

**Multi-Analyt-Bestimmung von endokrinen Disruptoren im  
Wasser mit Hilfe eines Fluoreszenz-Immunoassays unter  
Verwendung von neuronalen Netzen**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2003

vorgelegt von

**Sabine Reder**

Tag der mündlichen Prüfung:	31.01.2003
Dekan:	Prof. Dr. H. Probst
Erster Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Gauglitz
Zweiter Berichterstatter:	Prof. Dr. V. Hoffmann

## ***Danksagung***

Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz danke ich für das interessante Thema, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und das große Vertrauen, das er mir entgegenbrachte, sowie die Möglichkeit an vielen internationalen Tagungen und Workshops teilzunehmen.

Bei Herrn Prof. Dr. Volker Hoffmann möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats bedanken.

Mein Dank gilt Herrn Dipl. chem. Frank Dieterle für die unzähligen Rechnungen mit neuronalen Netzen und die vielen hilfreichen Diskussionen und Anregungen, die entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Diese Zusammenarbeit war eine beispielhafte Kooperation im Bereich der Analyse und der Chemometrie.

Herrn Dipl. math. Michael Kumpf danke ich für die Modellrechnungen und die hervorragende Zusammenarbeit.

Allen Kollegen der Bio- und der Chemogruppe danke ich für das ausgesprochen gute Arbeitsklima, ihre stete Hilfsbereitschaft und die fruchtbaren Diskussionen, wissenschaftlich wie privat. Insbesondere bei Herrn Dipl. bio. tech. Günther Proll möchte ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit bedanken.

Im Rahmen der EU-Projekte SANDRINE und AWACSS möchte ich mich bei allen Projektpartnern bedanken, insbesondere bei Herrn Dr. Michael Steinwand und Frau Dr. Simone Günther von Applied Biosystems, Herrn Dr. Frank Sacher und Herrn Dr. Jan Stien vom TZW Karlsruhe, Frau Dr. Elena Mallat und Frau Sara Rodriguez aus dem Arbeitskreis von Herrn Dr. Damia Barcelo in Spanien sowie bei Frau Isabel Schaupt aus dem Arbeitskreis Herrn Dr. Weller in München für die angenehme und konstruktive Zusammenarbeit.

Der DFG danke ich für die Teilnahme und das Stipendium im Graduiertenkolleg „Analytische Chemie“ an der Universität Tübingen.

Mein Dank gilt auch meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich immer wieder ermutigt haben, auch schwierige Aufgaben anzupacken und zu meistern. Schließlich danke ich allen, die mir privat zur Seite standen, und ein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Sven für seine Geduld und sein Verständnis für meine Arbeit.



---

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
2. Theorie.....	8
2.1. Optische Grundlagen von TIRF .....	8
2.1.1. Totalreflexion und evaneszentes Feld .....	8
2.1.2. Fluoreszenz.....	13
2.2. Molekulare Erkennungsreaktion mit Antikörpern .....	15
2.2.1. Antikörper .....	15
2.2.2. Immunoassay.....	17
2.2.3. Affinitätskonstante .....	19
2.2.4. Kreuzreaktivität.....	21
2.2.5. Kinetik.....	23
2.3. Microcystin.....	26
3. Material und Methoden .....	29
3.1. Analyte und Antikörper.....	29
3.2. Verbrauchsmaterial und Puffer .....	31
3.3. Geräte .....	33
3.4. Methoden.....	35
3.4.1. Oberflächenchemie und Fluoreszenzmarkierung.....	35
3.4.2. TIRF mit RIANA Gerät .....	37
3.4.3. RfS .....	40
3.5. Datenauswertung bei Einzelanalyt-Kalibrierungen .....	41
3.6. Datenauswertung mit ANN.....	42
4. Ergebnisse und Diskussion.....	45
4.1. Charakterisierung für den Estrogen-Assay und Bisphenol A-Assay: .....	45
4.1.1. Bindungskapazität .....	45
4.1.2. Kinetik.....	47
4.1.3. Affinitätskonstante .....	49
4.1.4. Kreuzreaktivität.....	51
4.1.5. Stabilität der Antikörper unter Laborbedingungen und im Abwasser .....	60
4.1.6. Oberflächenstabilität .....	63
4.2. Einzelanalyt-Kalibrierungen von Estrogenen und Bisphenol A .....	67

---

4.2.1.	Kalibrierung .....	67
4.2.2.	Realproben .....	69
4.3.	Multi-Analyt-Kalibrierungen von Estrogenen und Bisphenol A .....	77
4.3.1.	Binäre Mischungen .....	77
4.3.2.	Ternäre Mischungen.....	92
4.4.	Multi-Analyt-Kalibrierungen mit Triazinen.....	98
4.5.	Exkurs: Microcystin .....	103
5.	Zusammenfassung und Ausblick .....	107
6.	Literaturverzeichnis.....	111
7.	Anhang .....	119
7.1.	Publikationen.....	119
7.2.	Akademische Lehrer .....	120
7.3.	Lebenslauf.....	121

## 1. Einleitung

### *Endokrin wirksame Substanzen*

In den letzten fünfzehn Jahren wurde nicht nur die Wissenschaft, sondern auch die Weltöffentlichkeit auf die Gefahren von endokrinen Substanzen (endocrine disrupting chemicals EDC) in unserer Umwelt aufmerksam. Insbesondere durch die Studien über die rückläufige Population der Alligatoren in Florida auf Grund von Gonadendeformationen wurden weltweit Forschungen bezüglich der Wirkungsweise, Auftreten, Screening, Analyse und Eindämmung von EDCs gefördert (Kavlock et al. 1996).

Als endokrine Disruptoren definieren sich exogene Substanzen, die natürliche, endogene Hormone in ihrer Wirkungsweise nachahmen bzw. hindern, oder die Synthese bzw. den Metabolismus dieser Hormone oder deren Hormonrezeptoren stören (Sonnenschein et al. 1998). Sie sind ubiquitär, aber ihre Wirkung auf den Menschen ist umstritten. Das Hauptaugenmerk liegt auf der Untersuchung von Oberflächengewässern und des Trinkwassers, allerdings sind die EDCs genauso in Lebensmitteln und Getränken zu finden, zum Teil sogar in sehr viel höheren Konzentrationen (Biles et al. 1997; Gavalier, 1998). Die Estrogene können in vier Klassen unterteilt werden. Zu den endogenen Estrogenen gehören z.B. Estradiol, Estron und Estriol, zu den Phytoestrogenen z.B. Genistein und Coumestrol, zu den synthetischen Estrogenen bzw. Antiestrogenen z.B. Ethinylestradiol und Tamoxifen und schließlich zu den Xenoestrogenen z.B. Bisphenol A, Nonylphenol, DDT und auch die Triazine. Xenoestrogene haben die schwächste Wirkung auf den Hormonhaushalt des Körpers (Körner et al. 1998), sind jedoch in Oberflächengewässern und Kläranlagen in Konzentrationen zu finden, die um den Faktor 10 bis 1000 höher sind als die Konzentrationen der natürlichen und synthetischen Estrogene (Shore et al. 1993; Larsson et al. 1999; Snyder et al. 2001; Fukazawa et al. 2002). Ihre estrogenische Wirkung wurde erst nach der Einbringung in die Natur entdeckt, da ihr originärer Zweck in keinem Zusammenhang mit dieser Eigenschaft steht. So stellt z.B. Bisphenol A ein Monomer des Carbonatplastiks dar, welches durch Erhitzen aus dem Plastik herausgelöst wird (Biles et al. 1997). Das inzwischen verbotene Pestizid DDT und auch das global verbreitete Pestizid Atrazin bzw. ihre Metabolite zeigen estrogenische Wirkung (Bitman et al. 1970; Hayes et al. 2002).

