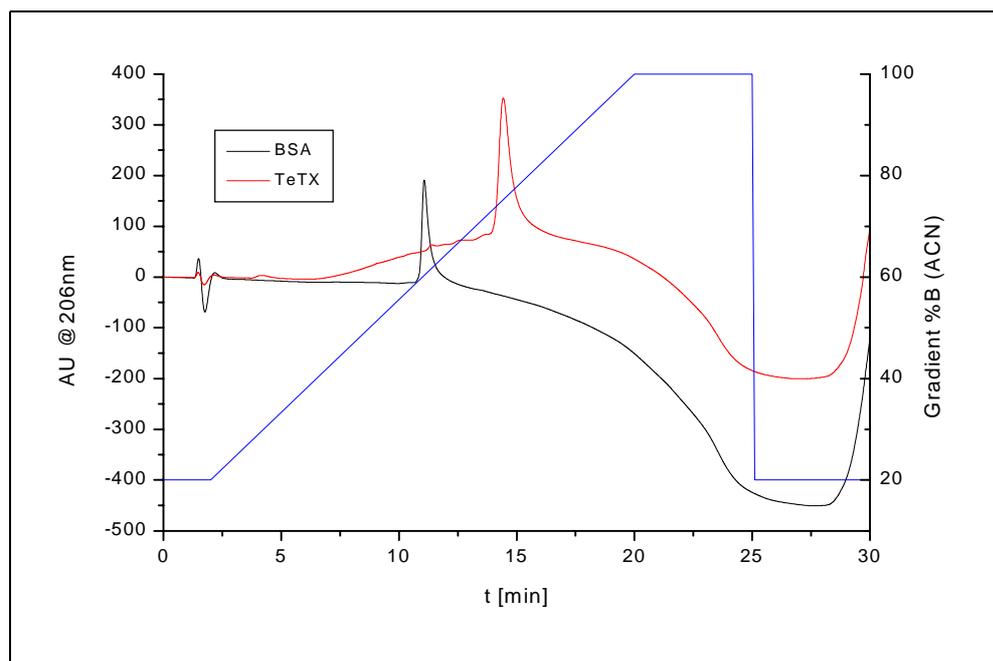


Abb. 28, Vergleich der Retentionszeiten von BSA und TeTX

Im Anschluss wird die für BSA etablierte Aufarbeitung mit SDS auf TeTX übertragen. Parallel wird auch mit Phosphatpuffer, pH 7,0, extrahiert, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse beider Säulen zu ermöglichen.

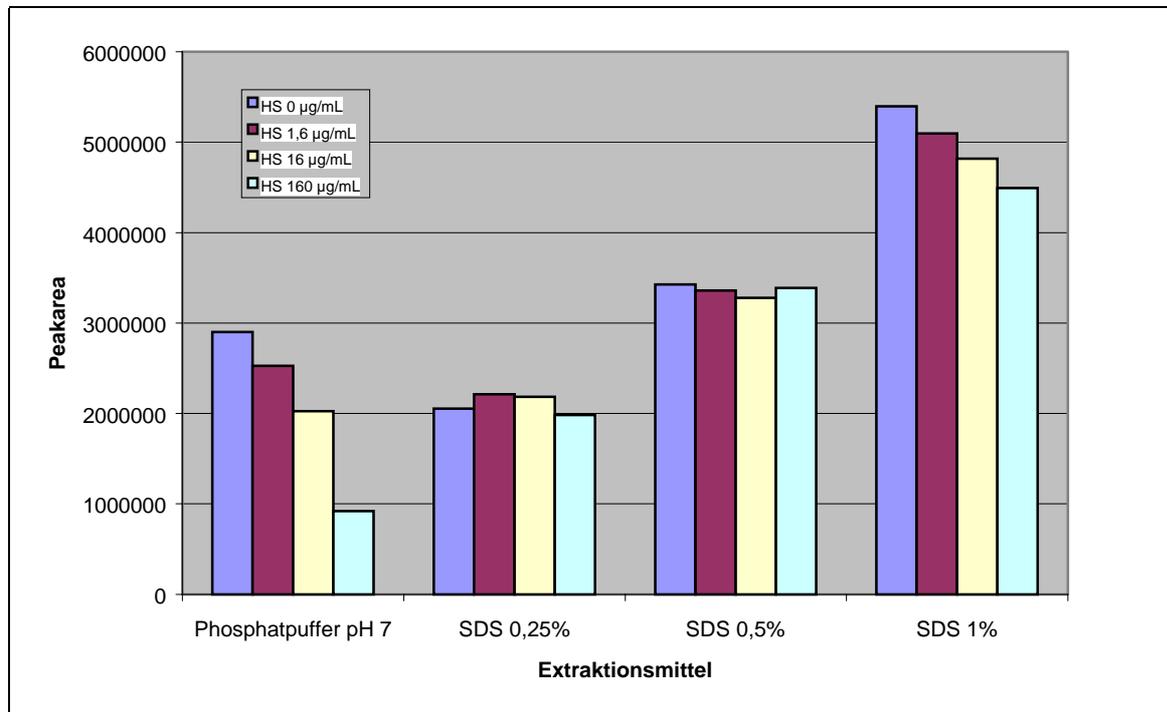


Abb. 29, Extraktion von TeTX 5 µg aus Modellboden mit unterschiedlichem Huminsäuregehalt

Die mit der Chromolith-Säule für BSA ermittelten Ergebnisse lassen sich auf TeTX übertragen. Mit Phosphatpuffer ergibt sich für Huminsäurekonzentrationen bis 1,6 µg/mL zwar ein akzeptables Signal zum Nachweis des Toxins, darüber hinaus ist allerdings allenfalls eine qualitative Aussage möglich. Die Extraktionen mit SDS zeigen eine deutliche Übereinstimmung der Messwerte unabhängig vom Huminsäuregehalt der Bodenprobe. Allerdings zeigen sich deutlichere Unterschiede der gemessenen Intensitäten als bei BSA. Der Grund hierfür liegt in der unterschiedlichen Beschaffenheit der beiden Säulen und in der Größe des Toxins, das mit 150 kDa mehr als doppelt so groß ist wie BSA mit 69 kDa. Die geringste Fehlerstreuung (<5%) bei gleichzeitig gutem Signal wird wiederum mit 0,5% SDS als Extraktionsmittel erreicht. Für die nachfolgenden Untersuchungen an Realproben wird deshalb mit 0,5%iger SDS-Lösung extrahiert.

4.2.3.4 Nachweis von TeTX in Realproben

Um die Übertragbarkeit der mit Modellboden herausgearbeiteten Ergebnisse auf Realproben nachzuweisen, werden drei wässrige und eine Bodenprobe mit TeTX dotiert und nach der etablierten Methode aufgearbeitet.

Nachweis von TeTX in Wasser

Tabelle 17, Realproben, Wasser

Nummer	Probenort	Probenahme	Parameter	Lagerung
Brauchwasser (1)	Wasserleitung des Instituts	Brauchwasser	T.: 11°C	dunkel bei +4°C im Kühlschrank
Pfützenwasser (2)	Regenpfütze auf einem Schotterweg Von der Oberfläche der ~5cm tiefen Pfütze (Ø: ~ 50 cm)	morgens (07.30h MESZ), zwei Stunden nach Regenende	T.: 17°C Die Pfütze ist völlig klar aufklarend, leichter Wind	dunkel, bei +4°C im Kühlschrank
Teichwasser (3)	Oberflächenwasser von einem kleinen Teich auf dem Campusgelände der Universität	morgens (08.30h MESZ in ~5cm Tiefe, um eine möglichst klare Probe zu gewinnen	T.: 21°C Das Teichwasser ist braun gefärbt Auf der Oberfläche wächst „Entengrütze“ leicht bewölkt windstill	dunkel, bei +4°C im Kühlschrank

Für die Aufarbeitung werden die Proben (s. Tabelle 17) auf RT erwärmt und mit Toxin versetzt. Die Brauchwasserprobe wird nach Filterung durch einen 0,2µm Spritzenfilter direkt auf die HPLC gegeben, um einen Standardwert zu erhalten. Alle drei Proben werden mit den Extraktionsmitteln Wasser, Phosphatpuffer, und SDS-Lösung versetzt. Die Aufarbeitung erfolgt nach der etablierten Methode. Im Anschluss werden die Proben entsprechend Tabelle 16 mit der HPLC analysiert.

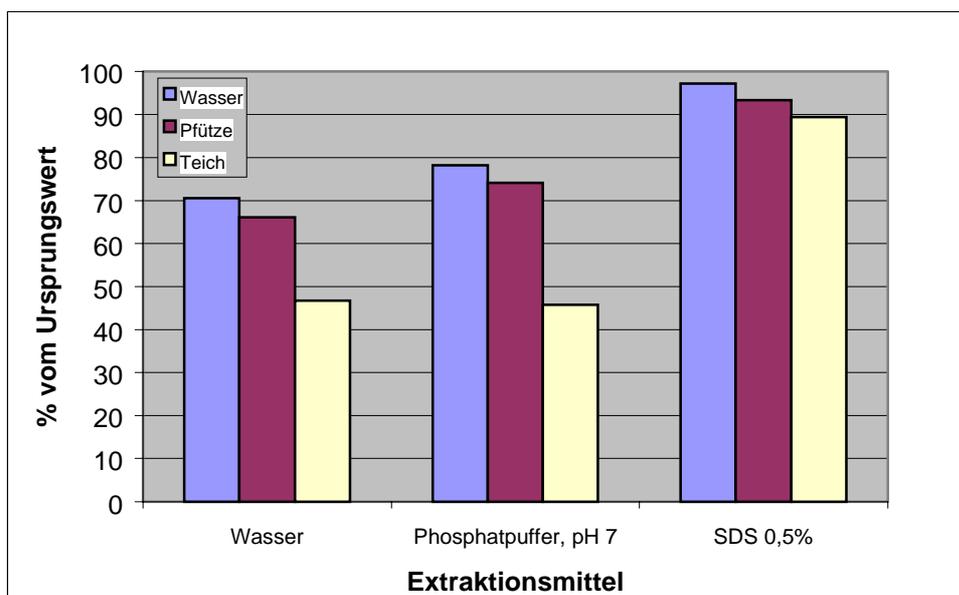


Abb. 30, WFR von 2,5µg TeTX aus Realwasserproben

Die Messergebnisse in Abb. 30 sind als Verhältniswert zur Standard-Brauchwasserprobe dargestellt. Die Werte für Leitungswasser (1) und Pfützenwasser (2) sind innerhalb der Fehlertoleranz mit allen drei Extraktionsmitteln durchaus vergleichbar und damit reproduzierbar. Die Fehler betragen 7% für Wasser, 5% für Phosphatpuffer und 4% für SDS als Extraktionsmittel. In der Teichwasserprobe (3) sind nicht näher untersuchte Störparameter vorhanden. Aufgrund der Herkunft der Probe, dem Eintrag von Blättern, dem Oberflächenbewuchs und des hohen Schlickgehaltes auf dem Teichboden wird es sich um Huminstoffe handeln, die durch Verrottung entstanden sind. Bei dieser Probe werden aufgrund des störenden HS-Einflusses mit Wasser und Puffer als Extraktionsmittel weniger als 50% des Referenzwertes wiedergefunden. Setzt man die Ergebnisse der Extraktion von unbelastetem Brauchwasser mit den Messwerten der direkt injizierten Probe ins Verhältnis, ist durch die Aufarbeitung bereits ein Verlust von 29% zum Ursprungswert festzustellen. Wird dieser Wert mit der Teichwasserprobe verglichen, zeigt sich, dass mit Wasser als Extraktionsmittel 34% und mit Phosphatpuffer 37% weniger Toxin nachgewiesen wird, was zu einer Wiederfindungsrate von unter 50% Toxin führt. Dieser Wert ist auf die Huminstoffe des Teichwassers zurückzuführen. Im Gegensatz dazu zeigt der Einsatz von SDS als Extraktionsmittel, dass nicht nur eine 93%ige WFR zum Standardwert möglich ist, sondern dass diese Werte auch nahezu unabhängig von den Störparametern der Probe 3 erreicht werden. Die Abweichung vom Mittelwert aller drei Proben beträgt 2,9%. Die mittlere Wiederfindungsrate beträgt 93%. Gerade die nahezu vollständige Wiederfindungsrate des Toxins gegenüber dem Standardwert bestätigt die These, dass sich das Toxin innerhalb der SDS-Micelle befindet und so Wechselwirkungen mit der Umgebung nahezu vollständig unterdrückt werden.

Nachweis von TeTX im Boden

Neben den Proben 2 und 3 wird im folgenden Versuch eine Realbodenprobe mit TeTX dotiert. Bei der Bodenprobe handelt es sich um Lösboden, der gesiebt und bei 40°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurde. Die Bodenparameter finden sich im Anhang Tabelle 28. Probenvorbereitung, -aufarbeitung und HPLC-Analytik entsprechen denen der wässrigen Proben. Eine Standard mit 0,5µg TeTX wird nach Filterung durch einen 0,2µm Spritzenfilter direkt auf die HPLC gegeben, um als Referenzwert zu dienen.

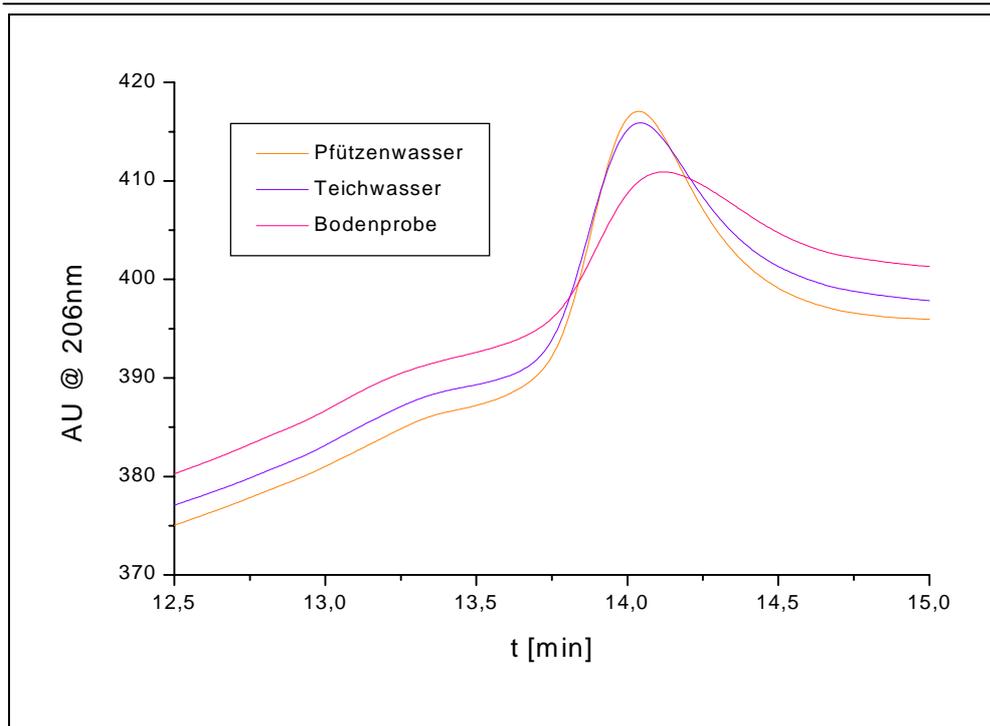


Abb. 31, 0,5 µg TeTX in verschiedenen Realproben

Mit einer Konzentration von 0,5µg TeTX ist die Nachweisgrenze der hier benutzten HPLC-Methode erreicht. Eine Optimierung der Methode könnte die Laufzeit noch weiter verkürzen und die Basisbreite des Peaks noch weiter verringern, was zu einer geringeren NWG führen würde. Setzt man die Messwerte der Bodenprobe zum Standard ins Verhältnis, ergibt sich für Toxin in Boden mit dieser Methode eine WFR von 72% (s. Abb.: 31).