### *Studien über den Einfluss von EDCs auf Tier und Mensch*

Bereits im Jahre 1947 wurde bei 80% der Weißkopfadler eine Sterilität festgestellt, die mit einer hohen Anreicherung von DDT und anderen organischen chlorierten Kohlenwasserstoffen im Gewebe einherging (Broley, 1952). In den fünfziger Jahren wurde in Feldstudien bei den in den industriellen Gebieten Mitteleuropas beheimateten Fischottern ein Zusammenhang zwischen EDCs und dem drastischen Rückgang der Populationen gefunden. In diesem Fall handelte es sich um hohe Konzentrationen an PCB und Dieldrin. (Mason et al. 1986). In den frühen siebziger Jahren wurde in Kalifornien das veränderte Sozialverhalten bei Westernmöwen in Zusammenhang mit dem Pestizid DDT gebracht. Weibliche Vögel bildeten Brutpaare, da die Männchen ihren Paarungsinstinkt verloren hatten (Hunt et al. 1977; Fry et al. 1987). Weiterhin berichten Gilbertson et al. (1991) über Anomalien bezüglich der Embryonalentwicklung von Silbermöwen in den siebziger Jahren an den Großen Seen im Noreden der USA. Die hormonelle Störung war vergleichbar mit durch Dioxine verursachten Störungen. Zwischen 1980 und 1984 wurde eine Abnahme der Alligatorpopulation durch Fortpflanzungsstörungen am Apopka-See in Florida beobachtet, verursacht durch einen Chemieunfall mit Dicofol (Woodward et al. 1993). Es wurden männliche Alligatoren gefunden, deren Geschlechtsteile stark unterentwickelt waren. Die hieraus resultierende Unfruchtbarkeit führte zu einer Abnahme der Alligatorpopulation um 90 % (Guillette, 1994). Gimeno et al. (1996) haben die Verweiblichung von männlichen Karpfen bei Fütterung von EDCs untersucht. Nach spätestens 60 Tagen hatten alle Karpfen Eileiter ausgebildet, und die Spermatogenese war stark eingeschränkt.

In der Natur sind bereits viele Auswirkungen im Zusammenhang mit EDCs belegt. Die Auswirkungen auf den Menschen aber werden kontrovers diskutiert, da andere Faktoren, z.B. Stress, ähnliche Symptome hervorrufen. Die Statistiken über die Verringerung der Spermienqualität in den letzten 50 Jahren (Carlsen et al. 1992), vermehrter Hodenhochstand, Tendenzen zu einer steigenden Hodenkrebsrate bei Männern und Brustkrebsrate bei Frauen (Toppari et al. 1996) in Zusammenhang mit EDCs in der Umwelt sind sehr umstritten.

### *Entwicklungen zur Bestimmung der Estrogenität*

Die Methoden zur Bestimmung der Estrogenität stehen meist in Relation zur Wirkung auf den Estrogenrezeptor (ER), wobei die *in vivo*-Verfahren alle Effekte auf den Körper beinhalten, wie z.B. Uterus-Untersuchungen von sterilisierten Ratten und Mäusen und Vitelloginin-Produktion bei männlichen Fischen (Korach et al. 1995). Die *in vitro*-Assays betrachten die Wir-



kung auf ganze Zellen (Yeast-Screen, E-Screen) oder nur auf den Rezeptor (ELRA). Diese Assays werden für das Screening eingesetzt, aber auch auf die Verwendbarkeit für quantitative Bestimmungen hin geprüft. Beim Yeast-Screen wird aus genveränderter Hefe durch Zusatz von endokrinen Stoffen als Aktivierungsreagenz der humane ER exprimiert. Mit Fusionsproteinen wird in diesem Prozess z. B. ein Enzym gebildet, das ein Substrat zu einem farbigen Produkt umsetzt (Rehmann et al. 1999). Die Nachweisgrenze beträgt für Estradiol 0.2 µg/l und für Bisphenol A 300 µg/l. Der Assay dauert vier Tage und reagiert sensibel auf toxische Substanzen mit zellpathogener Wirkung. Beim E-Screen werden estrogen-sensitive MCF-7 Mammakarzinomzellen verwendet. Diese vermehren sich nicht, sofern sie in einem estrogenfreien Medium gehalten werden. Durch Auszählen der Zellen nach 4 bis 6 Tagen Exposition mit EDCs kann der estrogenische Effekt auf diese Zellen ermittelt werden (Soto et al. 1995). Einen zellfreien Assay stellt der Enzyme-linked receptor assay (ELRA) dar, der ähnlich wie ein ELISA (Enzyme-linked immuno sorbent assay) aufgebaut ist. Anstatt auf Antikörpern basiert er auf Estrogenrezeptoren (Seifert et al. 1999). Die Nachweisgrenze für Estradiol liegt bei 0.1 µg/l. Mit den verschiedenen Assays wurde in vielen Fällen eine abweichende Estrogenität für gleiche Substanzen detektiert.

#### *Analytik-Methoden zur Quantifizierung von EDCs*

Für die Standardanalytik-Methoden ist zunächst eine Aufreinigung der Proben und die Konzentration zum Teil um den Faktor 1000 über Festphasenkartuschen notwendig. Im Anschluss sind sie z.B. mit HPLC-MS-Messungen detektierbar (Petrovics et al. 2002). Diese Methoden sind temporal, personell und finanziell sehr aufwendig und für Vor-Ort-Messungen wenig geeignet. Mit einer schnell fortschreitenden analytischen Technologie, den Immunoassays, werden diese Nachteile behoben. So stellen Immunoassays einen hochsensitiven Nachweis dar, durch den z.B. im Wasser Analytkonzentrationen bereits in Mengen von wenigen ppt (parts per trillion) gemessen werden können. Für die Durchführung wird eine weniger komplexe Ausrüstung benötigt. Dabei sind sie schnell durchzuführen und kostengünstig. Bereits seit 1959 werden Immunoassays verwendet (Price et al. 1997). Das Anwendungsspektrum ist breit gefächert, wobei der Routinegebrauch in Diagnostik und Pharmaforschung den Hauptteil ausmacht. In der Umweltanalytik haben sie sich bisher noch nicht durchsetzen können (Weetall, 1999), obwohl insbesondere im Bereich der Pestizide eine umfangreiche Auswahl an ELISA (Meulenberg et al. 1999) und ähnlichen Immunoassays vorhanden ist (Schobel et al. 2000). Gerade in diesem Bereich sind sie besonders leistungsstark, liegen doch die europäischen Grenzwerte für Pestizide im Trinkwasser bei 0.1 ppb für

einzelne Pestizide und bei 0.5 ppb für die Summe an Pestiziden (EU Direktive von 1980 und 1998). Diese Konzentrationen sind mit Immunoassays ohne Probenkonzentrierung problemlos detektierbar.

ELISA sind zwar für Feldexperimente einsetzbar, aber nicht ohne weiteres vollständig automatisierbar. Eine andere, vielversprechende Technologie sind Biosensoren, die in Kombination mit Fließinjektionssystemen (FIA) arbeiten. Bei dieser Technik ist die Probenhandhabung vollständig automatisiert und direkt mit der Detektion gekoppelt. Für die Detektion kann z.B. ein Fluoreszenzmarker genutzt werden, der mit TIRF (total internal reflection fluorescence) angeregt wird. Eine entsprechende Automatisierung ermöglicht die Einrichtung unüberwachter Messstellen, an denen in regelmäßigen Abständen Proben genommen werden, um so z.B. die kontinuierliche Überwachung von Trinkwasser zu gewährleisten.

#### *Entwicklungen im Bereich der TIRF-Biosensoren*

Verschiedene Aufbauten von TIRF-Geräten für biologische Anwendungen sind bereits publiziert worden. Unterschiede liegen hierbei in der mono-analytischen bzw. multi-analytischen Verwendung.

Der Biosensor von Abel et al. (1996) zählt zu den Einzelanalyt-Methoden und beruht auf der Anregung über eine optische Faser und wurde für den Nachweis von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden verwendet. Der Biosensor besteht aus einer Quarzfaser mit einem Durchmesser von 1 mm und einer Länge von 65 mm, die in eine Durchflusszelle mit 75 µl Volumen hineinragt. Mit einem Argonionenlaser wird der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein angeregt und die Fluoreszenz mit einem Photomultiplier detektiert. Mit diesem Aufbau war es ihnen möglich, 1.3 pg/ml 16-mer DNA nachzuweisen. Eine weitere Einzelanalyt-Methode haben Schult et al. (1999) vorgestellt. Sie haben einen TIRF-Sensor aufgebaut, der einen Einweg-Chip aus PMMA trägt. Dieser Chip ist auf einem Prisma fixiert, in das Laserlicht mit einer Wellenlänge von 638 nm eingekoppelt wird. Die Leistung des Lasers wird auf 0.06 W/mm<sup>2</sup> beschränkt, damit zeitauflösende Messungen ohne Photobleaching-Effekt durchführbar sind. Das Fluoreszenzlicht, das durch Anregung auf dem Sensorchip erhalten wird, wird durch das Prisma hindurch über ein Linsen- und Filtersystem auf einen Photomultiplier fokussiert. Mit einer automatisierten Fluidik wurde das System des Schwangerschaftshormons Chorionic Gonadotropin (hCG) in Blutserum untersucht und eine Nachweisgrenze von 1 ng/ml hCG erreicht. Eine Weiterentwicklung dieses Sensorsystems wird in Peter et al. (2001) beschrieben. Zwischen dem Linsensystem und dem Photomultiplier wurde ein beweglicher Shutter

eingebaut, der es erlaubt an zwei Spots zu messen. Damit wurde eine Nachweisgrenze für Cy5-markierte 56mer-DNA von 0.21 nmol/l erreicht.

Neben diesen Einzelanalyt-Sensoren wurden auch verschiedene TIRF-Sensoren für den Multi-Analyt-Detektion entwickelt. So z.B. berichten Plowman et al. (1999) von einem integriert optischen Wellenleiter, bei dem das Laserlicht einer Laserdiode mit einer Wellenlänge von 635 nm über ein Gitter in einen monomodigen Wellenleiter mit drei optischen Kanälen eingekoppelt wird. Mit einer CCD-Kamera wird das Fluoreszenzlicht nach vorherigem Filtern durch einen Bandpassfilter detektiert.

Ein bulkoptischer TIRF-Sensor für Multi-Analyt-Messungen wird von Schuderer et al. (2000) präsentiert. Bei diesem Sensor wird eine Laserdiode mit 635 nm direkt oder ein Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm über eine Faser eingekoppelt. Mit einem Linsensystem und Interferenzfiltern wird das Fluoreszenzlicht auf einem Photomultiplier fokussiert. Der Laser wird moduliert und das Fluoreszenzlicht mit Lock-In-Technik ausgelesen. Auf dem Transducer wird eine Flusszelle mit 4 Kanälen über O-Ringe angepresst. Um alle Kanäle auszulesen, wird der Transducer samt Fluidik über einen Schrittmotor verschoben, wobei die Anordnung von Laser und Photomultiplier fixiert bleibt. Der Sensor wird mit Oligonukleotiden beschichtet und fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide können in Konzentrationen von 1 nM detektiert werden.

Zuletzt soll noch ein in Rowe et al. (1999) und Rowe-Taitt et al. (2000) beschriebener Multi-Analyt-TIRF-Sensor vorgestellt werden. Dieser besteht aus einem mit Silber überzogenen Transducer, in den ein aufgeweiteter Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 635 nm eingekoppelt wird. Die Beschichtung verringert die Intensitätsverluste durch Transmission von Laserlicht an den Epoxyklebestellen der 6-Kanal-Flusszelle und dem Transducer. Über ein Linsenarray für 30 Spots wird das Licht auf eine CCD-Kamera fokussiert. Dieser Aufbau wird für die Bestimmung von Bakterien, Viren und Toxinen verwendet. *Bacillus globigii* kann mit  $10^5$  „colony forming units“ pro Milliliter, MS2 Bakteriophagen mit  $10^7$  „plaque forming units“ pro Milliliter und das Staphylococccen-Toxin Enterotoxin B mit 10 ng/ml nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wird ein Gerät verwendet, das innerhalb des von der EU geförderten Projekts RIANA (River Analyser Projekts, Förderkennzeichen: ENV4-CT95-0066) gebaut und speziell für die Wasseranalytik konzipiert wurde. Mit diesem Gerät lassen sich sechs Analyte in einer Wasserprobe gleichzeitig innerhalb von 15 min mit einer automatisierten Fluidik bestimmen (Klotz et al. 1998). Der Detektionsaufbau ist extrem kostengünstig, da

das Gerät mit Photodioden ohne fokussierende Optik ausgestattet ist. Insgesamt ist der Sensor sehr robust, so dass er auch im Rahmen von Feldeinsätzen Verwendung finden kann.

#### *Studien zur Multi-Analyt-Bestimmung unter Berücksichtigung der Kreuzreaktivität*

Eine besondere Problematik bei den Immunoassays stellt die Kreuzreaktivität der Antikörper dar. Ein Antikörper, der spezifisch einen Analyten bindet, kann meist mit geringerer Affinität auch andere strukturell ähnliche Analyten erkennen. Daraus ergeben sich Probleme bei der quantitativen Bestimmung eines einzelnen Analyten, da sämtliche strukturanaloge Analyte das Messergebnis zur Quantifizierung eines einzelnen Analyten beeinflussen. Bereits einige Gruppen haben dieses Problem der Kreuzreaktivität erkannt und entwickelten Auswertemethoden für Multi-Analyt-Assays. Wortberg et al. (1995) benutzen kreuzreaktive Antikörper für Triazine als Screening-Werkzeug, um Klassen von Analyten zu bestimmen. Die Kombination von kreuzreaktiven Antikörpern mit Mustererkennungsalgorithmen wurde von Cheung et al. (1993) und Wortberg et al. (1996) untersucht. Mit dieser Methode ist die simultane Identifizierung von strukturell ähnlichen Molekülen möglich. Bereits zwei Gruppen haben die multivariate Datenanalyse für die gleichzeitige Quantifizierung mehrerer Analyten benutzt. Samsonova et al. (1999) haben einen ELISA entwickelt, der mit mehreren monoklonalen und polyklonalen Antikörpern drei Triazine klassifiziert. Bei der Quantifizierung sind die relativen Fehler jedoch extrem hoch. Bachman et al. (1999 und 2000) entwickelten einen Multi-Elektroden-Biosensor für den Nachweis von Paraoxon und Carbofuran mit einer Nachweisgrenze von 0.5 µg/l. Bei beiden Sensorsystemen handelt es sich um Einweg-Sensoren, die somit nicht automatisiert sind.

#### *Multivariate Auswertemethoden für analytische Probleme*

Komplexe analytische Probleme, wie die Multi-Analyt-Kalibrierung mit kreuzreaktiven Antikörpern, erfordern komplexe Auswertemethoden. Hierzu können die klassischen statistischen Methoden dienen. Für die quantitative Auswertung gibt es z.B. die Multivariate Lineare Regression (MLR), die Hauptkomponentenregression (PCR) und die Partial Least Squares Methode (PLS). Mit mehreren Kalibrierungen wird der Zusammenhang zwischen Konzentration und Sensorsignal errechnet. Allerdings sind diese Methoden durch ihr zugrunde liegendes Modell eingeschränkt. Nichtlineare Zusammenhänge hingegen werden von modellfreien Methoden zutreffender erkannt. Zu diesen Verfahren gehört die künstliche Intelligenz, wobei neuronale Netze für die quantitative Analyse die größte Rolle spielen. Die artificial neural

networks (ANN) ähneln den Nerven des Gehirns und unterliegen keinem physikalischen Modell, so dass sie nicht nur sehr flexibel sind, sondern auch Informationen wie z.B. die Form einer Kalibrierkurve nicht benötigen. Genaue Beschreibung der ANN sind in Zupan et al. (1999), Patterson (1996), Principe et al. (2000) und Kaykin (1999) zu finden.

### *Zielsetzung der Arbeit*

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Assay entwickelt werden, der es ermöglicht, mehrere estrogenen Substanzen im Wasser simultan und in geringsten Konzentrationen mit einem Fluoreszenzbiosensor zu bestimmen. Dazu sollen kreuzreaktive Antikörper verwendet und neuronale Netze für die Auswertung der Daten genutzt werden. Die Automatisierung des Sensorsystems und die Feldtauglichkeit stehen bei der Optimierung des Assays im Vordergrund.

Diese Aufgabenstellung ergab sich aus dem EU-Projekt SANDRINE (Biosensors tracing of endocrine disrupting compounds in waster water and sludge; Fkz: ENV4-CT98-0801). In diesem Projekt wurden verschiedenste Biosensoren entwickelt, um das estrogenen Potential einer Substanz oder Probe zu bestimmen und quantitative Aussagen über die Konzentration dieser Substanzen in Oberflächengewässern, Abwasser und im Klärschlamm zu ermöglichen. Im Mittelpunkt des Projekts stand eine Laborkläranlage, die ein Projektpartner, die Arbeitsgruppe von Prof. Bilitewski an der TU Dresden, betrieb. Diese Anlage sollte die Abbauege und Durchlässigkeiten einer Kläranlage für EDCs simulieren. Die Problemstellung für die Arbeitsgruppe von Prof. Gauglitz in Tübingen bezog sich unter anderem auf den Aufbau eines TIRF-Immunsensors zur quantitativen Bestimmung von Estrogenen.

Aus dieser Aufgabe entstand die Problematik der Einzelbestimmung von Estrogenen, für die nur kreuzreaktive Antikörper zur Verfügung standen. Eine Lösung dieses Problems wird in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt. Dazu wird zunächst das Verhalten der verwendeten Antikörper im Hinblick auf die Bindung an verschiedenen Haptenen bzw. Analyten charakterisiert. Außerdem werden die Eigenschaften der Oberfläche und der Antikörper studiert, die die Lebensdauer des Sensorsystems beeinflussen. Schließlich werden Einzelanalyt-Kalibrierungen für verschiedene endokrine Substanzen auf dem TIRF-Sensor entwickelt, um diese Erfahrungen in den Multi-Analyt-Assay einfließen zu lassen. Der Multi-Analyt-Assay wird zunächst mit binären Systemen aufgebaut und dann auf ternäre Systeme erweitert. Dazu wird auch die Auswertemethode, die neuronalen Netze, optimiert. Die Systeme werden mit Realproben überprüft.