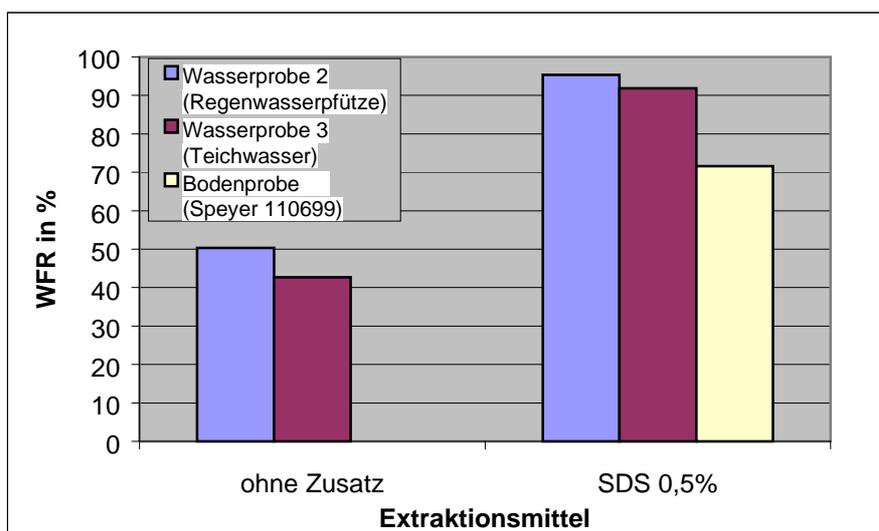


Abb. 32, WFR von 0,5 µg TeTX in verschiedenen Realproben

4.2.3.5 Zusammenfassung der HPLC-Ergebnisse

Ziel der hier etablierten Analytik war es, den Huminsäure-Protein (Toxin) Komplex aufzubrechen und das Toxin zweifelsfrei, möglichst quantitativ nachzuweisen. Die Methode wurde so

optimiert, dass durch Zugabe einer 0,5%igen SDS-Lösung das Toxin denaturiert und der stabile Komplex aufgelöst wird. Damit sind Trennung und Nachweis möglich, wobei in wässrigen Proben ein quantitativer Nachweis erreicht wurde. In Bodenproben finden neben dem bereits beschriebenen Huminsäureeffekt weitere Störparameter ihren Niederschlag, die durch ein Modell nur schwer zu simulieren sind. Vorrangig dürfte sowohl die Porenstruktur als auch weitere Bodeninhaltsstoffe einen beträchtlichen Einfluss auf das Ergebnis haben. Eine Konzentration von 500ng Toxin im Boden kann sicher nachgewiesen werden, ist durch Optimierung der HPLC-Methode und Einsatz empfindlicherer Detektoren jedoch noch deutlich zu erniedrigen.

5 Schlussbetrachtung

Clostridiale Neurotoxine sind proteolytische Toxine mit einer Molekülmasse um 150 kDa, deren Nachweis als Reinsubstanz zur Standardanalytik gehört. Bisherige Veröffentlichungen, die sich mit der Thematik des Nachweises von Proteinen aus Bodenproben beschäftigen, scheitern an der wirksamen Trennung des Analyten aus der Bodenmatrix und im speziellen der Huminsäure.

Für alle im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Analyseverfahren bestätigte sich, dass der quantitative Nachweis bei stark Huminsäure belasteten Proben inhibiert wird. Mittels MALDI-MS konnte gezeigt werden, dass Huminsäure mit Proteinen einen sehr stabilen Anlagerungskomplex bildet, der der in der Literatur bekannten Pseudomicellenbildung durch HS zugesprochen werden kann.

Dass Pseudomicellenbildung auch für den maskierenden Einfluss der DNA wahrscheinlich ist, wird in einschlägigen Veröffentlichungen postuliert. Durch Zugabe von 500µg/mL BSA zum Template eines PCR-Ansatzes konnte dieser Effekt zurückgedrängt werden, was darauf schließen lässt, dass es unterschiedlich stabile Komplexe zwischen Huminsäure und Analyten gibt. Des weiteren komplexiert HS die Mg^{2+} -Ionen, die für die Koordinierung der dNTPs notwendig sind und inhibiert so die PCR ebenfalls. Durch erhöhte $MgCl_2$ -Zugabe (3,5mM) zum PCR-Ansatz liegt eine ausreichende Anzahl freier Ionen vor, um auch bei hoher HS-Konzentration eine PCR zu ermöglichen. Mit diesen beiden Optimierungsschritten kann die PCR ein wertvolles Hilfsmittel bei der Toxinbestimmung darstellen, allerdings nur begleitend, da nach einem Einsatz von Toxinwaffen keine Gensequenz gefunden werden kann.

Mit den hier untersuchten immunochemischen Methoden kann der Einfluss der Huminsäure bis zu einer Konzentration von 10µg/mL Huminsäure zurückgedrängt und dabei quantitative Ergebnisse erzielt werden, deren Fehlertoleranz bei $\leq 10\%$ liegt. Damit hat der in der Literatur etablierte Nachweis von Toxinen mittels ELISA als immunochemisches Verfahren für das verwendeten Antikörper/Toxin-Paar nur bedingt Erfolg erbracht. Das hat vermutlich mehrere Gründe. Zum einen bindet HS mit seinen polaren Resten an der Oberfläche der PS-Mikrotiterplatten, zum anderen werden vermutlich die aktiven Epitope des Toxins durch die bereits angesprochene Pseudomicellenbildung sterisch gehindert, so dass keine AB/AG-Wechselwirkung stattfinden kann. Damit ist auch die Konzentration des eingesetzten ABs oberhalb des festgestellten Optimums unerheblich für den Erfolg des ELISAs. Außerdem kommt es abhängig von pH-Wert und Puffersystem zu unspezifischen Wechselwirkungen zwischen AB und HS, was zu hohen Hintergrundsignalen führt. Dieses Problem konnte durch Optimierung

des Puffersysteme weitgehend unterdrückt werden. Die Ergebnisse der HPMADC decken sich mit den Ergebnissen des ELISA in bezug auf die maximale HS-Konzentration, allerdings liegt die Nachweisgrenze um fast drei Zehnerpotenzen über der des ELISAs.

Aufgrund dieser Resultate war eine Auftrennung des HS-Toxin-Komplexes unabdingbar für einen quantitativen Nachweis. In der sich anschließenden HPLC-Analytik konnte Toxin aus huminsäurehaltigen Proben ebenfalls nur bis zu einer HS-Konzentration von 10µg/mL nachgewiesen werden. Erst die Zugabe von SDS zeigte, dass durch Denaturierung des Toxins und darauf folgende SDS-Micellenbildung eine Auftrennung des HS-Toxin-Komplexes möglich wurde. Die geringste Fehlerstreuung unabhängig von der HS-Konzentration wurde mit einem SDS-Gehalt von 0,5% erreicht. Damit ist eine Applikation entwickelt worden, mit der TeTX reproduzierbar und quantitativ in Wasser und zu über 70% in Bodenproben, nachgewiesen werden kann.

6 Ausblick

Für die hier etablierte Aufreinigung und HPLC-Analytik werden 60min benötigt, bis erste Ergebnisse vorliegen. Durch Optimieren der HPLC-Methode lässt sich diese Zeit noch deutlich verkürzen. Es böte sich beispielsweise der Einsatz einer monolithischen C4-Säule an, außerdem der Einsatz einer Hochdruckmischkammer und von Pumpen, die Flüsse bis 10mL/min ohne Eigenpulsation ermöglichen. Die HPLC-Methode könnte noch weiter optimiert werden, indem die Steigung des Gradienten noch angepasst wird. Durch diese Maßnahmen lägen erste Ergebnisse bereits nach ca. 40min vor. Eine Sensitivitätssteigerung kann durch die Nutzung eines empfindlicheren Fluoreszenz-Detektors erreicht werden.

Geissler gibt für TeTX eine LD₅₀ von unter 2,5 ng/kg^{xxvii} an. Das bedeutet für einen erwachsenen Menschen eine Dosis von unter 188ng TeTX. Mit dem etablierten ELISA wird dieser Wert um den Faktor 22 unterschritten, mit der HPLC-Methode noch um das 2,5fache überschritten. Wünschenswert ist ein Nachweis, der mindestens um den Faktor 10 unterhalb der LD₅₀ liegt. Dieses Ziel liegt für die HPLC-Methode mit den angesprochenen Optimierungsschritten durchaus im realistischen Bereich, auf jeden Fall eher als eine Verbesserung des ELISAs, da die NWG des ELISA nicht durch die Empfindlichkeit des Antikörper/Antigen-Paares, sondern den HS-Gehalt der Probe begrenzt wird. Nur mit der HPLC-Methode ist es gelungen, Toxin auch in stark HS-belasteten Proben und in Realboden reproduzierbar nachzuweisen. Damit ist sie eine realistische Ergänzung für die gängigen immunchemischen und genetischen Verfahren zum Nachweis von Toxinen.

Neben der apparativen Optimierung sollte die Anwendungsbreite dieser Applikation noch weiter untersucht werden. Dies sind zum einen verschiedenste Böden als Matrix, unterschiedliche Toxine und die Unterscheidbarkeit ähnlicher Verbindungen wie z.B. der verschiedenen Serotypen des BotTX.

^{xxvii} bezogen auf Mensch

7 Anhang

7.1 Theorieteil

7.1.1 Pestepidemie im 14. Jahrhundert

In der Zeit von 1348-1350 starben in Europa ca. 25 Mio. Menschen an Pest (*Yersinia pestis*). Es wird vermutet, dass die Epidemie zwei Jahre vorher durch einen „biologischen“ Angriff der tatarischen Belagerer gegen die Hafenstadt Caffa auf der Krim ausgelöst wurde, indem diese Pferdekadaver in die belagerte Stadt katapultierten¹¹⁷

7.1.2 Definition chemischer Kampfstoffe gemäß CWÜ

- a. Giftige Chemikalien und ihre Ausgangsprodukte außer dort, wo ihr Einsatz nicht durch die Konvention verboten ist, aber nur so lange wie Art und Menge dem Einsatz der Anwendung entsprechen.
- b. Munition und Vorrichtungen, die zu dem Zweck hergestellt wurden, um durch die giftigen Eigenschaften dieser Chemikalien Tod oder andere Schäden herbeizuführen.
- c. Jeder Ausrüstungsgegenstand, der hergestellt wurde, um direkt in Verbindung mit unter b. genannter Munition oder Vorrichtung eingesetzt zu werden

Eine giftige Chemikalie ist jede Verbindung, unabhängig vom Herstellungsverfahren, die durch ihre chemische Wirkung auf alle Lebensprozesse Tod, vorübergehende oder dauerhafte Schädigung bei Mensch und Tier bewirkt. Ziel dieser sehr allgemeinen Beschreibung ist, dass das CWÜ, das von fast allen Staaten der Erde ratifiziert wurde, nicht umgangen werden kann¹¹⁸.

7.1.3 Letale Dosen ausgewählter CW und TW

Tabelle 18, Vergleich der letalen Dosis ausgewählter CW und TW¹¹⁹

<i>Gifte</i>	<i>LD₅₀^{xxviii} (ng/kg)</i>	<i>Toxine</i>
	<2,5	TeTX
	10	BotTX
	<100	Diphtherietoxin
	100	Ricin
	200	Saxitoxin
	8.000	Tetrodotoxin
VX	30.000	
Soman	100.000 – 700.000	
Sarin	200.000 – 1.500.000	
	300.000	Aflatoxin B ₁
Tabun	400.000 – 3.000.000	
	1.210.000	T ₂ -Toxin

7.1.4 Biologische Waffen des IRAK nach eigener Erklärung¹²⁰

1. BW und TW:

Anthraxsporen	8 400 Liter
Botulinustoxin	19 000 Liter
Gasgangrene-Toxin	3 400 Liter
Aflatoxin	2 200 Liter
Ricin	10 Liter

2. BW-Munition:

Scud Raketen-Gefechtsköpfe (al-Husseini) 25

Anthrax	5
Botulinustoxin	16
Aflatoxin	4

Bomben (für Flugzeuge) 157

Anthrax	50
Botulinum toxin	100
Aflatoxin	7

Sprühtanks (für Hubschrauber) 4

3. Weitere Verbringmöglichkeiten für BW, die der Irak getestet hat:

155-mm Artillerie-Granaten
 Artillerieraketen
 MiG-21 Drohne (unbemanntes Flugzeug)
 Aerosol Generatoren

^{xxviii} LD₅₀: letale Dosis, bei der 50% der betroffenen Personen sterben

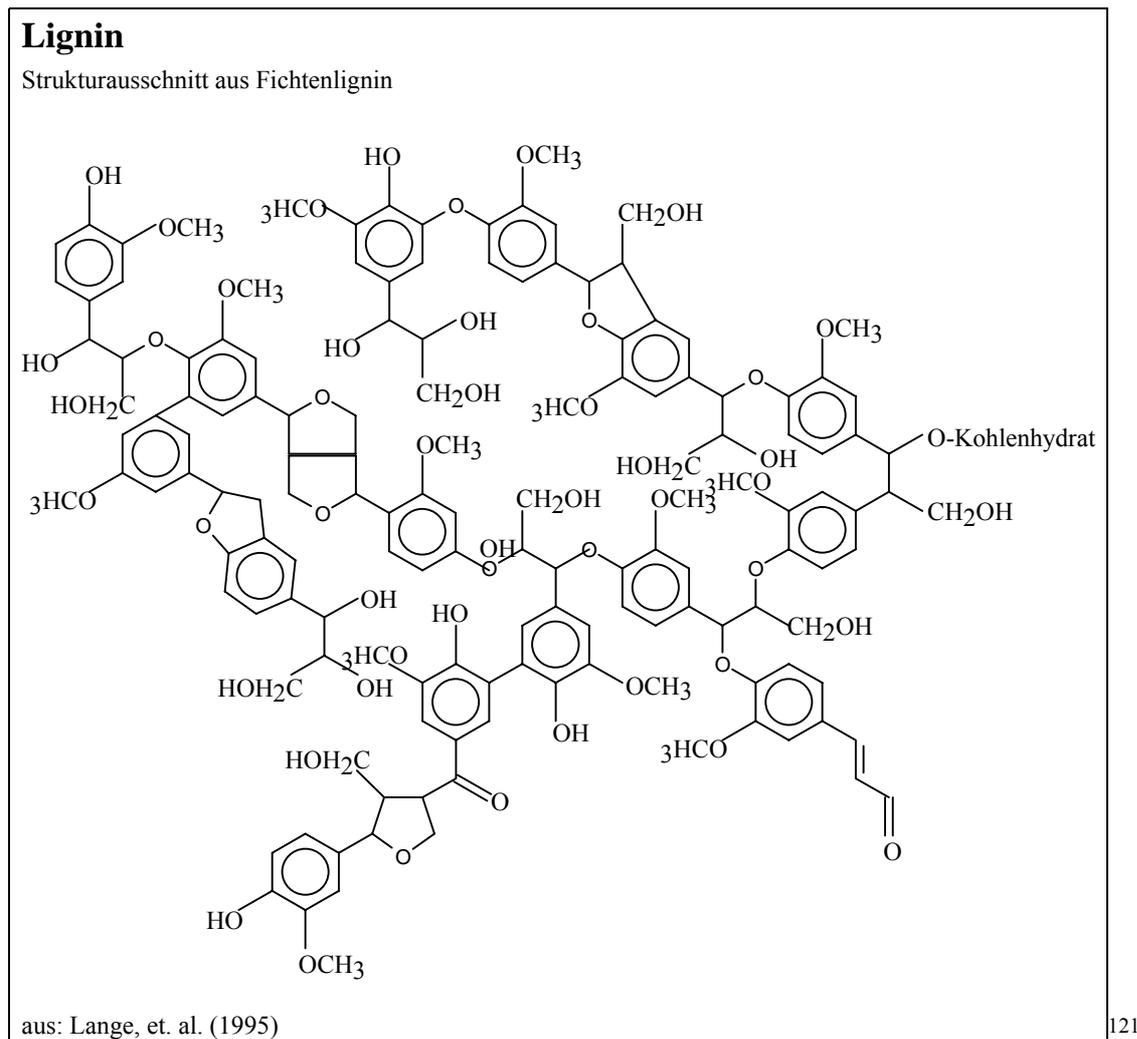
4. Ballistische Raketen:

Scud B (300-km Reichweite)	819 einsatzbereit
al-Hussein (650-km Reichweite)	In Entwicklung
al-Abbas (950-km Reichweite)	In Entwicklung
Startgerät für SS-21 (ballistische Kurzstreckenraketen)	1995 an UNSCOM übergeben
al-Samoud Raketen (150-km Reichweite)	Erlaubt nach UN Security Council Resolution 687

5. von den gemeldeten BW/TW und Verbringungsmöglichkeiten sind unauffindbar:

Scud Raketen-Komponenten, Gefechtsköpfe und Antriebseinheiten
 17 Tonnen Wachstumsmedium zur Produktion von BW
 100 al-Hussein Raketen
 20 R-17 Scud-B Raketen
 40-70 BW-fähige Gefechtsköpfe
 Beträchtliche Mengen BW und TW

7.1.5 Huminsäure



121

Abb. 7.1, Strukturausschnitt von Fichtenlignin

7.2 Optische Nachweise

7.2.1 UV/VIS-Spektren von Huminsäure

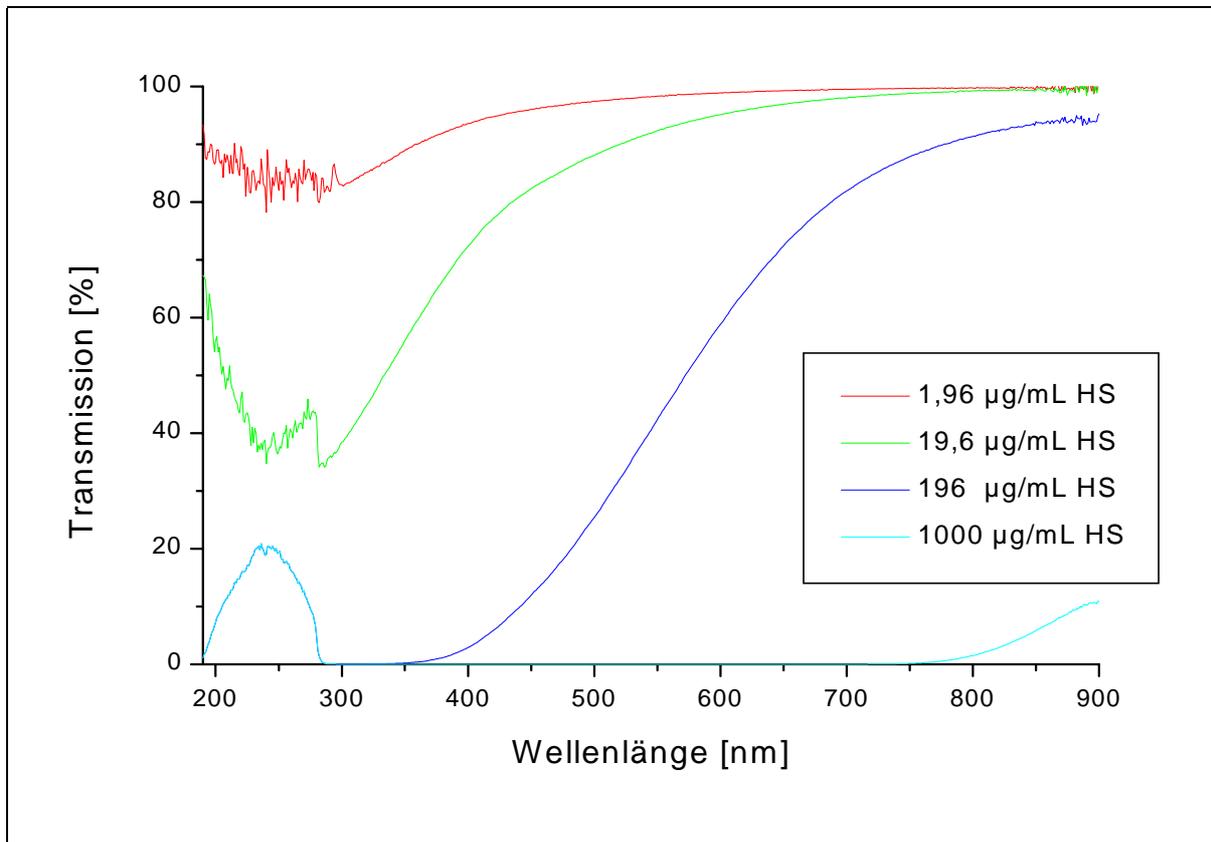


Abb. 7.2, Transmission von Huminsäure gegen Wasser

7.2.2 BCA-Test

In Form des wasserlöslichen Na-Salzes ist die Bicinchoninsäure ein sensitives, stabiles und hochspezifisches Nachweisreagenz für Cu^+ , welches in Anwesenheit von Protein durch Reduktion von Cu^{2+} entsteht. Die Bicinchoninsäure bildet mit dem einwertigen Cu^+ in alkalischer Lösung einen intensiv purpurfarbenen Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562nm.

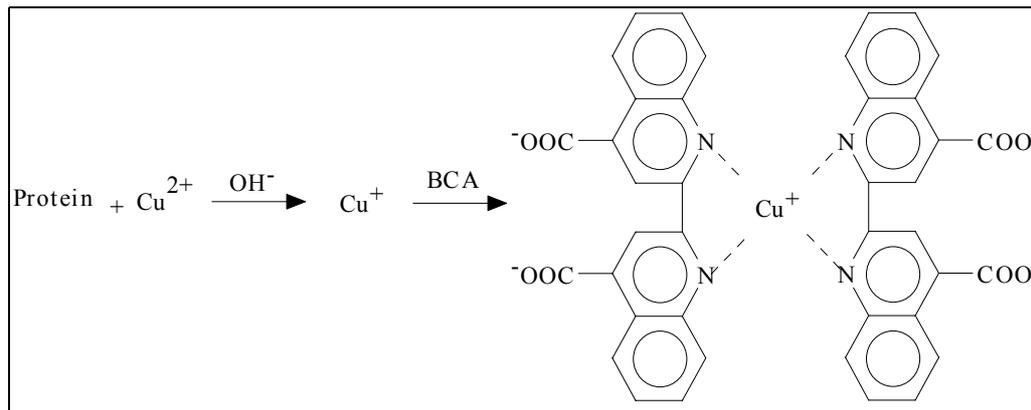
Reaktionsprinzip:

Abb. 7.3, BCA-Reaktion mit Protein

Stammlösungen:

Kalibrationsstammlösung 1: 1 mg Albumin (bovine) in 1ml PBS-Puffer (0.1 M, pH 7.4)

Kalibrationsstammlösung 2: Stammlösung 1 in einer Verdünnung 1 : 4

Gebrauchslösung:

Die Gebrauchslösung wird unmittelbar vor der Messung aus den beiden Standardlösungen (Sigma) im Verhältnis A:B wie 50:1 hergestellt.

Lösung A: 1,0 % Bicinchoninsäure 4,3 g
 2,0 % Na₂CO₃ * 10 H₂O 15,5 g
 0,16 % Na-Tartrat 0,8 g
 0,4 % NaOH (1M) 97 ml
 0,95 % NaHCO₃ 4,75 g
 ad 500 ml, pH 11,25 (NaOH)

Lösung B: 4% CuSO₄ * 5 H₂O

Versuchsdurchführung:

Der Test wird auf 96-well Mikrotiterplatten durchgeführt. Als Kalibrationsstammlösung wird eine Albuminlösung mit einer Konzentration von 1mg/ml hergestellt:

Es wird eine Kalibrationsreihe (Doppelbestimmung, Spalte 1 und 2) mit Hilfe der beiden Stammlösungen erstellt, wobei die Konzentrationen zwischen 10 und 1000 µg/mL Standard liegen. Danach werden 100 µL der Proben unbekannter Konzentration (3fach) in die Spalten 3-12. In jedes well werden 100 µl der frischen Gebrauchslösung zupipettiert. Im Anschluss wird die Mikrotiterplatte 30 min bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung der Extinktion erfolgt am Platten-Reader bei einer Wellenlänge von 560nm. Über die Eichgerade der Standards wird die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

Die Konzentrationen der BSA-Standards betragen:

12,5 – 25 – 50 – 125 – 250 – 500 – 1000 $\mu\text{g/mL}$

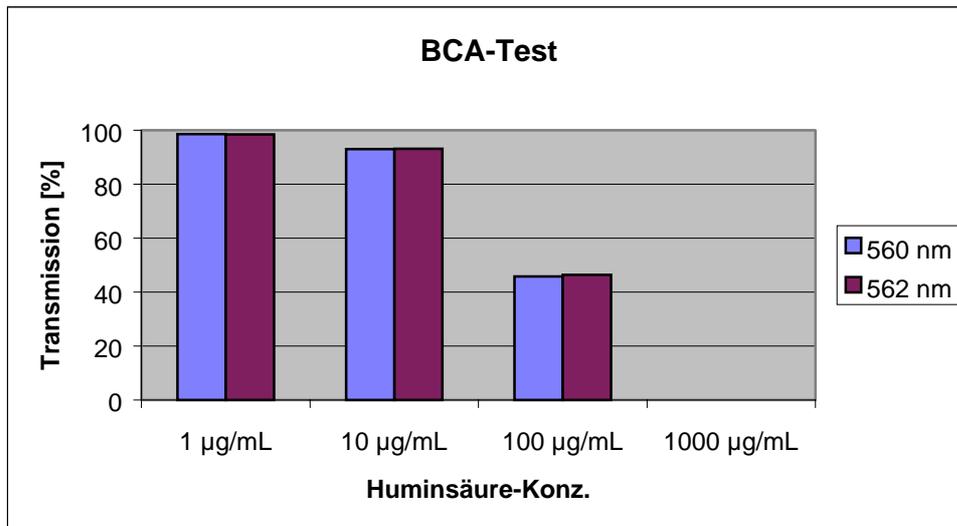


Abb. 7.4, Vergleich der Transmission bei optimaler und genutzter Wellenlänge des Platten-Readers in Abhängigkeit von der Huminsäurekonzentration

7.2.3 Coomassie-Test

Der Test wird ebenso wie beim BCA-Test auf 96-well Mikrotiterplatten durchgeführt. Erstellung einer Eichgerade und Herstellen der Eichstammlösung ist identisch. Es werden 150 μL Eichstammlösung bzw. Probe zugegeben. Danach werden 150 μL der fertigen Gebrauchslösung zugegeben. Die Bestimmung der Extinktion erfolgt am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 620 nm und über die Eichgerade der Standards wird die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

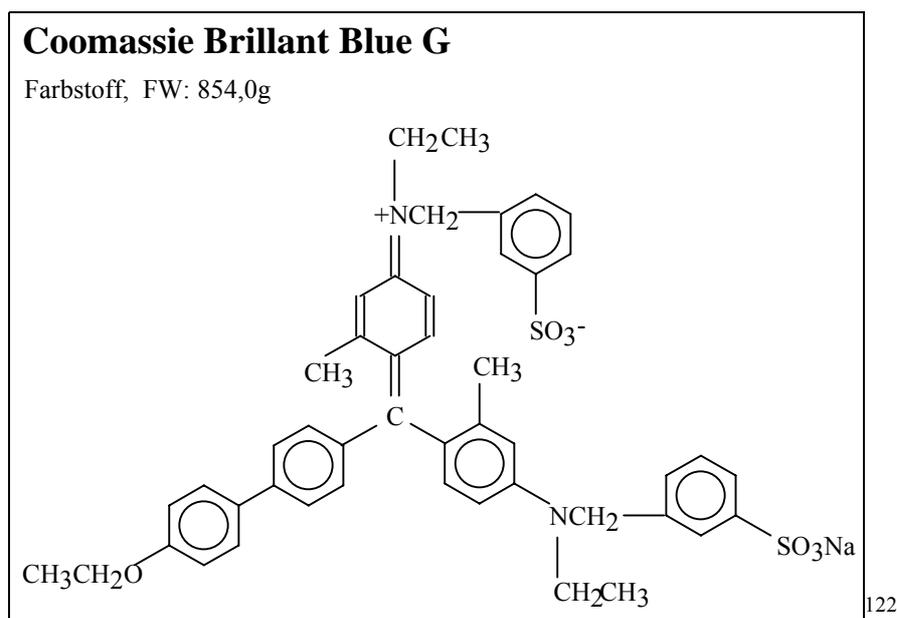


Abb. 7.5, Strukturformel Coomassie Brilliant Blue G

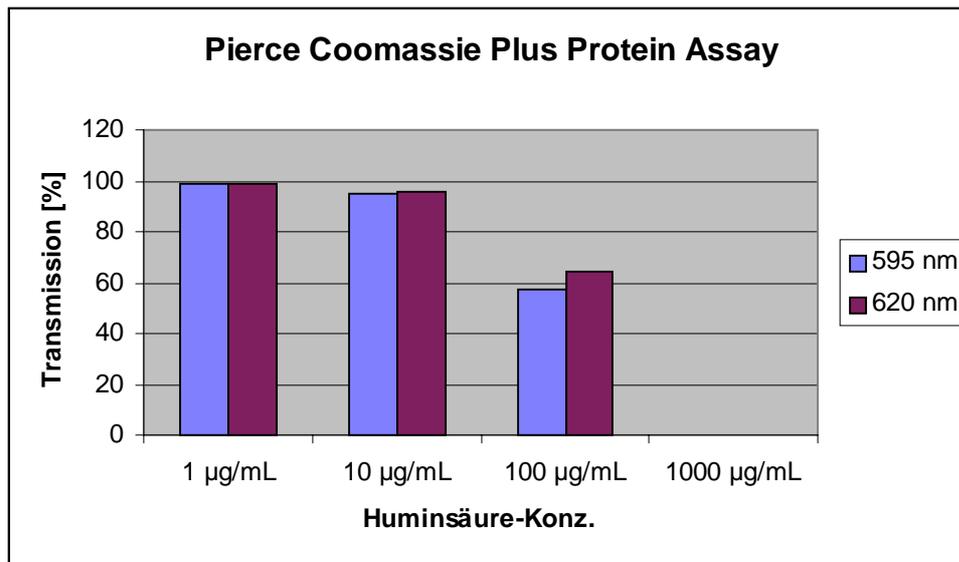


Abb. 7.6 Vergleich der Transmission bei optimaler und genutzter Festwellenlänge des Platten-Readers in Abhängigkeit von der Huminsäure-Konzentration

7.2.4 2D-Fluoreszenz

Tabelle 19, Messbedingungen 2D-Fluoreszenz

Messbedingungen

Scangeschwindigkeit:	12000 nm/min
Exzitationswellenlängenbereich:	250-550 nm
Emissionswellenlängenbereich:	260-600 nm
Bandbreite der Exzitation:	10 nm
Bandbreite der Emission:	20 nm
Schrittweite der Exzitation:	10 nm
Schrittweite der Emission:	10 nm
Photomultiplierspannung:	700 Volt
Messung je Datenpunkt:	1

7.3 Massenspektrometrische Nachweise mit MALDI-MS

7.3.1 MALDI-Spektren der untersuchten Matrizes

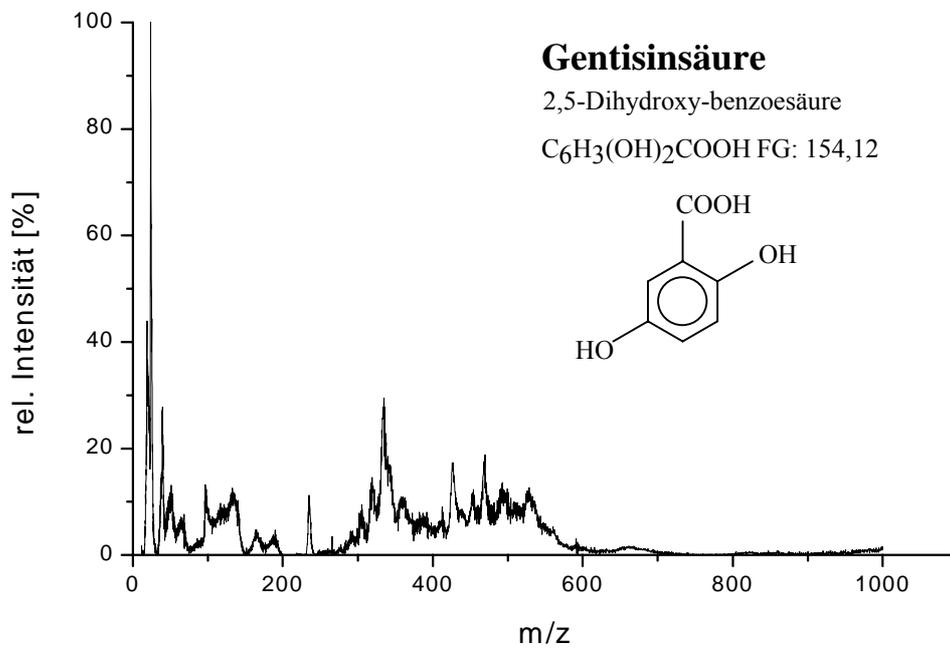


Abb. 7.7, MALDI-Spektrum von Gentisinsäure mit Strukturformel

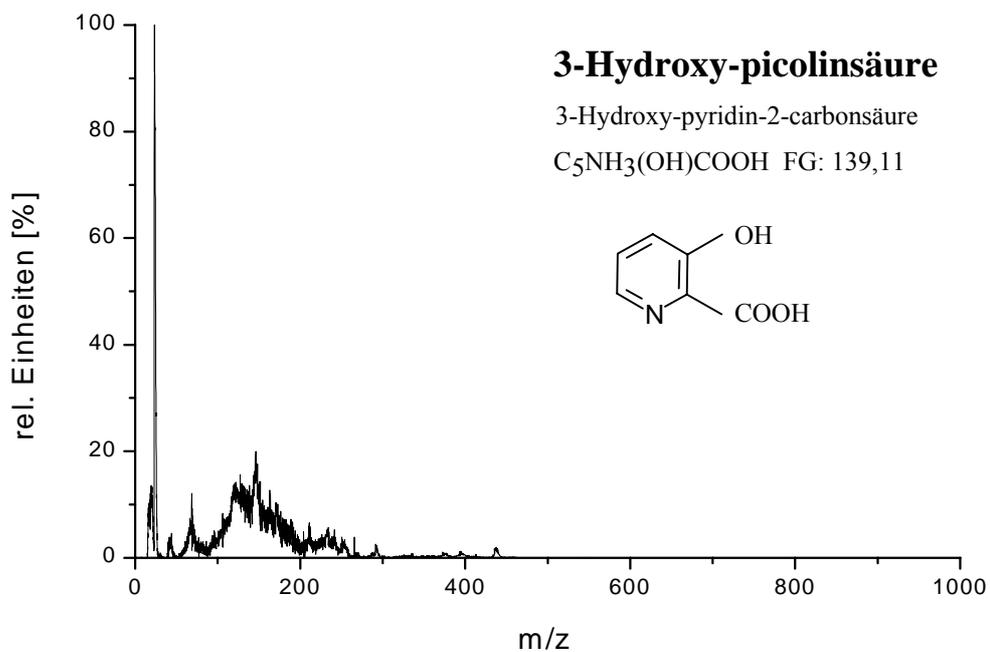


Abb. 7.8, MALDI-Spektrum von 3-Hydroxy-picolinsäure mit Strukturformel

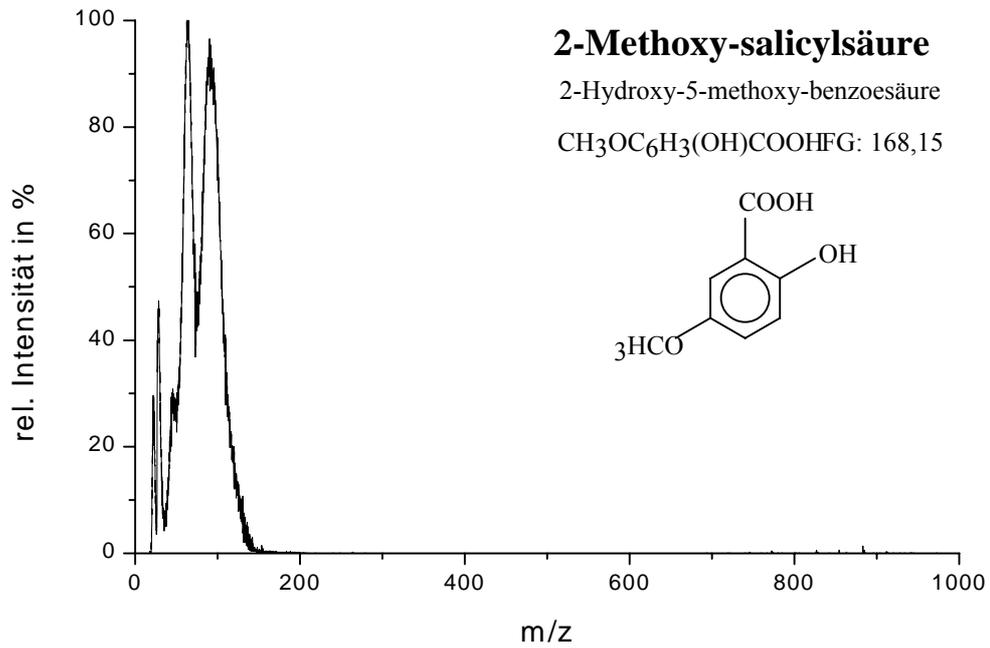


Abb. 7.9, MALDI-Spektrum von 2-Methoxy-salicylsäure mit Strukturformel

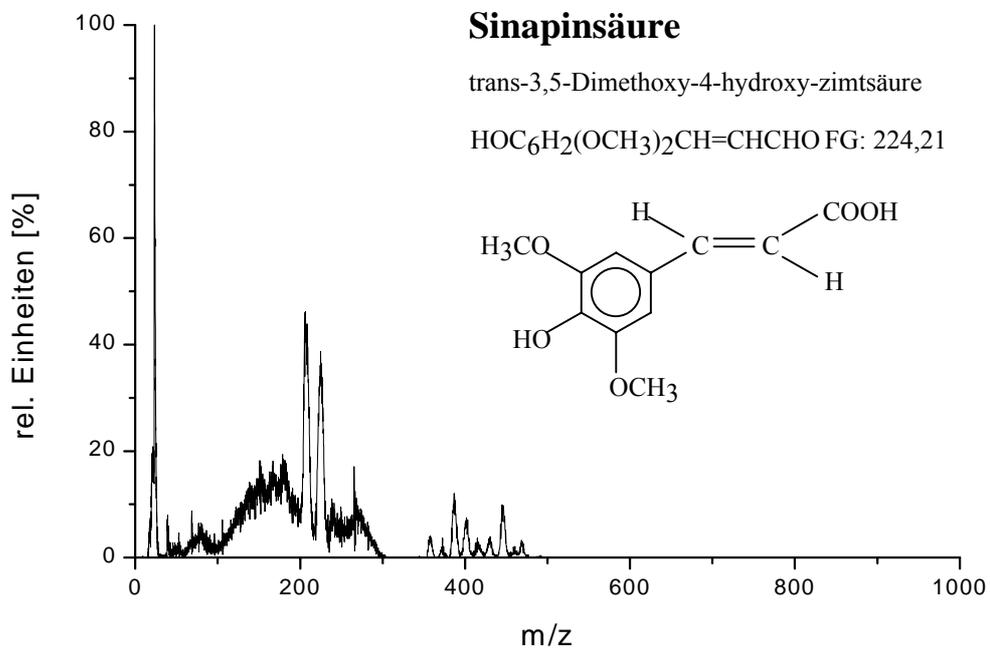


Abb. 7.10, MALDI-Spektrum von Sinapinsäure mit Strukturformel

7.3.2 MALDI-Spektren von BSA und Huminsäure in unterschiedlichen Matrices

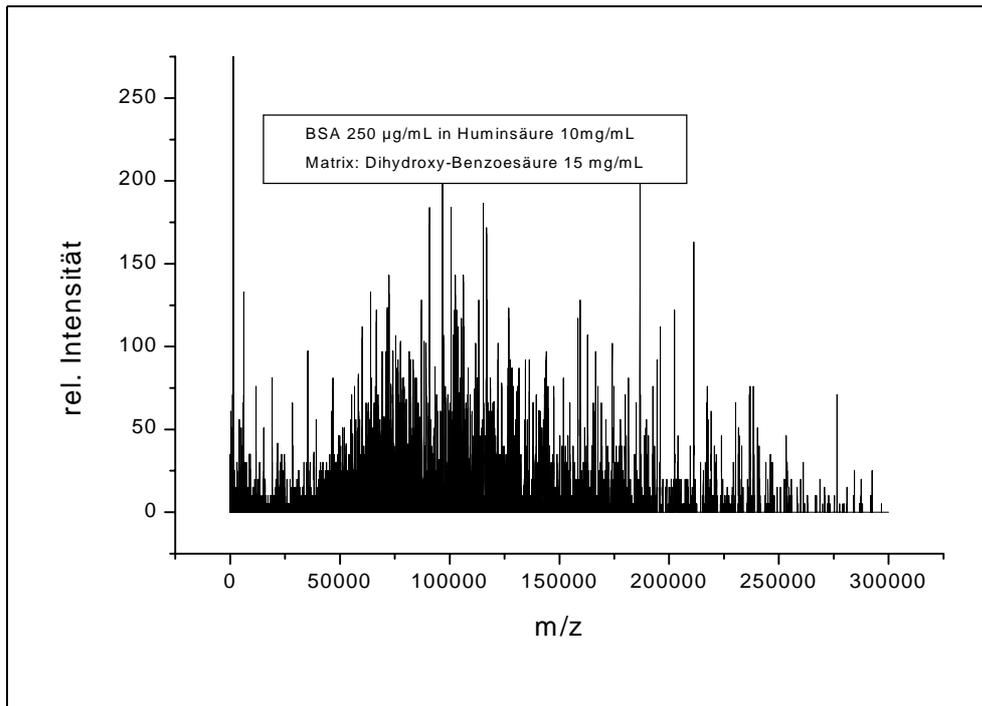


Abb. 7.11, MALDI-Spektrum von BSA in Dihydroxy-Benzoessäure

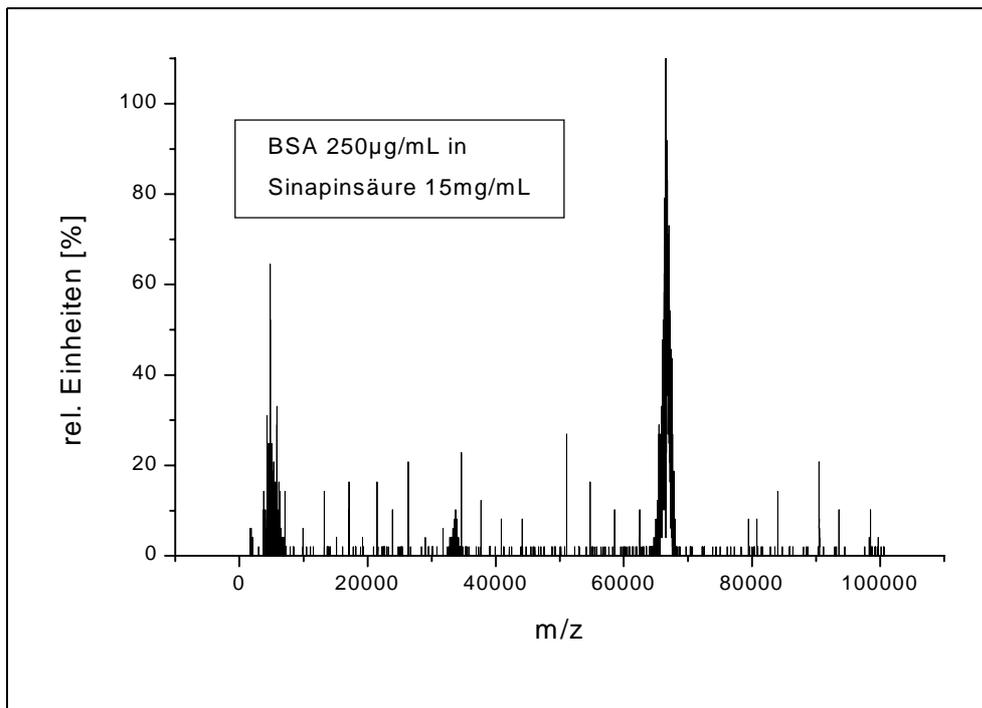


Abb. 7.12, MALDI-Spektrum von BSA in Sinapinsäure

7.3.3 MALDI-Spektren von TeTX in Sinapinsäure

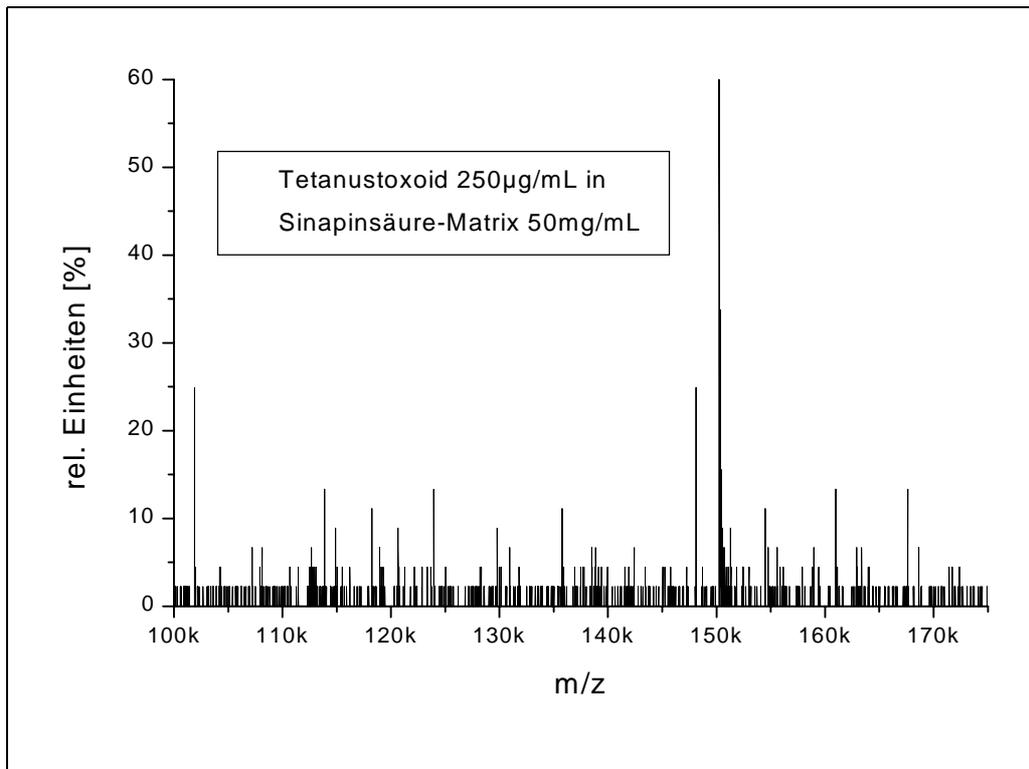


Abb. 7.13, MALDI-Spektren von TeTX in Sinapinsäure

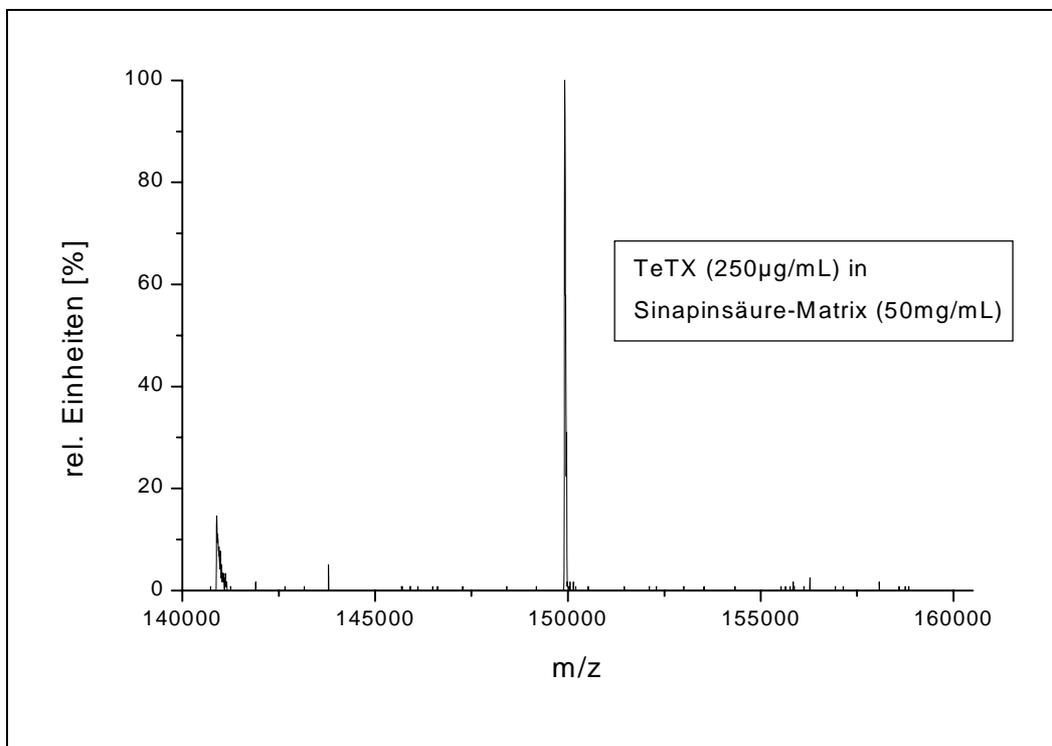


Abb. 7.14, Ausschnitt eines MALDI-Spektrums von TeTX in Sinapinsäure

7.4 PCR

7.4.1 Gelelektrophorese

TAE-Laufpuffer:

40 mM Tris;
0,11% (v/v) Essigsäure (HAc);
1 mM EDTA, pH 8,0

Gelladungspuffer:

0,25% (w/v) Bromphenolblau;
0,25% (w/v) Xylencyanol FF;
30% (w/v) Glycerin

Zur Herstellung des 1,2%igen Agarose-Gels werden 0,30g Agarose (w/v) durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle in 25mL TAE-Puffer gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wird die Lösung mit 3µL Ethidiumbromidlösung (0,1M) versetzt und in ein Gelbett gegossen. Nach dem Erstarren wird das Gel in die Gelkammer gelegt und ca. 5 mm mit TAE-Laufpuffer überschichtet. 10µL des Amplikons werden in die Taschen gegeben und nachfolgend mit 4-5µL Gelladungspuffer überschichtet. Die Elektrophorese wird bei 100V für 20min durchgeführt.