In einem kurzen Exkurs wird noch ein anderes Analytssystem vorgestellt, mit dem der Biosensor als Frühwarnsystem für Blaualgentoxine eingesetzt werden kann.

## 2. Theorie

### 2.1. Optische Grundlagen von TIRF

#### 2.1.1. Totalreflexion und evaneszentes Feld

Die verwendete Methode TIRF (total internal reflection fluorescence) beruht auf der Anregung von Fluoreszenzmolekülen, die sich in einem Feld befinden, welches durch die interne Totalreflexion eines Lichtstrahls in einem Wellenleiter erzeugt wird. Die Entstehung des evaneszenten Felds wird im folgenden erklärt (Pochi 1988).

#### Snelliussches Brechungsgesetz

Das Brechungsgesetz von Snellius (Willebrord Snell, 1580-1626) beschreibt das Verhalten eines Lichtstrahls beim Passieren eines Übergangs von einem optisch dünneren Medium zu einem optisch dichteren.

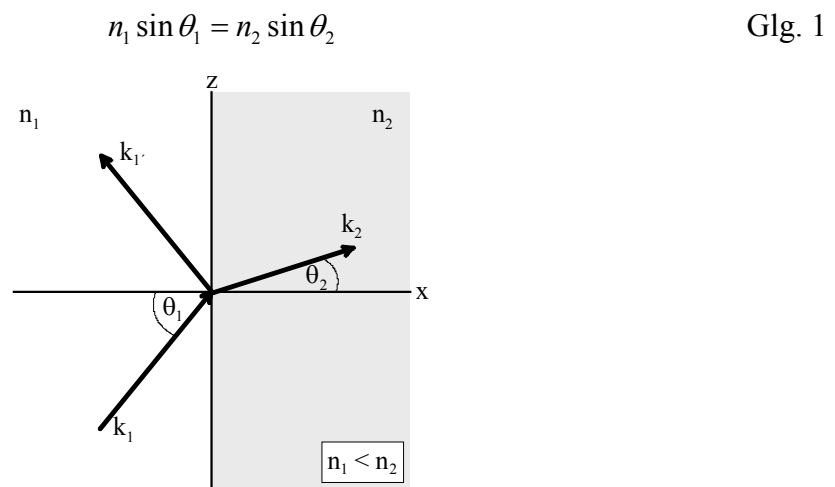


Abb. 1 *Strahlengang eines Lichtstrahls bei Brechung und Reflexion an einer Phasengrenze;  $n$  ist der Brechungsindex des jeweiligen Mediums,  $\theta_1$  ist der Einfallswinkel und  $\theta_2$  der Ausfallswinkel;  $k$  ist der Wellenvektor.*

In Abb. 1 wird das Verhalten des einfallenden Lichtstrahls beim Übergang vom optisch dünneren Medium zum optisch dichteren beschrieben. Der Strahl wird dabei ins optisch dichtere Medium zum Lot hin gebrochen, wenn der Brechungsindex  $n_1$  kleiner als  $n_2$  ist. Befindet sich der einfallende Strahl im optisch dichteren Medium und trifft auf die Phasengrenze zum optisch dünneren Medium, so wird er vom Lot weg gebrochen. Ein

Grenzwinkel  $\theta_{\text{grenz}}$  wird erreicht, wenn  $\theta_2 = 90^\circ$  ist. Bei größeren Einfallswinkeln wird der Strahl innerhalb des dichteren Medium total reflektiert.

### Stetigkeitsbedingung und Fresnelkoeffizienten

Betrachtet man die Stetigkeitsbedingungen für den reflektierten und gebrochenen Strahl als elektromagnetische Welle, ergeben sich aus diesen Bedingungen die Fresnel-Gleichungen.

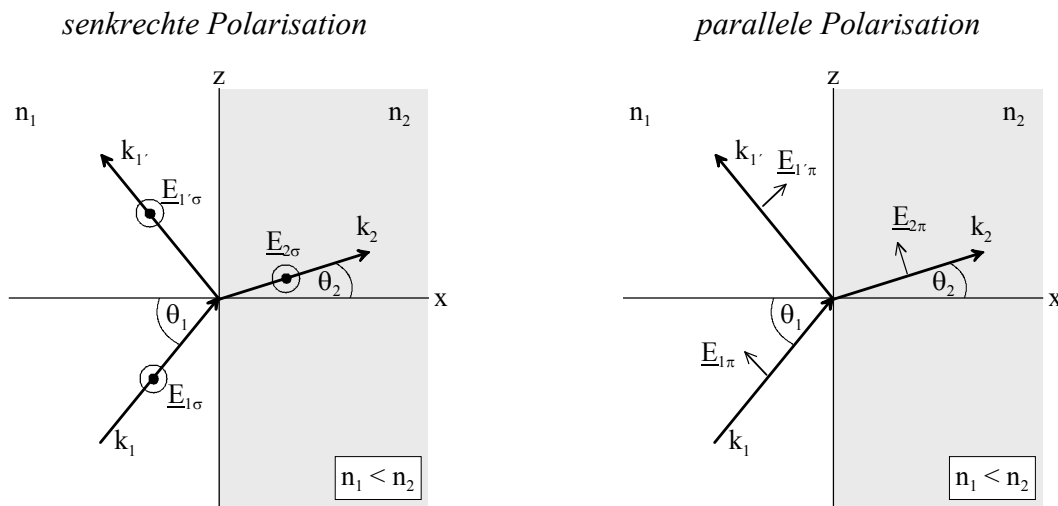


Abb. 2 Elektrischer Feldvektor bei der Brechung an einer Phasengrenze für senkrechte Polarisation und parallele Polarisation

Für die Stetigkeitsbedingungen müssen zwei Extremfälle unterschieden werden, zum einen die senkrechte Polarisation  $\sigma$  und zum anderen die parallele Polarisation  $\pi$ . Bei der senkrechten Polarisation steht der elektrische Feldvektor des einfallenden Strahles  $E_{1\sigma}$  senkrecht auf der Einfallsebene (in Abb. 2 Einfallsebene = Papierebene). Damit die Bedingung der Gleichheit der Summe der elektrischen Felder auf beiden Seiten der Phasengrenze erfüllt ist, gilt folgendes:

$$E_{1\sigma} + E_{1'\sigma} = E_{2\sigma} \quad \text{Glg. 2}$$

$$E_{1\pi} \cos \theta_1 + E_{1'\pi} \cos \theta_1 = E_{2\pi} \cos \theta_2 \quad \text{Glg. 3}$$

Der magnetische Feldvektor  $H$  steht senkrecht auf dem elektrischen Feldvektor  $E$ , so dass äquivalente Bedingungen gelten.

$$\text{mit } |H| = \sqrt{\varepsilon} |E| \quad (\mu \approx 1 \text{ bei opt. Frequenzen und } n^2 = \varepsilon\mu) \text{ gilt}$$

$$\text{für } H_\sigma : n_1 \cos \theta_1 (E_{1\sigma} - E_{1'\sigma}) = n_2 \cos \theta_2 E_{2\sigma} \quad \text{Glg. 4}$$

$$\text{für } H_\pi : n_1 (E_{1\pi} - E_{1'\pi}) = n_2 E_{2\pi} \quad \text{Glg. 5}$$

Die Fresnelkoeffizienten für die Reflexion  $r$  und für die Transmission  $t$  lassen sich aus diesen Stetigkeitsbedingungen ableiten, wodurch sich auch die Reflektivität  $R$  und die Transmission  $T$  ableiten.

$$r_{\sigma} = \frac{E_{1\sigma}}{E_{1\sigma}} = \frac{n_1 \cos \theta_1 - n_2 \cos \theta_2}{n_1 \cos \theta_1 + n_2 \cos \theta_2} \quad \text{Glg. 6} \quad R_{\sigma} = |r_{\sigma}|^2 \quad \text{Glg. 10}$$

$$r_{\pi} = \frac{E_{1\pi}}{E_{1\pi}} = \frac{-n_2 \cos \theta_1 + n_1 \cos \theta_2}{n_2 \cos \theta_1 + n_1 \cos \theta_2} \quad \text{Glg. 7} \quad R_{\pi} = |r_{\pi}|^2 \quad \text{Glg. 11}$$

$$t_{\sigma} = \frac{E_{2\sigma}}{E_{1\sigma}} = \frac{2n_1 \cos \theta_1}{n_1 \cos \theta_1 + n_2 \cos \theta_2} \quad \text{Glg. 8} \quad T_{\sigma} = \frac{n_2 \cos \theta_2 |t_{\sigma}|^2}{n_1 \cos \theta_1} \quad \text{Glg. 12}$$

$$t_{\pi} = \frac{E_{2\pi}}{E_{1\pi}} = \frac{2n_1 \cos \theta_1}{n_2 \cos \theta_1 + n_1 \cos \theta_2} \quad \text{Glg. 9} \quad T_{\pi} = \frac{n_2 \cos \theta_2 |t_{\pi}|^2}{n_1 \cos \theta_1} \quad \text{Glg. 13}$$

Diese Formeln sind allgemein gültig und gelten in beliebigen Medien (in Abhängigkeit von der Definition von  $n$ ). Das heißt, auch für die Totalreflexion sind sie einsetzbar.

### Totalreflexion

Bei der Totalreflexion betrachtet man die Situation, dass der Strahl im optisch dichteren Medium an der Phasengrenze zum optisch dünneren Medium reflektiert wird. Ist der Einfallswinkel größer als der Grenzwinkel, bei dem  $\theta_2$  gleich  $90^\circ$  ist, tritt Totalreflexion auf.

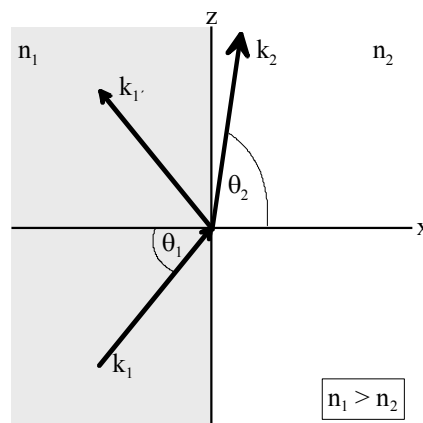


Abb. 3 *Strahlengang eines Lichtstrahls bei einem Phasenübergang von einem optisch dichteren Medium zu einem optisch dünneren Medium.*

$$\sin \theta_2 = \frac{n_1}{n_2} \sin \theta_1 \quad \text{Glg. 14}$$

$$\sin \theta_{krit} = \frac{n_2}{n_1} \quad \text{für } n_2 < n_1 \quad \text{Glg. 15}$$



Für größere Einfallswinkel  $\theta_1$  als der kritische Winkel  $\theta_{krit}$  wird  $\theta_2$  komplex und der Cosinus von  $\theta_2$  ist rein komplex ohne Realteil.

$$\cos^2 \theta_2 + \sin^2 \theta_2 = 1 \quad \text{Glg. 16}$$

$$\cos^2 \theta_2 = -(\sin^2 \theta_2 - 1) \quad \text{Glg. 17}$$

$$\cos \theta_2 = \pm i (\sin^2 \theta_2 - 1)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Glg. 18}$$

Glg.14 dividiert durch Glg.15 ergibt:

$$\sin \theta_2 = \frac{\sin \theta_1}{\sin \theta_{1krit}} \quad \text{Glg.19}$$

Glg.19 eingesetzt in Glg.18 ergibt:

$$\cos \theta_2 = -i \left( \left( \frac{\sin \theta_1}{\sin \theta_{1krit}} \right)^2 - 1 \right)^{\frac{1}{2}} = -i |\cos \theta_2| \quad \text{Glg. 20}$$

Nur die negative Wurzel ist gültig, damit die Welle in x-Richtung exponentiell abfällt und nicht zunimmt.

Für die Fresnelkoeffizienten erhält man unter diesen Bedingungen:

$$r_\sigma = \frac{E_{1\sigma}}{E_{1\sigma}} = \frac{n_1 \cos \theta_1 + in_2 |\cos \theta_2|}{n_1 \cos \theta_1 - in_2 |\cos \theta_2|} \quad \text{Glg. 21}$$

$$r_\pi = \frac{E_{1\pi}}{E_{1\pi}} = \frac{-n_2 \cos \theta_1 - in_1 |\cos \theta_2|}{n_2 \cos \theta_1 - in_1 |\cos \theta_2|} \quad \text{Glg. 22}$$

### *Evaneszentes Feld*

Die Reflektivitäten  $R_\sigma$  und  $R_\pi$  sind bei Totalreflexion gleich 1, während die Transmissionen  $T_\sigma$  und  $T_\pi$  verschwinden, da der Winkel  $\theta_2$  komplex ist. Schaut man sich jedoch die Transmissionskoeffizienten an, so erkennt man, dass diese ungleich 0 sind.

$$t_\sigma = \frac{E_{2\sigma}}{E_{1\sigma}} = \frac{2n_1 \cos \theta_1}{n_1 \cos \theta_1 - in_2 |\cos \theta_2|} \quad \text{Glg. 23}$$

$$t_\pi = \frac{E_{2\pi}}{E_{1\pi}} = \frac{2n_1 \cos \theta_1}{n_2 \cos \theta_1 - in_1 |\cos \theta_2|} \quad \text{Glg. 24}$$

Das bedeutet, dass zwar die Energie der Strahlung total reflektiert wird, dass sich aber das elektromagnetische Feld trotzdem im optisch dünneren Medium befindet.

Dieses evaneszente Feld lässt sich mit Hilfe der Proportionalität des elektrischen Feldes der transmittierten Welle zum Realteil der imaginären Größen darstellen.

$$E \sim \exp(i\omega t - ik_2(z \sin \theta_2 + x \cos \theta_2)) \quad \text{Glg. 25}$$

$$\sim \exp(i(\omega t - k_1 z \sin \theta_1) - qx) \quad \text{Glg. 26}$$

$$q = k_2 \left( \left( \frac{\sin \theta_1}{\sin \theta_{krit}} \right)^2 - 1 \right)^{1/2} \quad \text{mit} \quad k_{1,2} = \frac{\omega}{c} n_{1,2} \quad \text{Glg. 27}$$

Wenn  $\theta_1 > \theta_{krit}$  ist, wird  $q$  positiv, so dass der elektrische Feldvektor mit zunehmenden Abstand von der Oberfläche ( $x$ -Richtung) exponentiell abfällt. In Richtung der Phasengrenze ( $z$ -Richtung) propagiert die Welle parallel zur Oberfläche. Diese Welle heißt evaneszente oder auch abgeschwächte Welle. Die Abschwächung erfolgt innerhalb eines Abstandes zur Oberfläche von ungefähr  $q^{-1}$ , außer bei  $\theta_1 = \theta_{krit}$ .

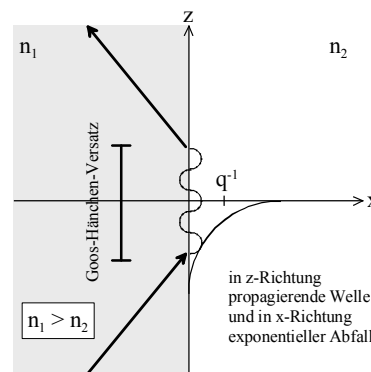


Abb. 4 Schematische Darstellung des evaneszenten Feldes und des Goos-Hänchen-Versatzes bei Totalreflexion.

Der Goos-Hänchen-Versatz, s. Abb. 4, ist besonders groß, wenn der Einfallswinkel sich dem kritischen Winkel bzw. der  $90^\circ$  nähert, ansonsten ist er geringer als eine Wellenlänge.

Die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes für ein System Glas/Wasser ( $n_1 = 1.504$ ,  $n_2 = 1.334$ ) und einer Wellenlänge von  $635 \text{ nm}$  bei einem Einfallswinkel von  $75^\circ$  errechnet sich wie folgt:

$$\begin{aligned} d \approx q^{-1} &= k_2^{-1} \left[ \left( \frac{\sin \theta_1}{\sin \theta_{krit}} \right)^2 - 1 \right]^{-0.5} = \left( \frac{2\pi}{\lambda} n_2 \right)^{-1} \left[ \left( \frac{n_1 \sin \theta_1}{n_2} \right)^2 - 1 \right]^{-0.5} \\ &\approx q^{-1} = \left( \frac{2\pi}{635 \text{ nm}} 1.334 \right)^{-1} \left[ \left( \frac{1.504 * \sin 75^\circ}{1.334} \right)^2 - 1 \right]^{-0.5} = 176 \text{ nm} \end{aligned}$$

Die Eindringtiefe  $d$  für dieses System, bei der die Amplitude auf ein e-tel des Ausgangswerts abgesunken ist, ist also deutlich kleiner als die Wellenlänge des reflektierten Strahls.

### 2.1.2. Fluoreszenz

Unter Fluoreszenz versteht man die Emission von Licht, ausgesendet von fluoreszierenden Molekülen, die durch Lichtabsorption angeregt werden.