7.4.2 Medienzusammensetzung

Medienzusammensetzung der Vorkultur:

Fructose	5 g
Hefeextrakt	5 g
K ₂ HPO ₄	10 g
NaHCO ₃	10 g
Spurenelement-Lösung SL-6	10 ml
Pyridoxin-HCl	1 mg
Resazurin	1 mg
Na-thioglycolat	0.75 g
Agar, sofern notwendig	15 g
Dest. H ₂ O	1000 ml

Spurenelement-Lösung SL-6:

ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0.10	g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0.03	g
H ₃ BO ₃	0.30	g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0.20	g
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0.01	g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0.02	g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0.03	g
Dest. H ₂ O	1000	ml

7.4.3 Sequenz der ribosomalen 16S-rDNA von *Cl. formicoaceticum*

BASE COUNT 393 a 337 c 481 g 303 t 7 others

1 nnnnnngaga gttgtcctg gctcaggtga acggctggcg gcgtgcctaa cacatgcaag
61 tcgagcgaac cgatttatcg gaagccttcg gtggaagatg atgaggtag cggcggacgg
121 gtgagtaacg cgtgggtaac ctaccttcta cagggggata acagtcggaa acgattgcta
181 ataccgata aagetatfff aaggcatctt agaatagcca aaagatttat tggtcacaag
241 atgggcccgc gtcctgtatt agctagtgg nggggtaaag gcctaccaag gcgacgactg
301 tagccgacct cagtagccga cctgagaggg tgaccggcca cactggaact gagacacggt
361 ccagactcct acgggagcca gcagtgggga tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag
421 cgacgccgcg tgagcgaaga aggccttcgg gtcgtaaagc tctgttcga gggaagaaaa
481 atgacggtac ctctggagga agccacggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt
541 agggggcaag cgttatccgg aatcactggg cgtaaagggt gcgtaggcca ataaagtcta
601 gggtagaagg ctacggctca accgtagtaa gccttggaaa cttattggct tgagtgcagg
661 agaggagagt ggaattccta gtgtagcggg gaaatgcgta gatattagga ggaacaccag
721 tggcgaaggc gactctctgg actgtaactg acgctgaggc acgaaagcgt ggggagcgaa
781 caggattaga taccctggta gtccacgccg taaacgatga gtgctaggtg ttgggggtca
841 aacctcagtg ccgcacgtaa cgcattaagc actccgctg gggagtacgc acgcaagtgt
901 gaaactcaaa ggaattgacg gggaccgcca caagcagcgg acgatgtggt ttaattcgaa
961 gcaacgcgaa gaacctacc tggactgac atcctatga ccgctttta acagaagctt
1021 tcccttcggg gacagaagtg acaggtggtg catggttgc gtcagctcgt gtcgtgagat
1081 gttgggttaa gtcccgcaac gagegcaacc ctgtcttta gttgccagca ttcggatggg
1141 cactctagag agactgccgg ggacaactcg gaggaagggtg ggggtgacgt caaatcatca
1201 tgccccttat gttcagggtc acacacgtgc tacaatggcc gatacaaagg gcagcgaagg
1261 agtaactcgg agcgaatcgc ataaagtcgg tctcagttcg gattgtgggc tgaactcgc
1321 ccacatgaag ttggagtgc tagtaatcgc gaatcagaat gtcgagggtga atgcgtccc
1381 gggctcttga cacaccgcc gtcacaccat gggagtcgga agcgcgccgaa gccagctact
1441 ttaaccgaaa ggagagagct gtcgaagggtg aagccgatga ctgggggtgaa gtcgtaacaa
1501 ggtagccgta tcggaagggtg c

Tabelle 20, Sequenz der ribosomalen 16S-rDNA von *Cl. formicoaceticum*

7.4.4 Formel zur Berechnung der Annealing-Temperatur von Oligonucleotiden

$$T_m = 81,5 + 16,6 (\log_{10}[J^+]) + 0,4 (\% G+C) - 600/\text{Anzahl der Basen} - 0,63 (\% FA)^{123}$$

Abkürzungen:

A	Adenosin
C	Cytidin
FA	Formamid
G	Guanosin
J ⁺	Konzentration monovalenter Kationen
T	Thymidin
T _m	Berechneter Schmelzwert

7.4.5 Sequenzierung des amplifizierten Templates

Ergebnis der Sequenzierung vom 18.09.2000

```

1 CCTTGAAAC TTATTGGCTT GAGTGCAGGA GAGGAGAGTG GAATTCCTAG TGTAGCGGTG
61 AAATGCGTAG ATATTAGGAG GAACACCAGT GGCGAAGGCG ACTCTCTGGA CTGTAAGTGA
121 CGCTGAGGCA CGAAAGCGTG GGGAGCGAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCCGT
181 AAACGATGAG TGCTAGGTGT TGGGGGTCAA ACCTCAGTGC CGCAGCTAAC GCATTAAGCA
241 CTCCGCCTGG GGAGTACGCA CGCAAGTGTG AAACCTCAAAG GAATTGACGG GGACCCGCAC
301 AAGCAGCGGA GCATGTGGTT TAATTCGAAG CAACGCGAAG AACCTTACCT GGACTTGACA
361 TCCTTATGAC CGCTTTTTAA CAGAAGCTTT CCCTTCGGGG ACAGAAGTGA CAGGTGGTGC
421 ATGGTTGTCG TCAGCTCGTG TCGTGAGATG TTGGGTAAAG TCCCGCAACG AGCGCAACCC
481 TTGTCTTTAG TTGCCAGCAT TTCGGATGGG CACTCTAGAG AGACTGCCGG GGACAACCTCG
541 GAGGAAGGTG GGGA-GACTT CCAATCATCA TGCCCCTTAT GTTCAGGGCT ACACACGTGC
601 TACAATGGCC GATACAAAGG CAGCGAAGGA

```

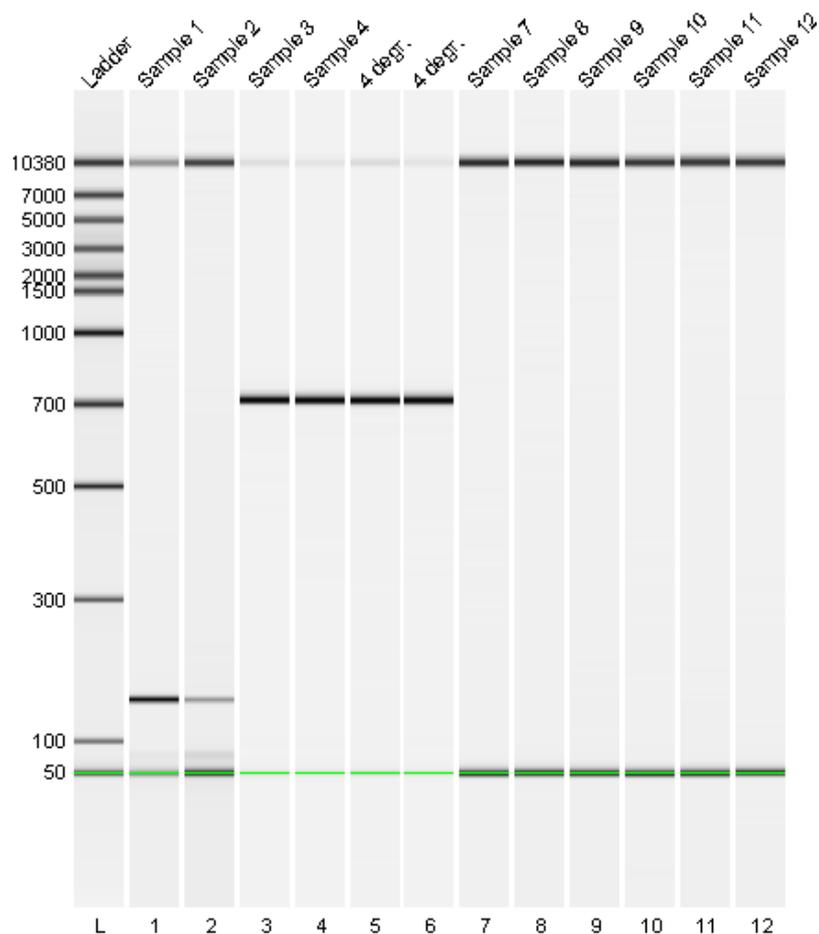


Abb. 7.15, Nachweis des gesuchten Amplikons von *Cl. formicoaceticum*

Auswertung Agilent 2100 bioanalyzer system mit DNA-Chip und Auswertung über Agilent Software Biosizing ver. 1.3.3. Die Proben 3 und 4 zeigen Amplikons, die mit einer Annealing-Temperatur von 55°C erzeugt wurden. Die Proben 5 und 6 stammen von der Sequenzierung.

7.4.6 Vergleich verschiedener PCR-Kits

Bandenintensitäten im Agarose-Gel bei unterschiedlicher HS-Konzentration im Template mit variierender Template-Konzentration:

Tabelle 21, Hybaid AGS Gold:

	1	2	3	4
1	H ₂ O 10	HS I 10	HS II 10	HS III 10
2	H ₂ O 1	HS I 1	HS II 1	--
3	H ₂ O 0,1	HS I 0,1	HS II 0,1	--

Tabelle 22, Hybaid AGS Proof Sprinter:

	1	2	3	4
1	H ₂ O 10	HS I 10	HS II 10	HS III 10
2	H ₂ O 1	HS I 1	HS II 1	--
3	H ₂ O 0,1	HS I 0,1	HS II 0,1	--

Tabelle 23, BioWitthaker Taq:

	1	2	3	4
1	H ₂ O 10	HS I 10	HS II 10	HS III 10
2	H ₂ O 1	HS I 1	HS II 1	--
3	H ₂ O 0,1	HS I 0,1	HS II 0,1	--

Tabelle 24, BioWitthaker ex-Taq:

	1	2	3	4
1	H ₂ O 10	HS I 10	HS II 10	HS III 10
2	H ₂ O 1	HS I 1	HS II 1	--
3	H ₂ O 0,1	HS I 0,1	HS II 0,1	--

Tabelle 25, Biozym MasterAmp Core Kit: ohne Enhancer

	1	2	3	4
1	H ₂ O 10	HS I 10	HS II 10	HS III 10
2	H ₂ O 1	HS I 1	HS II 1	--
3	H ₂ O 0,1	HS I 0,1	HS II 0,1	--

Tabelle 26, Biozym MasterAmp Core Kit: mit Enhancer

	1	2	3	4
1	H ₂ O 10	HS I 10	HS II 10	HS III 10
2	H ₂ O 1	HS I 1	HS II 1	--
3	H ₂ O 0,1	HS I 0,1	HS II 0,1	--

*Legende:

Bezeichnung	Template-Verdünnung	Zellzahl	Bezeichnung	c (HS/Template)	Bandenintensität
10	1 : 10	2*10 ⁵	HS I	1 mg/mL	sehr deutliche Bande
1	1 : 100	2*10 ⁴	HS II	10 mg/mL	deutliche Bande
0,1	1 : 1000	2*10 ³	HS III	100 mg/mL	schwache Bande
					keine Bande

7.5 Immunochemische Nachweise

7.5.1 Eingesetzte Immunreagenzien

Tetanustoxoid

Das hier benutzte TeTX wurde freundlicherweise von Herrn Dipl. Chem. Andreas Rummel, Institut für Physiologische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover hergestellt.

Es handelt sich um ein rekombinantes scTeNTvqH: MRGS Startmethionin mit drei Aminosäuren aus Klonierungsgründen. HELIH Motif ist in VQLIH mutiert, so dass keine Koordination eines Wassermoleküls mehr möglich ist. E234Q und eine Zn²⁺ Koordinationsstelle fehlt, H233V. Zwischen LC und HC nach T 456 ist AM aus Klonierungsgründen eingefügt. Nach D 1315 folgt die IgAse Erkennungssequenz PPTP. Zur Aufreinigung besitzt das Toxoid einen His6-Tag. Die Aufreinigung erfolgte

Monoklonaler primärer Antikörper aus Maus

monoklonaler anti-Hc-Fragment Antikörper mit der Bezeichnung T2 33/35, hergestellt: 1991, Dr. med. vet. Joachim Thierer an der Bundesanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen; Bezug über: Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Physiologische Chemie

Monoklonaler sekundärer Antikörper aus Ziege

HRP-gelabelter Ziege–Anti–Maus (H+L) Antikörper von Pierce (Best.-nr.: 31430)

Polyklonaler primärer AB aus Pferd

Polyklonale Antikörper aus Immunserum von Pferden, die mit Toxoid und Toxin von Clostridium tetani hyperimmunisiert wurden. 1mL Lösung enthält mindestens 1000 iE Tetanus-Antitoxin und maximal 0,25 m/V% Phenol, WDT, Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG¹²⁴

Die Aufreinigung des eingesetzten polyklonalen Antikörpers erfolgte über eine Pharmacia Protein G-Säule (Sepharose 4 Fast Flow), durchgeführt durch das WIS, Munster.

Labeln eines Antikörpers mit aktivierter Peroxidase

Das Labeln des aufgereinigten AB wird mit Pierce EZ-Link™ Plus Activated Peroxidase Kit (Best.-nr.: 31489) durchgeführt. Zuckerreste der HRP sind mit Periodat zu Aldehyden oxidiert und können mit primären Aminen des Antikörpers reagieren¹²⁵.



Abb. 7.16, schematische Kopplungsreaktion der aktivierten Peroxidase mit Antikörper

Die lyophilisierte aktivierte Peroxidase wird in 100µL Wasser rekonstituiert und mit Antikörper in Konjugationspuffer (Carbonat, pH 8,4) gemischt, so dass die Peroxidase im vierfachen Überschuss vorliegt und der Antikörper eine Konzentration von 1mg/mL besitzt. Nach 1h Inkubation bei RT wird 10µL der Reduktionslösung (Na-Cyanoborhydrid, 6M) zugegeben, die 15 min bei RT abreagiert. Danach werden 20µL des Quenching-Puffers (Ethanolamin, 3M) zugegeben und reagiert ebenfalls 15 min ab. Im Anschluss wird nicht abreagiertes Enzym durch UF (100kDa MWCO) vom Konjugat abgetrennt und der Filtrerrückstand in Carbonat-Puffer pH 8,5 aufgenommen und bei +4°C gelagert.