In Abb. 5 ist das Jablonski-Termschema mit den Energiezuständen für den elektronischen Grundzustand und den angeregten Zustand mit den Schwingungs- und Rotationsniveaus dargestellt, s. dazu auch Göpel et al. (1994). Bei einer Anregung mit elektromagnetischer Strahlung werden im Resonanzfall Photonen absorbiert. Die Moleküle, die sich bei Raumtemperatur nur im niedrigsten Schwingungsniveau des elektronischen Grundzustandes  $S_0$  befinden, gelangen durch die Absorption **a** entsprechend dem Franck-Condon-Prinzip, s. Wedler (1982) in verschiedene Schwingungszustände des angeregten Zustandes  $S_1$  (Dauer des Übergangs:  $10^{-15}$  s). Durch Wechselwirkung mit den umgebenden Molekülen können die angeregten Moleküle Schwingungs- und Rotationsenergie verlieren (thermische Equilibrierung **b**) und relaxieren so innerhalb von  $10^{-13}$  s bis  $10^{-12}$  s in den der Boltzmann-Verteilung im thermischen Gleichgewicht entsprechenden Schwingungszustand von  $S_1$ , bei normalen Temperaturen in  $v=0$ . Mit  $10^{-11}$  s bis  $10^{-7}$  s ist dieser Schwingungszustand relativ langlebig. Von diesem Zustand aus können mehrere Prozesse stattfinden.

Die Moleküle können in  $10^{-7}$  s bis  $10^{-5}$  s durch isoenergetische, innere Umwandlung (internal conversion **c**) und anschließender Schwingungsrelaxation strahlungslos nach  $S_0$  desaktivieren oder durch Fluoreszenz **d** in  $10^{-9}$  s bis  $10^{-7}$  s in die verschiedenen Schwingungsniveaus des elektronischen Grundzustandes gelangen. Auch die isoenergetische Umwandlung in den Triplettzustand (intersystem crossing **e**) ist in einigen Fällen möglich. Von dort kommt es nur dann zur Emission, in diesem Fall Phosphoreszenz **f**, wenn eine weitere Interkombination und anschließende thermische Equilibrierung nicht auftreten. In erster Näherung ist die Spinumkehr während eines Elektronenübergangs verboten, so dass der Triplettzustand sehr langlebig wird, falls keine strahlungslosen Konkurrenzprozesse auftreten.

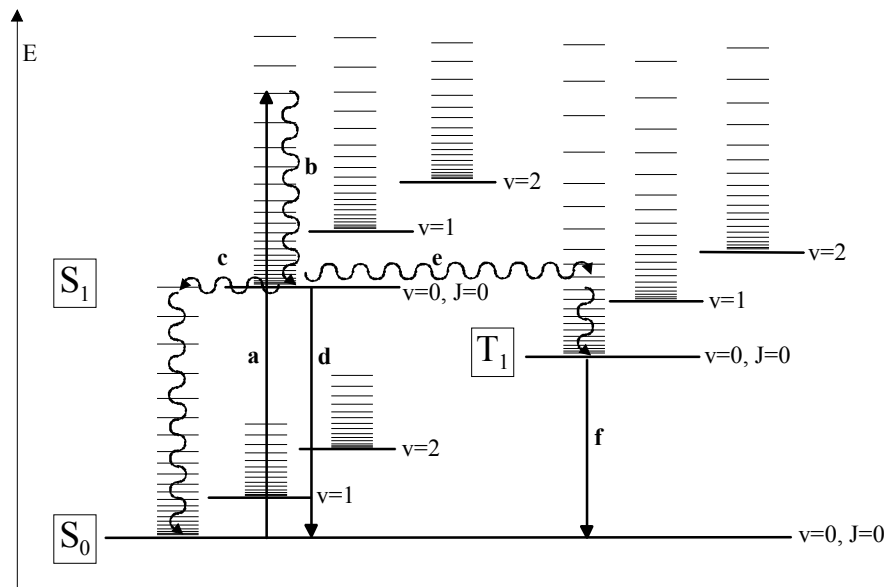


Abb. 5 Jablonski-Termschema mit verschiedenen Übergängen (jeweils nur ein Übergang dargestellt): a Absorption, b thermische Equilibrierung, c internal conversion, d Fluoreszenz, e intersystem crossing, f Phosphoreszenz.

In den Absorptions- und Fluoreszenzspektren enthalten die Banden die Schwingungsfeinstruktur der Übergänge, s. Abb. 6. Das Fluoreszenzspektrum ist im Vergleich zum Absorptionsspektrum zu größeren Wellenlängen verschoben (Stokes-Verschiebung), da die Moleküle im  $S_1$ -Zustand bereits Energie durch thermische Equilibrierung verloren haben.

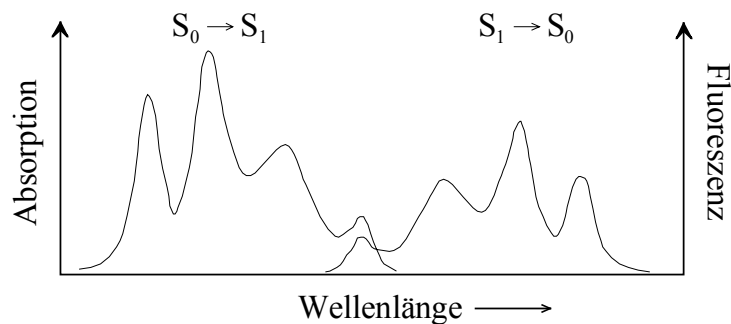


Abb. 6 Schematisches Spektrum von Absorption und Fluoreszenz für einen  $S_0 - S_1$  Übergang

Im angeregten Zustand ist das Molekül sehr reaktiv, so dass auch eine Photoreaktion möglich ist. Die Reaktionsprodukte fluoreszieren in aller Regel nicht mehr, deshalb spricht man von Ausbleichung (photobleaching). Die Photostabilität eines Moleküls sollte für den Einsatz in Immunoassays möglichst groß sein. Die Lebensdauer wird aber durch Erhöhung der Photonendichte des anregenden Strahls verkürzt.

Die stationäre Fluoreszenzintensität  $I_F$  berechnet sich nach Glg. 28 aus der Fluoreszenzquantenausbeute  $\phi_F$ , der Intensität des absorbierten Lichts  $I_{abs}$  und einem gerätespezifischen

Faktor  $Z$ , wobei die Fluoreszenzquantenausbeute das Verhältnis der Anzahl an emittierten Photonen zur Anzahl der absorbierten Photonen ist.

$$I_F = \phi_F \cdot I_{abs} \cdot Z \quad \text{Glg. 28}$$

## ***2.2. Molekulare Erkennungsreaktion mit Antikörpern***

Immunoassays nutzen das natürliche Phänomen, dass ein biologisches, funktionelles Molekül, der Antikörper, mit extrem hoher Affinitätskonstante Analyte durch schnelle und einfache Bindungsreaktion erkennt und damit extrem niedrige Nachweisgrenzen erzielt werden können. Im folgenden soll kurz erläutert werden, was Antikörper sind, wie ein Immunoassay aufgebaut werden kann und mit welchen physikalischen Größen die Erkennungsreaktion charakterisiert wird.

### **2.2.1. Antikörper**

Bei der Immunantwort im Körper eines Vertebraten werden Antikörper zur Abwehr von eingedrungenen Fremdkörpern, die als Antigene wirken, produziert. Durch das Aufeinandertreffen von Antigenen auf einen zufälligerweise passenden, auf einem B-Lymphozyten präsentierten Antikörper wird die Proliferation und Differenzierung ausgelöst, so dass eine große Menge dieses Antikörpers produziert wird. Das Antigen wird dadurch „sichtbar“ und kann ausgelöscht werden. Diese auf natürliche Weise entstandenen Antikörper haben die besondere Eigenschaft der extrem hohen Affinität zu dem spezifischen Antigen. Obwohl es alle Nachteile eines biologischen Moleküls mit sich bringt, z.B. mangelnde Hitze-, Säure- und Laugenstabilität, gibt es kein synthetisches System, das diese molekulare Erkennungsreaktion an Qualität übertreffen könnte. Somit bietet es sich an, den Antikörper als analytisches Werkzeug zu benutzen (Price et al. 1997).

#### *Struktur*

Antikörper sind Immunglobuline, die in verschiedene Klassen unterteilt sind und in Struktur und Eigenschaften differieren. Dazu gehören die Klassen IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Den größten Anteil im Serum hat das IgG, das sich noch in vier Subklassen aufteilt. In Abb. 7 ist die typische Y-Struktur des IgG1 dargestellt. Es besteht aus zwei identischen schweren Ketten mit ca. 450 bis 600 Aminosäuren und aus zwei identischen leichten Ketten mit ca. 220 Aminosäuren. Die Hinge-Region verbindet beide Segmente mit Disulfidbrücken, wodurch eine gewisse Flexibilität des Moleküls erreicht wird. Der Paratopbereich (Antigen bindender

Bereich) ist der variable Bereich der beiden Ketten ( $V_L$  und  $V_H$ ). Dieser Bereich variiert bei Antikörpern verschiedener Spezifität. Die restlichen Kettensegmente ( $C_L$  und  $C_H$ ) sind hoch konserviert und für einen Vertebraten spezifisch (Price et al. 1997).

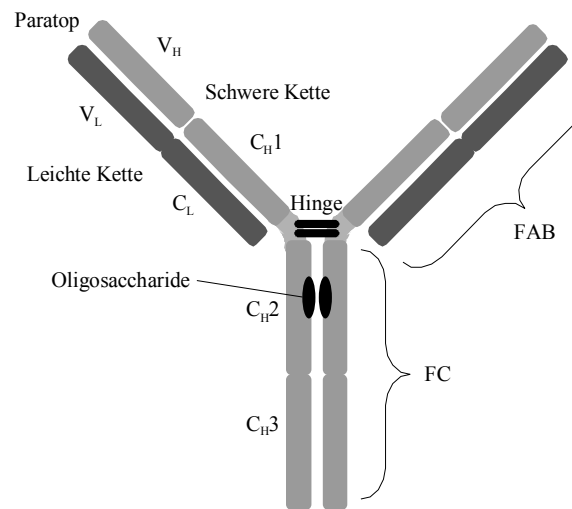


Abb. 7 *Y-Struktur eines IgG-Antikörpers; die zwei schweren Ketten bestehen jeweils aus der variablen Region  $V_H$  und den drei konstanten Regionen  $C_{H1-3}$ , die zwei leichten Ketten bestehen jeweils aus der variablen Region  $V_L$  und der konstanten Region  $C_L$ , das FC-Fragment stellt den unteren Teil des Antikörpers dar, das Fab-Fragment den  $\gamma$ -Arm mit Paratop.*

### Herstellung

Polyklonale Antikörper werden durch Immunisierung eines Tieres, wie z.B. Schaf, Kaninchen oder Ziege erhalten. Dazu wird entweder der Analyt selbst oder, wenn dieser zu klein ist ( $< 2000$  Dalton), der Analyt an ein Trägermolekül kovalent gebunden (z.B. Rinderserumalbumin, Thyroglobulin), dem Tier injiziert. Dieses Molekül wird Immunogen genannt. Nach wenigen Monaten enthält das Serum der Tieres viele verschiedene Antikörper gegen das Immunogen. Mit der Nach-Immunisierung lässt sich die Affinität der Antikörper sogar noch erhöhen. Durch Affinitätschromatographie wird aus dem Antiserum die Fraktion der Antikörper abgetrennt, die gegen das spezifische Hapten wirkt. Als Hapten wird der Teil des Immunogens bezeichnet, der vom Antikörper erkannt wird. Die gebildeten Antikörper binden auch das Hapten ohne Trägermolekül, können also den eigentlichen Analyten erkennen. Passend zum Begriff Paratop wird der Bereich des Haptens, der vom Antikörper gebunden wird, als Epitop bezeichnet. Polyklonale Antikörper sind immer eine Mischung aus vielen verschiedenen Antikörpern mit unterschiedlichen Spezifitäten. Trotzdem besitzen sie meist sehr hohe Affinitäten.

Monoklonale Antikörper werden durch Fusion von Antikörper produzierenden B-Zellen aus der Maus mit Tumorzellen produziert. Durch Vereinzelung der Zellen können Kolonien wachsen, die nur eine einzige Antikörpersorte mit einer Spezifität hervorbringen. Mit diesen Hybridoma können praktisch unbegrenzt Antikörper hergestellt werden.

Hinzugekommen sind nun auch die rekombinanten Methoden, mit denen Antikörper mit spezifischen Design hergestellt werden. Aus diesen Methoden resultiert die Hoffnung der Biotechnologiebranche, in naher Zukunft möglichst schnell Antikörper gegen neue Analyte generieren zu können (Price et al. 1997).

### 2.2.2. Immunoassay

Immunoassays werden eingesetzt, um mittels einer Immunreaktion ein Molekül qualitativ oder quantitativ in einer Probe zu bestimmen. Hierbei besteht die Immunreaktion ausschließlich aus der spezifischen Reaktion zwischen Analyt (Zielmolekül) und Antikörper (Erkennungsreagenz). Die Testformate dieser Immunoassays lassen sich nach verschiedenen Kriterien unterteilen. Zunächst ist eine Unterscheidung zwischen homogenen Assays, die in Lösung stattfinden und heterogenen Assays, bei denen eine Oberflächenreaktion beteiligt ist, möglich. Weiterhin können diese Assays in kompetitive bzw. nicht kompetitive Reaktionen oder nach ihrer Detektion markierungsfrei (direkt) bzw. mit Markierung (indirekt) unterteilt werden. Die nachfolgenden Beispiele verschiedener Testformate sollen einen Einblick in die große Vielfalt von möglichen Assays geben.

Viele homogene Assays funktionieren mit einer Markierung, da sie meist kompetitiv sind, und somit ohne mechanische Trennung zwischen Antikörper-Derivat-Komplex und Antikörper-Analyt-Komplex unterschieden werden muss. Beispielhaft hierfür ist der FRET-Assay (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer), bei dem der Antikörper mit einem Donor- und ein Analytderivat mit einem Akzeptorfarbstoff markiert ist. Die zwei verschiedenen Fluoreszenz-label erfahren einen Energietransfer, wenn sie sich in sehr geringer Distanz zueinander befinden. Das heißt, die Fluoreszenz des markierten Antikörpers wird gelöscht, wenn das Derivat an den Antikörper bindet. Sie wird nicht gelöscht, wenn der unmarkierte Analyt an den Antikörper bindet.

Als heterogener, kompetitiver Assay kann der weitverbreitete ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) verwendet werden. Die Standardtestplattform ist die Mikrotiterplatte. Die Trennschritte erfolgen durch Waschen der gesamten Platte. In einem ersten Schritt wird das Derivat auf die Platte adsorbiert. Die Lösung aus Antikörper und Analyt wird zur Platte hinzugegeben, inkubiert und danach gewaschen. Dieser Antikörper kann mit einem Enzym

gekoppelt sein, das bei Zusatz eines Substrats eine Farbreaktion auslöst. Eine zweite Möglichkeit ist einen zweiten Antikörper gegen den ersten zu zugeben. Der zweite Antikörper trägt dann das Enzym. Mit der Detektion über eine Enzymreaktion erreicht man extrem niedrige Nachweisgrenzen.

Bei einem weiteren heterogenen, kompetitiven Assay, der z.B. als RIA (Radioimmunoassay) ausgeführt werden kann, wird der Antikörper an eine Oberfläche adsorbiert und dann die Analytlösung zugegeben. Die noch freien Antikörperbindungsstellen werden mit einem markierten Derivat zurücktitriert.




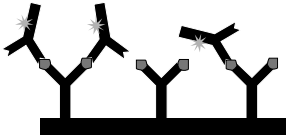
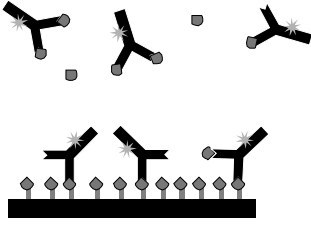
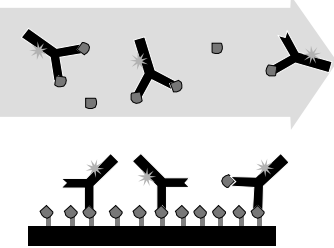
Einen homogenen, nicht kompetitiven Assay stellt der Fluoreszenz-Polarisationsimmunoassay (FPIA) dar, bei dem sich die Fluoreszenzanisotropie des fluoreszenzmarkierten Antikörpers dadurch ändert, dass der Analyt gebunden und damit die Rotationsdiffusion verringert wird. Der Analyt muss allerdings entsprechend groß sein, damit sich die Masse des Antikörper-Antigen-Komplexes deutlich von der des reinen Antikörpers unterscheidet.

Als heterogener, nicht kompetitiver Assay wird auch ein ELISA eingesetzt. Ein übliches Testformat ist der Sandwich-Assay, bei dem ein Antikörper auf der Oberfläche adsorbiert wird. Die zu untersuchende Lösung mit dem Analyt wird hinzugegeben und nach einer Inkubationszeit gewaschen. Ein zweiter Antikörper, der mit einem anderen Hapten des Analyten interagiert, wird hinzugegeben und nach einer Inkubationszeit wird wieder gewaschen. Letzterer Antikörper ist entweder selbst markiert (als Konjugat mit einem Enzym, das eine Farbreaktion auslöst), oder ein dritter, entsprechend markierter Antikörper wird gegen den zweiten eingesetzt.