Farbsubstrat

Pierce ImmunoPure TMB Substrat-Kit (Best.-nr.: 34021)

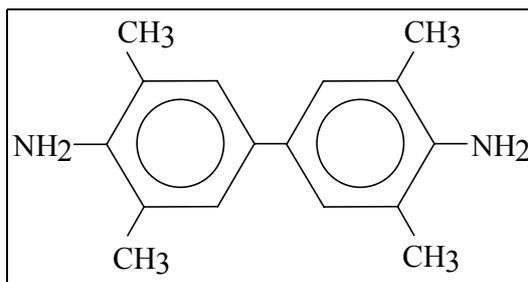


Abb. 7.17, Farbsubstrat für ELISA, TMB

7.5.2 ELISA

7.5.2.1 Indirekter ELISA

Durchführung

1. 100µL des in coating-Puffer gelösten Antigens wird über Nacht (16h) im Kühlraum bei +4°C inkubiert, wobei Spalte H als Negativkontrolle frei bleibt.
2. 4x mit 300µL/well Waschpuffer (PBS mit 0,15% Tween20) waschen. (Durch das Waschen wird nicht gebundenes Material entfernt. Durch Zugabe von Tween20 werden unspezifische Bindungen der Reaktanden mit der Polystyroloberfläche verhindert).
3. 250µL Blockierungs-Puffer (1% BSA in PBS), 60 min Schüttelinkubator (Certomat R/H, Fa. Braun, Melsungen) bei 25°C und 150 rpm.
4. 4x mit Waschpuffer waschen.

5. 100µL/well des 1°Antikörper zugeben, wobei Reihe 12 als Negativkontrolle frei bleibt, 60 min. inkubieren (Schüttelinkubator 25°C und 150 rpm)
6. 4x mit Waschpuffer waschen.
7. 100µL/well des 2°gelabelten Antikörpers (Anti-AB*E) 60 min. inkubieren (Schüttelinkubator 25°C und 150 rpm)
8. 4x mit Waschpuffer waschen. Nach der 4. Zugabe des Waschpuffers wird die Mikrotiterplatte noch einmal 5 min bei 25°C und 150rpm inkubiert, um eine gründliche Entfernung des 2° Antikörpers zu gewährleisten.
9. 100µL/well TMB-Substrat (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidin) 30 min. inkubieren (Schüttelinkubator 25°C und 150 rpm)
10. photometrisch Auswertung der Absorption @ 450nm mit Intermed Immunoreader NJ-2000

2D-Verdünnung

1. 100µL des in coating-Puffer gelösten Antigens wird über Nacht (16h) im Kühlraum bei +4°C inkubiert.
2. 4x mit 300µL/well Waschpuffer (PBS mit 0,15% Tween20) waschen. (Durch das Waschen wird nicht gebundenes Material entfernt. Durch Zugabe von Tween20 werden unspezifische Bindungen der Reaktanden mit der Polystyroloberfläche verhindert).
3. 250µL Blockierungs-Puffer (1% BSA in PBS), 60 min Schüttelinkubator (Certomat R/H, Fa. Braun, Melsungen) bei 25°C und 150 rpm.
4. 4x mit Waschpuffer waschen.
5. 100µL Waschpuffer vorlegen und danach 100µL des 1°Antikörper (AB) in die 1. Spalte (c: 20µg/mL) zugegeben. Die Ausgangskonzentration beträgt damit 10µg/mL.
 - a. Danach wird mit einer 8-Kanal-Pipette eine serielle Verdünnung der Spalte 2-11 durchgeführt, wobei Spalte 12 als Negativkontrolle frei bleibt.
 - b. 60 min. inkubieren (Schüttelinkubator 25°C und 150 rpm)
6. 4x mit Waschpuffer waschen.
7. 100µL Waschpuffer vorlegen und danach 100µL des 2°gelabelten Antikörpers (Anti-AB*E) in die 1. Reihe [A](c: 2,5µg/mL).
 - a. Die Reihen B-G werden wieder seriell verdünnt; Reihe H bleibt zur Kontrolle frei
 - b. 60 min. inkubieren (Schüttelinkubator 25°C und 150 rpm)
8. 4x mit Waschpuffer waschen. Nach der 4. Zugabe des Waschpuffers wird die Mikrotiterplatte noch einmal 5 min bei 25°C und 150rpm inkubiert, um eine gründliche Entfernung des 2° Antikörpers zu gewährleisten.

9. 100 μ L/well TMB-Substrat (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidin) 30 min. inkubieren
(Schüttelinkubator 25°C und 150 rpm)

10. photometrisch Auswertung der Absorption @ 450nm mit Immunoreader

relative Absorption des 2D-ELISA:

	10	5	2,5	1,3	0,63	0,31	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01	K
2,5	0,471	0,294	0,26	0,256	0,181	0,096	0,077	0,081	0,078	0,078	0,066	0
1,3	0,27	0,214	0,179	0,108	0,089	0,075	0,056	0,039	0,034	0,05	0,038	0
0,63	0,187	0,141	0,095	0,068	0,06	0,051	0,026	0,03	0,021	0,05	0,019	0
0,31	0,115	0,079	0,043	0,036	0,028	0,022	0,013	0,017	0,01	0,012	0,02	0
0,16	0,073	0,056	0,036	0,021	0,016	0,014	0,008	0,006	0,008	0,017	0	0
0,08	0,03	0,026	0,018	0,009	0,011	0,004	0,005	0,005	0,005	0	0	0
0,04	0,01	0,011	0,012	0,004	0,005	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Optimierung des Immobilisierungspuffers

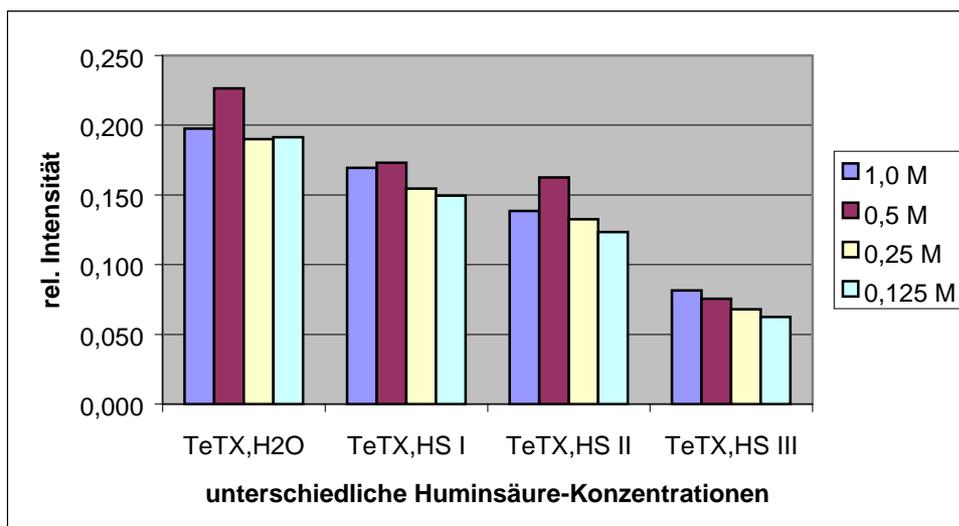


Abb. 7.18, Variation der Molarität des Immobilisierungspuffers

Versuchsbedingungen:

1. Immobilisieren: TeTX c_i: 2,0 μ g/mL; T: 37°C; t: 60 min
4x waschen
 2. Blocking 1% BSA in PBS, T: RT; t: 30 min
4x waschen
 3. 1°AB (Mouse) c: 2,0 μ g/mL; T: RT; t: 30 min
4x waschen
 4. 2°AB (Mouse); c: 1,75 μ g/mL; T: RT; t: 60 min
4x waschen
 5. TMB 100 μ L / well
- Ergebnis nach 30 min, Mikrotiterplattenlesegerät Abs @ 450nm

7.5.2.2 Direkter ELISA

Durchführung

1. 100µL des in coating-Puffer gelösten Antigens 60 min bei 37°C inkubieren.
2. 4x mit 300µL/well Waschpuffer (PBS mit 0,15% Tween20) waschen.
3. 250µL Blockierungs-Puffer (1% BSA in PBS), 60 min
(Schüttelinkubator 25°C und 150 rpm)
4. 4x mit Waschpuffer waschen.
5. 100µL des gelabelten 1°Antikörpers (AB*) zugegeben. 60 min inkubieren
(Schüttelinkubator 25°C und 150 rpm)
6. 4x mit Waschpuffer waschen.
7. 100µL/well TMB-Substrat (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidin) 30 min inkubieren
(Schüttelinkubator 25°C und 150 rpm)
8. photometrisch Auswertung der Absorption @ 450nm mit Immunoreader

2D-Verdünnung

1. 100µL Waschpuffer vorlegen und danach 100µL des in coating-Puffer gelösten Antigens in die 1. Spalte (c: 40µg/mL) zugegeben. Die Ausgangskonzentration beträgt 20µg/mL. Danach wird mit einer 8-Kanal-Pipette eine serielle Verdünnung der Reihen B-G durchgeführt, wobei Reihe H als Negativkontrolle frei bleibt. 60 min bei 37°C inkubieren.
2. 4x mit 300µL/well Waschpuffer (PBS mit 0,15% Tween20) waschen.
3. 250µL Blockierungs-Puffer (1% BSA in PBS), 60 min Schüttelinkubator
4. 4x mit Waschpuffer waschen.
5. 100µL des gelabelten 1°Antikörper in die 1. Reihe (c: 10µg/mL) zugegeben. Danach wird mit einer 8-Kanal-Pipette eine serielle Verdünnung der Spalte 2-11 durchgeführt, wobei Spalte 12 als Negativkontrolle frei bleibt. 60 min. inkubieren (Schüttelinkubator 25°C)
6. 4x mit Waschpuffer waschen.
7. 4x mit Waschpuffer waschen. Nach der 4. Zugabe des Waschpuffers wird die Mikrotiterplatte noch einmal 5 min bei 25°C und 150rpm inkubiert, um eine gründliche Entfernung des 2° Antikörpers zu gewährleisten.
8. 100µL/well TMB-Substrat (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidin) 30 min. inkubieren (Schüttelinkubator 25°C).
9. photometrisch Auswertung der Absorption @ 450nm mit Immunoreader

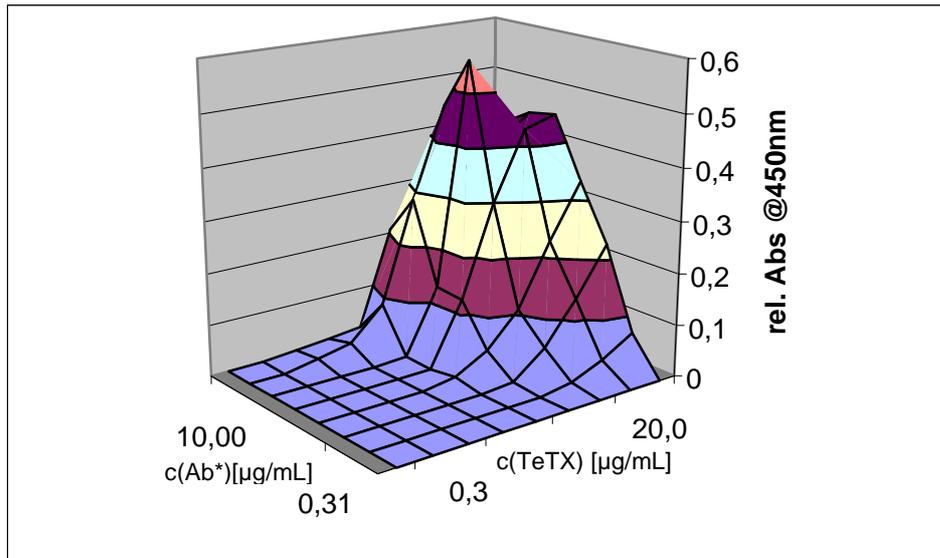
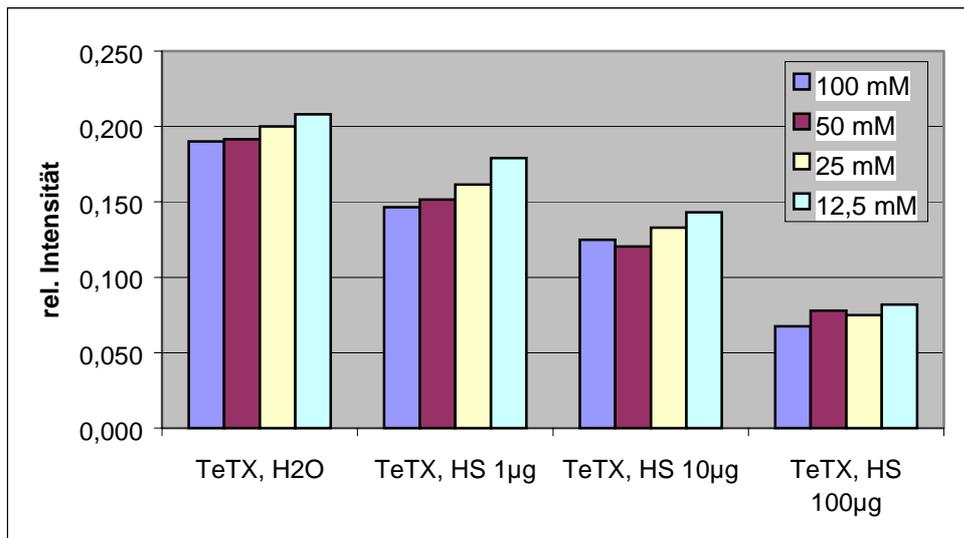


Abb. 7.19, direkter 2D-ELISA

Blocking mit verschiedenen Blockierungspuffern



Abb. 7.20, Einsatz verschiedener Blockierungspuffer

Variation der $MgCl_2$ -KonzentrationAbb. 7.21, Variation der $MgCl_2$ -Konzentration

Variation von Waschpuffer und Oberfläche

Es wird jeweils eine Nunc Maxisorp und Polysorp Mikrotiterplatte untersucht.

Das Protokoll entspricht dem Standardprotokoll für den direkten ELISA.

Als Waschpuffer wird einmal PBS mit 0,15% Tween-20 und einmal ohne Tween eingesetzt.

Variation von I-zeiten und verschiedenen Huminsäure-Konzentrationen

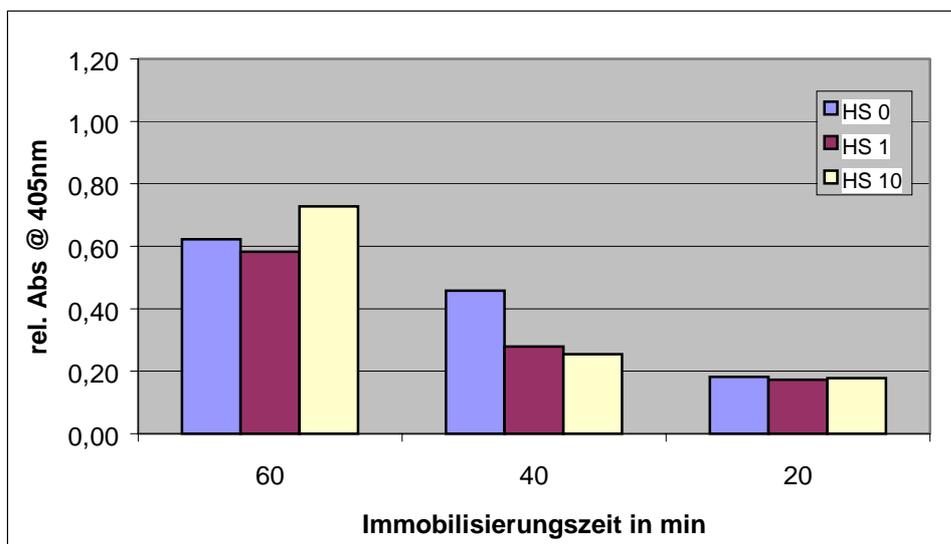


Abb. 7.22, direkter ELISA mit unterschiedlichen Immobilisierungszeiten

Versuchsbedingungen:

Das Protokoll entspricht dem Standardprotokoll für den direkten ELISA.

5µg/mL TeTX in I-Puffer werden für 60, 40, 20 min inkubiert.

Absorption wird bei 405nm messen

NWG optimierter direkter ELISA

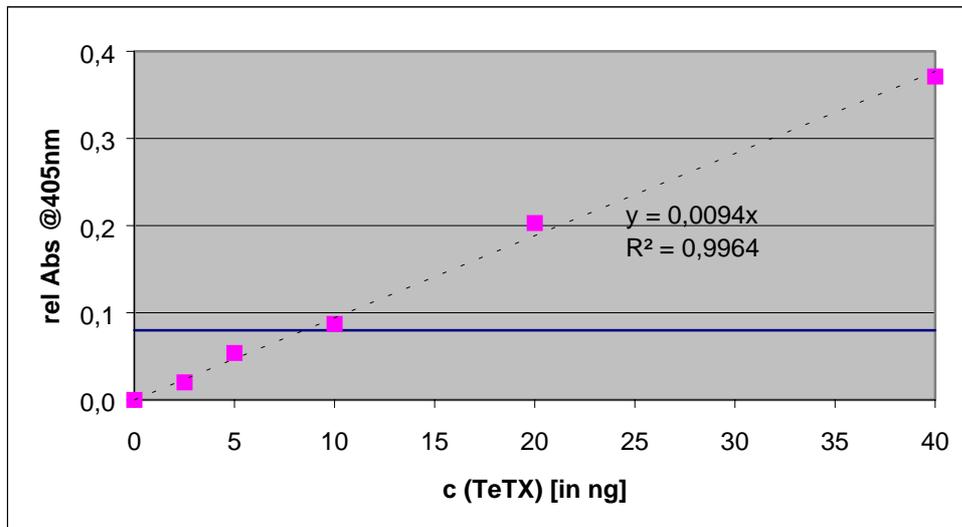


Abb. 7.23, NWG direkter ELISA

Ermitteln der NWG: $0,08 \text{ [rel. Absorption]} / 0,0094 = 8,51 \text{ ng TeTX}$

Nachweis von TeTX neben Huminsäure

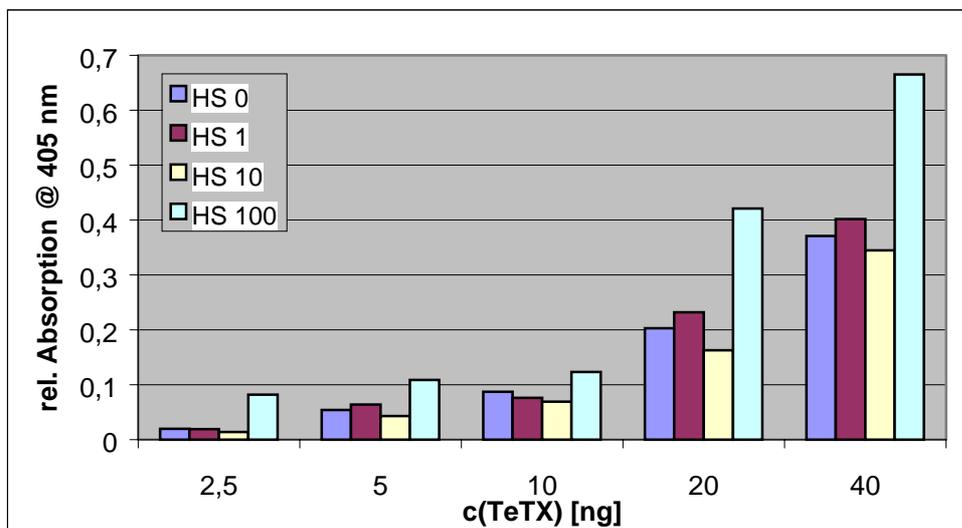


Abb. 7.24, Nachweis von TeTX neben Huminsäure

7.5.3 Diskchromatographie

7.5.3.1 Antikörper-Immobilisierung auf Disk

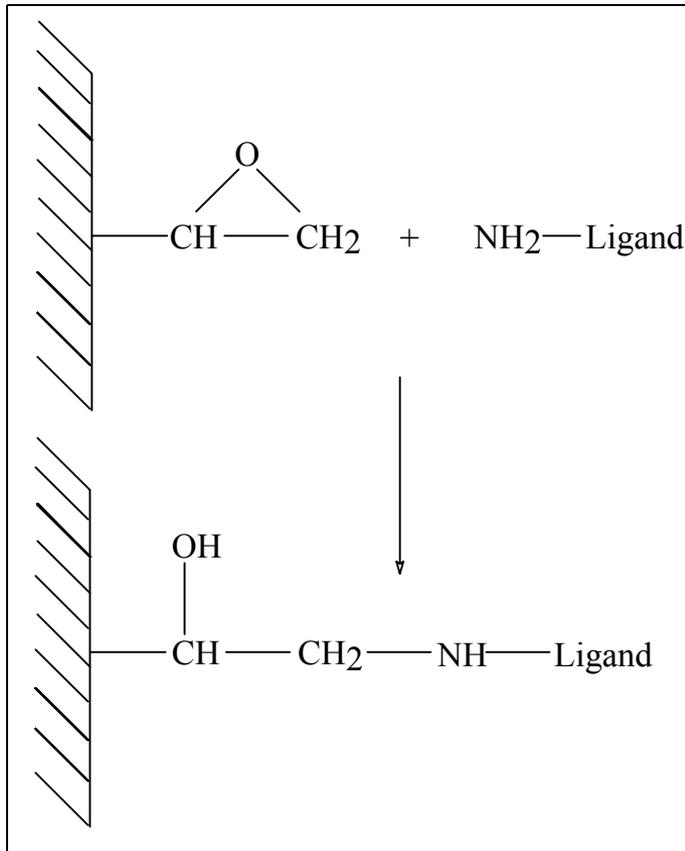


Abb. 7.25, Kopplungsmechanismus von Liganden an Epoxygruppen nach: Aboogh-Rebyeh, 1991

Immobilisierung von Antikörpern auf GMA-EDMA-Disks nach Kasper, 1998

Vor der wird die Disk 2h in Wasser und anschließend 2h in Immobilisierungspuffer gelagert.

1. Antikörper (c: 4-5mg/mL) in 1-1,5mL Natriumcarbonatpuffer (50mM, pH 9,3) lösen
2. Immobilisierung erfolgt über 16h bei 30°C in einem kleinen Gefäß
3. Danach wird die Disk zum Waschen 8h bei +4°C in PBS gelegt
4. Die Menge abreagierter Antikörper wird durch eine Differenzmessung mittels BCA-Test festgestellt.
5. Nach der Immobilisierung wird die Disk bei +4°C in PBS gelagert

7.5.3.2 Schematischer Aufbau der chromatographischen Anlage

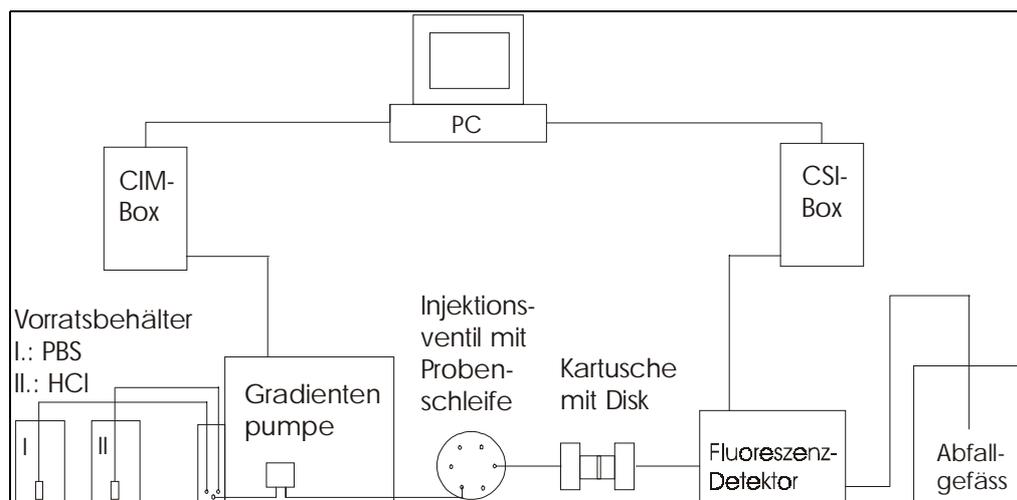


Abb. 7.26, Aufbau der verwendeten chromatographischen Anlage zur Disk-Chromatographie

Verwendete Geräte:

- IBM-kompatibler 486er PC
- CIM-Box zur Gradientenformung (Autochrom Ind., USA)
- CSI-Box zur Datenaufnahme (Autochrom Ind., USA)
- Gradientenpumpe (TechLab L4100, Erkerode)
- Injektionsventil mit 1000 μ L Probenschleife (Knauer, Berlin)
- Kartusche mit CIM-Disk (BIA.doo, Ljubliana, Slowenien)
- Fluoreszenzdetektor (Shimadzu Fluorescence HPLC-Monitor RF-535, Shimadzu, Japan)

7.6 RP-HPLC

7.6.1 Huminsäure-Konzentrationen

Tabelle 27, Huminsäure-Standardlösungen

<i>Huminsäure O</i>	Analyt in dest. Wasser
<i>Huminsäure I</i>	Analyt in Lösung mit 1 mg/L Huminsäure
<i>Huminsäure II</i>	Analyt in Lösung mit 10 mg/L Huminsäure
<i>Huminsäure III</i>	Analyt in Lösung mit 100 mg/L Huminsäure

7.6.2 Probenvorbereitung

0,5g Quarzsand mit unterschiedlichem Huminsäuregehalt dotiert, wird mit 50 μ L BSA-Standards (4mg/mL) versetzt.

Danach werden 950 μ L des entsprechenden Puffers zugegeben, so dass die BSA-Konzentration 200 μ g/mL beträgt.

7.6.3 Eingesetzte Detergenzien

Triton X-100

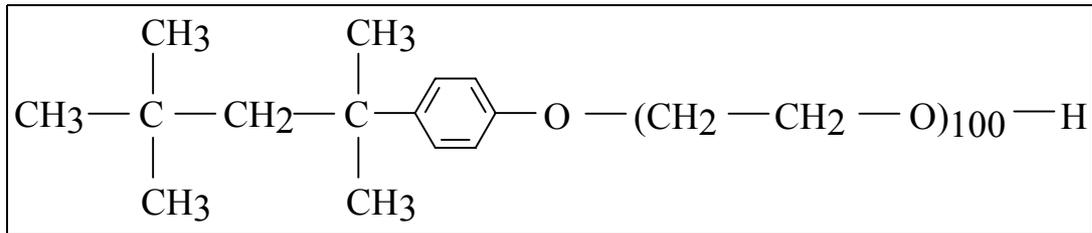


Abb. 7.27, Polyoxyethylen-*p-t*-octyl-phenol (Triton X-100)

Na-dodecylsulfat

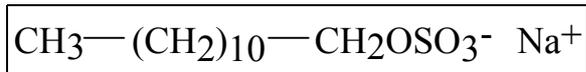


Abb. 7.28, Natriumdodecylsulfat (SDS)

7.6.4 Bodenparameter, Speyer

Tabelle 28, Bodenparameter

Bodenparameter

Organischer C-Anteil in %	2,19 % ± 0,08
Korngrößenverteilung	Gesiebt, 2mm Maschenweite
<0,002 mm	6,7 %
0,002 – 0,063 mm	15,4 %
0,063 – 2,0 mm	78,1 %
Bodenart	Lösboden, Oberboden aus 20-30 cm Tiefe

(Analysebefund der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt (LUFÄ), Speyer v. 21.06.1999)

7.7 Abkürzungsverzeichnis

1°	Primär
2°	sekundär
2D	2-dimensional
A	Adenosin
AB	Antikörper
AB*	HRP-gelabelter Antikörper
Abb	Abbildung
ACh	Acetylcholin
ACN	Acetonitril
AG	Antigen
BCA	Bichinchoninsäure
BotTX	Botulinustoxin
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
BTWC	Bacteriological- and Toxin Weapon Convention
BW	Biologische Waffen
C	Cytidin
c	Konzentration
c ₀	Anfangskonzentration
C-18	n-Octadecyl
C-4	n-Octyl
C-8	n-Butyl
<i>Cl</i>	<i>Clostridium</i>
CO ₃	Carbonat
Cu	Kupfer
CW	Chemische Waffen
CWÜ	Chemiewaffen-Übereinkommen
Da	Dalton
DD	Dried-Droplet
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosid-Triphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> Bakterium

ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ES	Einzelspektren
Fa	Firma
FKS	Fetales Kälberserum
fmol	femto molar
G	Guanosin
GABA	γ -Aminobuttersäure
GMA-EDMA	Glycidylmethacrylat-coethylendimethacrylat
h	Stunde
H	Schwere (Kette)
H+L	Schwere und leichte (Kette)
HCO ₃	Hydrogencarbonat
HIC	Hydrophobic
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HPMADC	High Performance Monolithic Affinity Disk Chromatography
HRP	Meerrettichperoxidase
HS	Huminsäure
iE	internationale Einheiten
IEX	Ionenaustauschchromatographie
i-PrOH	Isopropanol
I-Puffer	Immobilisierungspuffer
I-Zeiten	Immobilisierungszeiten
<i>k</i>	Retentionsfaktor
kDa	Kilo Dalton
krpm	* 1000 Umdrehungen / Minute
L	leichte (Kette)
λ	Wellenlänge
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
MALDI	Matrix unterstützte Laser induzierte Desorption/Ionisation
min	Minute
Mio	Millionen
mM	milli molar
$\mu\text{g/mL}$	Mikrogramm pro Milliliter
μM	mikro molar

MS	Massenspektrometrie
MWCO	Molecular weight cut-off
NWG	Nachweisgrenze
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PC	Personalcomputer
PCR	Polymerase Kettenreaktion
ppm	part per million
PS	Polystyrol
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RP	Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-dodecylsulfat
SEC	Größenausschlusschromatographie
SNAP-25	synaptosomal associated protein 25 kDa
SU	Sowjetunion
T	Thymidin
t_0	Totzeit
T_a	Anlagerungstemperatur
TAE	Puffer aus Tris, Essigsäure, EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TeTX	Tetanustoxin
TFA	Trifluoressigsäure
T_m	Schmelztemperatur
TMB	3,3',5,5'Tetramethylbenzidin
t_R	Retentionszeit
TW	Toxinwaffen
UNSCOM	United Nations Special Commission
UV	Ultraviolett
VAMP	Vesikel-assoziierten Membranprotein
WFR	Wiederfindungsrate
WinNT	Windows NT

8 Literaturverzeichnis

- ¹ Zitiert nach: Der Spiegel Nr. 28/1998, „Cocktail des Horrors“
- ² Förger, Die Welt.de, online in Internet: www.welt.de/daten/2000/05/09/0509ws166791.htx [05.03.2002]; Neue Zürcher Zeitung online, online in Internet: <http://www.nzz.ch/dossiers/2001/b-waffen/2002.01.05-al-article7SC7Z.html> [05.03.2002]
- ³ Bundesanzeiger JG 47, Nr. 159a, v. 24.08.1995, 5. überarbeitete Auflage
- ⁴ Sterk, Die Armee im Einsatz: Schutz und Sicherheit der Soldaten im Einsatz – eine neue Herausforderung; Vortrag beim Forum der Studiengesellschaft der DWT zum Thema: ABC-Abwehr und Schutzaufgaben, Bad Godesberg, 13.-15.02.2001
- ⁵ Pearson; Prospects for chemical and biological arms control: The web of deterrence, in: The Washington Quarterly, Vol. 16, no. 2, Spring 1993
- ⁶ Geissler Hrsg., Chemical and Biological Warfare Studies, Bd 15, SIPRI, Stockholm, 1994
- ⁷ Spiers, Chemical and biological weapons: A study of proliferation, McMillan, Hampshire, 1991
- ⁸ Harper & Row, Microbiology, 3. Auflage, Philadelphia, PA, 1980
- ⁹ Geissler & Woodall Hrsg., SIPRI, Chemical and Biological Warfare Studies, Bd 18, Stockholm, 1999
- ¹⁰ Carter & Pearson, British biological warfare and biological defence, 1925-45 in: SIPRI, Chemical and Biological Warfare Studies, Bd 18, Stockholm, 1999
- ¹¹ Butler, UN Special Commission Report, New York, NY, 25.01.1999
- ¹² Förger, Die Welt.de, online in Internet: www.welt.de/daten/2000/05/09/0509ws166791.htx [05.04.2002]
- ¹³ Alibek, Biohazard, Random House, London, 1999
- ¹⁴ FAO, A Briefing Book on Biological Weapons, Defense Technology Objectives of the JWSTP and DTAP, 1997
- ¹⁵ SIPRI, Chemical and Biological Warfare Studies, Bd 15, Stockholm, 1994
- ¹⁶ WHO, 1970; Health Aspects of Chemical and Biological Weapons; Genf, WHO
- ¹⁷ Geissler, SIPRI, Biological and Toxin Weapons today, Oxford, 1986
- ¹⁸ Madigan et. Al. Brock Biology of Microorganisms, Prentice Hall Int. Inc., NJ, 2000
- ¹⁹ Geissler, SIPRI, 1986
- ²⁰ Geissler, SIPRI, 1986
- ²¹ Geissler, SIPRI, 1986

-
- ²² Hauschild, Die Proliferation von Massenvernichtungswaffen, AIK-Texte 3/99, Akademie der Bundeswehr für Information und Kommunikation, Strausberg, 1999
- ²³ Murakami, Underground. The Tokyo Gas Attack and the Japanese Psyche, Vintage Books, 2001
- ²⁴ Alibek, 1999
- ²⁵ Geissler, SIPRI, 1986
- ²⁶ Moore, Hrsg., Handbook of Botulinum Toxin treatment, Blackwell Science, Oxford, 1995
- ²⁷ Hase & Finkelstein, 1993, Microbiol Rev, **57**: 823-838
- ²⁸ Montecucco & Schiavo, 1994, microreview: Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins in: Mol Microbiol, **13** (1), 1-8
- ²⁹ Niemann, Molecular biology of clostridial neurotoxins in: „A sourcebook of bacterial protein toxins“, Hrsg Alouf, Academic Press, London, 1991
- ³⁰ Franz et al., Efficacy of prophylactic and therapeutic administration of antitoxin for inhalation botulism, in: Das Gupta, Hrsg., Botulinum and tetanus neurotoxins: neurotransmission and biomedical aspects, Plenum, New York, NY, 1993
- ³¹ Niemann, Molecular biology of clostridial neurotoxins, in: Alouf & Freer, Hrsg., Sourcebook of bacterial protein toxins, Academic Press, London, 1991
- ³² De Paiva, et al., A role for the interchain disulfide or its participating thiols in the internalization of BoNT A revealed by a toxin derivative that binds to ecto-acceptors and inhibits transmitter release intracellularly, J Biol Chem., 1993, **268**, 20838-20844
- ³³ Luisto, Unusual and vitrogenic sources of tetanus, Ann Chir Gynaec Fenn, 1993, **82**, 25-29
- ³⁴ Bachmann, et al., Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1994
- ³⁵ Bizzini, Tetanus, in: Germanier, Hrsg., Bacterial Vaccines, Academic Press, Inc, 1984
- ³⁶ Werner, Food poisoning in: Public Health and Preventive Medicine, Hrsg: Last & Wallace, 13. Aufl., Appleton & Lange, San Mateo, CA, 1992
- ³⁷ Arnon, Botulism as an intestinal toxemia, in: Blaser, et.al. (Hrsg), Infection of the gastrointestinal tract, 1995, Raven Press, New York, NY
- ³⁸ Minton, Molecular genetics of clostridial neurotoxins, Curr Top Microbiol Immunol, 1995, **195**, S. 161-194
- ³⁹ Wictome & Shone, Botulinum neurotoxins: mode of action and detection, J. Appl Microbiol Symposium Supp, 1998, **84**, 87S-97S
- ⁴⁰ Moore, ed. Handbook of botulinum toxin. Oxford: Blackwell Science, 1995

-
- ⁴¹ Final Report on Task 96-45, Evaluation of the passive protection against five serotypes of BoNT provided by botulinum human immune globulin in animal model, Joint Program Office for Biological Defense, U.S.A., July 1998
- ⁴² Dierstein, Moderne Verfahren der B-Abwehr, Vortrag beim Forum der Studiengesellschaft der DWT zum Thema: ABC-Abwehr und Schutzaufgaben, Bad Godesberg, 13.-15.02.2001
- ⁴³ Stevansson, Humus Chemistry, New York, NY, 1982
- ⁴⁴ Danneberg und Schaffer, Kompostuntersuchungen mit chromatographischer Unterscheidung von Humin- und Nicht-Huminstoffen, VDLUFA Kongressband, 1984
- ⁴⁵ Stevansson, Humus Chemistry, 1982, New York, NY
- ⁴⁶ Schröder, Bodenkunde in Stichworten, 5. Auflage, Unterägeri, Schweiz, 1993
- ⁴⁷ Thurmann in: Organic Geochemistry of natural waters, ed. by Nijhof, Jank, Dordrecht, 1985
- ⁴⁸ Kumada, Chemistry of soil organic matter, Amsterdam, 1987
- ⁴⁹ Scheffer & Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, 13. Auflage, Stuttgart, 1992
- ⁵⁰ Humic acid research group, Northeastern University, online in Internet:
<http://www.hagroup.neu.edu/haSEM.htm>, [05.03.2002]
- ⁵¹ Wandruszka, The role of selected cations in the formation of pseudomicelles in aqueous humic acid, *Talanta*, **44**: 805-809, 1997
- ⁵² Stryer, Biochemie, 4. Auflage, Spektrum Verlag, Heidelberg, 1995
- ⁵³ FASEB J., **10**, 27-34, 1996
- ⁵⁴ Lottspeich, Bioanalytik, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, 1998
- ⁵⁵ Wolfbeis, The fluorescence of organic natural products in: Schulman, Molecular luminescence spectroscopy methods and applications-part I, Wiley, New York, NY, 1985
- ⁵⁶ Smith et.al., Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 1985
- ⁵⁷ Friedenauer et al., Sensitivity and variability of the Bradford protein assay in the presence of detergents, *Anal. Biochem.* 1989, 178, 263-268
- ⁵⁸ Wolfbeis, 1985
- ⁵⁹ Wedler, Lehrbuch der physikalischen Chemie, 3. Auflage, VCh, Weinheim, 1987
- ⁶⁰ Slavik, Fluorescent Probes in cellular and molecular biology, CRC-Press, 1994
- ⁶¹ Marose, Bioprozeßanalytik mit 2D-Fluoreszenzspektroskopie, Dissertation, Fachbereich Chemie, Universität Hannover, 1999
- ⁶² Schwedt, Taschenatlas der Analytik, Thieme, 1992

-
- ⁶³ Karas et. al., Influence of the wavelength in high irradiance uv-laser desorption mass spectrometry of organic molecules, *Anal. Chem.*, **57**, 1985, 2935
- ⁶⁴ Strupat, Matrix unterstützte Laserdesorptions-/ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) von Proteinen immobilisiert auf Festkörperoberflächen, Dissertation, Fachbereich Physik, Universität Münster, 1995
- ⁶⁵ Strupat, 1995
- ⁶⁶ Bahr, Karras, Hillenkamp, Analysis of biopolymers by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI) mass spectrometry (1994), *Fresenius, J. Anal. Chem.* 384, 783-791
- ⁶⁷ Vorm et al., Improved resolution and very high sensitivity in MALDI-TOF of matrix surfaces made by fast evaporation, 1994, *Anal. Chem.* **66**, 3281-3287
- ⁶⁸ Eberle & Schweer, Bestimmung von Huminsäure und Ligninsulfosäure im Wasser durch Flüssig-Flüssigextraktion, *Vom Wasser*, 41, 1973
- ⁶⁹ Bilozor, The constants of fulvic and humic acids in natural waters and the effectiveness of haloform reaction, Tagungsmaterial der 3. Konferenz für Wassergüte und Wassertechnologie der ungarischen hydrologischen Gesellschaft, Budapest, 1979, zitiert in: *Wasserbehandlung durch Flockungsprozesse*, Walter & Winkler, Akademie Verlag, Berlin, 1981
- ⁷⁰ Ziechmann, Huminstoffe und ihre Wirkungen, Spektrumverlag, Heidelberg, 1996, S. 45
- ⁷¹ Li et al., Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells, *Nature*, 1988, **335**: 414-417
- ⁷² Tebbe & Vahjen, Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and yeast, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 1993, 1070 – 1074
- ⁷³ Tsai & Olson, Detection of low numbers of bacterial cells in soil and sediments by polymerase chain reaction, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 1992, 2292-2295
- ⁷⁴ Alm & Stahl, Extraction of microbial DNA from aquatic sediments, in: Akkermans, van Elsas, de Bruijn (Hrsg.), *Molecular microbial ecology manual 1.1.5*. Kluwer, Dordrecht, 1996
- ⁷⁵ Madigan, *Brock biology of microorganisms*, Prentice-Hall Inc., Upper Saddle River, NJ, 8.Auflage, 1997
- ⁷⁶ Madigan, 1997
- ⁷⁷ DSMZ, online in Internet: <http://www.dsmz.de/strains/no000092.htm> [05.03.2002]

-
- ⁷⁸ DSMZ, online in Internet <http://www.dsmz.de/media/med014.htm>,
<http://www.dsmz.de/media/med027.htm> [05.03.2002]
- ⁷⁹ Maidak et. al., A new version of the RD (Ribosomal Database Project) Nucleic Acids Res., 1999, **27**: 171-173
- ⁸⁰ Produktbeschreibung zur AGSGold™ DNA Polymerase der Hybaid GmbH, 2000
- ⁸¹ NCBI, online in Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [05.03.2002]
- ⁸² Rozen & Skaletsky, Whitehead Institute Center for Genome Research, Online in Internet: http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html [05.03.2002]
- ⁸³ Müller, PCR-Polymerase-Kettenreaktion, Heidelberg Spektrum, Akad. Verlag, 2001
- ⁸⁴ Wilson, Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification, Appl. Environ. Microbiol., 1997, **63**: 3741-3751
- ⁸⁵ Bilozor, The constants of fulvic and humic acids in natural waters and the effectiveness of haloform reaction (1979), Tagungsmaterial der 3. Konferenz für Wassergüte und Wassertechnologie der ungarischen hydrologischen Gesellschaft, Budapest, Zit. In: Wasserbehandlung durch Flockungsprozesse, Walter, H.J. Akademie Verlag, Berlin, 1981
- ⁸⁶ Tipping, The adsorption of aquatic humic substances by iron oxides (1981), Geochim. Cosmochim. Acta, **45**: 191-199
- ⁸⁷ McGregor et al., Simultaneous detection of microorganisms in soil suspension based on PCR amplification of bacterial 16S rRNA fragments, Biotechniques, 1996, **21**: 463-471
- ⁸⁸ Pflug, Über die Hemmung der Aminopeptidase K durch Huminstoffe, Zeitschrift für Pflanzenern. und Bodenk., 1979, **142**: 290-298
- ⁸⁹ Qiagen, online in Internet: http://www.qiagen.com/resources/info/conversions_for%20nucleic_acids_and_proteins.asp [05.03.2002]
- ⁹⁰ Engvall & Perlmann, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochem., 1971, **8**: 871-873
- ⁹¹ Campbell, Biologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin, 1998
- ⁹² Köhler & Milstein, Nature, 1975, 256, **256**: 495-497
- ⁹³ Peters & Baumgarten (Hrsg), Monoclonal antibodies, Springer Verlag, New York, NY, 1992
- ⁹⁴ Roitt, et. al., Immunology, Gower Medical Publishing, London, 1985
- ⁹⁵ Lottspeich, Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin, 1998
- ⁹⁶ Crowther, ELISA, Theory and Practice, Humana Press, Totowa, N.J., 1995
- ⁹⁷ Crowther, 1995

-
- ⁹⁸ Imagawa, et al., Characteristics and evaluation of antibody- horseradish peroxidase conjugates prepared by using a maleimide compound, glutaraldehyde and periodate. J. Appl. Biochem. 1982, **4**: 41-57
- ⁹⁹ Hugo et al., Sensitive ELISA for quantifying the terminal membrane C5b-9 and fluid-phase SC5b-9 complex of human complement, J. of Imm Meth., 1987, **99**, 243-251
- ¹⁰⁰ NUNC, NUNC Immuno-Stick, online in Internet:
<http://nunc.nalgenunc.com/products/catalog/immunology/Stick.html> [05.03.2002]
- ¹⁰¹ Tennikova, et al., High Performance Monolithic Affinity Disk Chromatography a novel method of protein separation, journal of liquid Chromatogr., 1990, **13**(1) 63-70
- ¹⁰² Kasper, et al., Fast isolation of protein receptors from streptococci G by means of macroporous affinity discs, J. Chr. A, 1998, **798**, 65-72
- ¹⁰³ Josic, et al., Use of compact, porous units with immobilized ligands with high molecular masses in affinity chromatography and enzymatic conversion of substrates with high and low molecular masses, J. Chr. A, 1998, **803**, 61-71
- ¹⁰⁴ Kasper, 1998
- ¹⁰⁵ NUNC-Deutschland persönliche Mitteilung ,23.04.2001
- ¹⁰⁶ Meyer, Praxis der Hochleistungschromatographie, 8. Auflage, Otto Salle Verlag GmbH, Frankfurt/Main, 1998
- ¹⁰⁷ Engelhardt, Chromatographia, 1984, **19**: 77
- ¹⁰⁸ Aced & Möckel, Liquidchromatographie, VCH, Weinheim, 1991
- ¹⁰⁹ LaChrom HPLC Instruments, online in Internet:
<http://www.merck.de/english/services/chromatographie/lachrom/lachrom.htm> [05.03.2002]
- ¹¹⁰ D-7000 HPLC System Manager, online in Internet:
http://www.merck.de/english/services/chromatographie/lachrom/d7000_0.htm [05.03.2002]
- ¹¹¹ Die neue Säuleninnovation, online in Internet:
http://www.merckeurolab.ch/news/chromnews/chromnews_1_01/deutsch/saeuleninnovation.htm [05.03.2002]
- ¹¹² Meyer, 1998
- ¹¹³ Meyer, 1998
- ¹¹⁴ Stryer, Biochemie, 4.Auflage, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, 1996
- ¹¹⁵ Voet, Biochemie, 1. Nachdruck, 1. Auflage, VCH, Weinheim, 1994
- ¹¹⁶ Voet, 1994

-
- ¹¹⁷Wheelis, Biological Warfare before 1914 in: SIPRI, Chemical and Biological Warfare Studies, Bd 18, Stockholm, 1999
- ¹¹⁸SIPRI Yearbook 1994 Stockholm, 1994
- ¹¹⁹Geissler, 1986
- ¹²⁰SIPRI fact sheet, IRAQ, The UNSCOM Experience, SIPRI, Stockholm, April 2000; siehe auch: <http://editors.sipri.se/pubs/Factsheet/unscom.html> [05.03.2002], <http://www.janes.com/defence/features/iraq/sentmilitary.html> [05.03.2002], <http://www.un.org/Depts/unscom/achievement.htm> [05.03.2002]
- ¹²¹Lange, et al., Elicitor induced spuce stress lignin: Structural similarity to early developmental lignins, *Plant Pysiol.*, **108**, 1277-1287 (1995)
- ¹²²Sigma-Aldrich, Biochemikalien und Reagenzien, 1999
- ¹²³Müller, PCR-Polymerase-Kettenreaktion, Heidelberg Spektrum, Akad. Verlag, 2001
- ¹²⁴Beipackzettel Tetanusserum, Zul.-Nr.: A 258/79, von WDT, Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, Serumwerk Memsen, 27138 Hoyerhagen
- ¹²⁵Imagawa, et al. (1982). Characteristics and evaluation of antibody- horseradish peroxidase conjugates prepared by using a maleimide compound, glutaraldehyde and periodate, *J. Appl. Biochem.* **4**, 41-57