Ein weiterer heterogener, quasi nicht kompetitiver Assay ist der Bindungshemmtest im Fluss. Der Antikörper wird vorher mit dem Analyten inkubiert und dann im kontinuierlichen Fluss über die mit Derivat modifizierten Oberfläche der Flusszelle geleitet, wodurch die noch freien Antikörper an die Oberfläche binden können. Für einen TIRF-Assay wird der Antikörper fluoreszenzmarkiert und die Fluoreszenz im oberflächennahen Bereich angeregt. Bei der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) wird die Änderung des Brechungsindex durch Anbindung des Antikörpers an die Oberfläche gemessen und bei der reflektometrischen Interferenz-Spektroskopie (RIFS) die Änderung des Interferenzspektrums durch Bindung des Antikörpers an die Oberfläche. Bei den beiden letzteren Methoden ist eine Markierung des Antikörpers nicht notwendig. Der Bindungshemmtest hat den großen Vorteil, dass er leicht automatisierbar ist und besonders bei Fluoreszenzmarkierung sehr hohe Sensitivitäten erzielt.



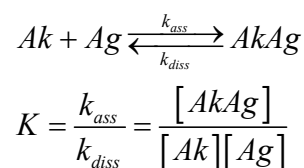
Tab. 1 Eine Auswahl verschiedener Immunoassay-Typen sortiert nach dem Prinzip kompetitiv - nicht kompetitiv.

kompetitiver Assay	nicht kompetitiver Assay
 <p data-bbox="347 510 627 544">homogen, z.B. FRET</p>	 <p data-bbox="970 510 1233 544">homogen, z.B. FPIA</p>
 <p data-bbox="304 723 671 757">heterogen, mit Rücktitration</p>	 <p data-bbox="922 745 1289 779">heterogen, Sandwich-Assay</p>
 <p data-bbox="331 1059 643 1093">heterogen, mit Waschen</p>	 <p data-bbox="906 1081 1305 1115">heterogen, Bindungshemmtest</p>

### 2.2.3. Affinitätskonstante

Die Antikörper-Antigen Bindung ist, obwohl nicht kovalent, sehr stark, da vier verschiedene Bindungskräfte zusammenwirken. Über größere Distanzen (2-3 nm) treten zunächst die hydrophoben und die elektrostatischen Wechselwirkungen in Erscheinung. Durch die hydrophoben Kräfte werden die beiden Moleküle angenähert, indem die Wassermoleküle verdrängt werden. Erst wenn sich die Moleküle auf 0.2 bis 0.3 nm genähert haben, können die Van-der-Waals-Kräfte und die Wasserstoffbrückenbindungen wirken (Price et al. 1997).

Die Summe dieser Kräfte bewirken die hohe Affinität zwischen Antikörper  $Ak$  und Antigen  $Ag$ . Die Affinität kann durch das Massenwirkungsgesetz beschrieben werden und wird dementsprechend von Temperatur, Salzkonzentration, pH und ähnlichem beeinflusst. Das Massenwirkungsgesetz lautet für diese Reaktion:



Die Gleichgewichtskonstante  $K$  stellt die Affinitätskonstante dar. Sie kann auch mit dem Quotient aus der Assoziationsratenkonstante  $k_{ass}$  und der Dissoziationsratenkonstante  $k_{diss}$  berechnet werden. Die Größenordnung der Affinitätskonstante liegt im Bereich von  $10^6$  bis  $10^{10}$  l/mol. Die Schwankungsbreite wird hauptsächlich durch unterschiedliche Dissoziationsratenkonstanten hervorgerufen. Die Bestimmung der Affinitätskonstante mit Hilfe eines Bindungshemmtests (s. Kapitel 2.2.2) erfolgt über den Testmittelpunkt der Kalibrierkurve. An diesem Punkt ist die Hälfte aller Antikörperbindungsstellen mit dem Analyten inhibiert. Da nur die Anfangskonzentrationen des eingesetzten Antikörpers  $[Ak]_0$  und des Analyten  $[Ag]_0$  bekannt sind, muss zunächst ein Zusammenhang zwischen diesen Größen hergestellt werden (Piehler, Brecht et al. 1997).

$$K = \frac{[AkAg]}{[Ak][Ag]} = \frac{[AkAg]}{([Ak]_0 - [AkAg])([Ag]_0 - [AkAg])} \quad \text{Glg. 29}$$

Da IgG Antikörper zwei Bindungsstellen besitzen, muss noch eine Verteilungsfunktion eingefügt werden. Am besten eignet sich dafür die Binomialverteilung, bei der davon ausgegangen wird, dass die Bindungsstellen unabhängig voneinander sind.

$$[Ak]_v = \frac{[AkAg]^2}{2[Ak]_0} \quad \text{Glg. 30}$$

Hierbei ist  $[Ak]_0$  die Bindungsstellenkonzentration,  $[AkAg]$  die Konzentration an gebildetem Komplex und  $[Ak]_v$  die Konzentration an vollständig besetzten Molekülen. Durch die zwei Bindungsstellen an einem Antikörper, werden nur diejenigen Antikörper nicht detektiert, die vollständig besetzt sind. Da am Testmittelpunkt die Hälfte der Antikörper besetzt sind, beträgt die Anzahl der vollständig besetzten Moleküle ein Viertel der Bindungsstellen  $[Ak]_0$ .

$$[Ak]_v = \frac{1}{4}[Ak]_0 \quad \text{Glg. 31}$$

Aus Glg. 30 und 31 folgt für die Konzentration des Komplexes  $[AkAg]_{TMP}$  am Testmittelpunkt:

$$[AkAg]_{TMP} = \frac{1}{\sqrt{2}}[Ak]_0 \quad \text{Glg. 32}$$

Eingesetzt in Glg. 29 ergibt sich für die Affinitätskonstante:

$$K = \frac{\frac{1}{\sqrt{2}}[Ak]_0}{\left([Ak]_0 - \frac{1}{\sqrt{2}}[Ak]_0\right)\left([Ag]_{0,TMP} - \frac{1}{\sqrt{2}}[Ak]_0\right)} = \frac{\frac{1}{\sqrt{2}}}{\left(1 - \frac{1}{\sqrt{2}}\right)\left([Ag]_{0,TMP} - \frac{1}{\sqrt{2}}[Ak]_0\right)} \quad \text{Glg. 33}$$

$$= \frac{\frac{1}{\sqrt{2}}}{\left(1 - \frac{1}{\sqrt{2}}\right)\frac{1}{\sqrt{2}}\left(\sqrt{2}[Ag]_{0,TMP} - [Ak]_0\right)} = \frac{\left(1 - \frac{1}{\sqrt{2}}\right)^{-1}}{\sqrt{2}[Ag]_{0,TMP} - [Ak]_0} \quad \text{Glg. 34}$$

$$= \frac{2 + \sqrt{2}}{\sqrt{2}[Ag]_{0,TMP} - [Ak]_0} \quad \text{Glg. 35}$$

Die Abhängigkeit der freien Antikörperkonzentration, die bei einem Bindungshemmtest das Signal liefert, von der Anfangskonzentration des Analyten und des Antikörpers lautet:

$$[Ak]_{frei} = \frac{[Ak]_0}{2} - \frac{\left\{ \frac{[Ak]_0 + [Ag]_0 + K^{-1}}{2} - \sqrt{\frac{([Ak]_0 + [Ag]_0 + K^{-1})^2}{4} - [Ak]_0[Ag]_0} \right\}^2}{2[Ak]_0} \quad \text{Glg. 36}$$

Mit Glg. 35 kann aus einer Kalibrierkurve mit Hilfe der Analytkonzentration am Testmittelpunkt  $[Ag]_{0,TMP}$  und der eingesetzten Antikörperkonzentration  $[Ak]_0$  die Affinitätskonstante ermittelt werden. Bedingung ist ein monoklonaler Antikörper, eine massentransport-limitierte Reaktion an der Oberfläche und die Kenntnis der aktiven Antikörperkonzentration. Bei polyklonalen Antikörpern hat jede Sorte von Antikörpern eine andere Affinitätskonstante. Wenn von einer Normalverteilung der Affinitätskonstanten auszugehen ist, kann aus der Kalibrierkurve eine mittlere Affinitätskonstante bestimmt werden. Für die Bestimmung des Testmittelpunkts kann bei polyklonalen Antikörpern in den meisten Fällen nicht Glg. 36 als Fit-Funktion eingesetzt werden. Der Testmittelpunkt muss mit anderen Modellen bestimmt werden, bevor die Affinitätskonstante ermittelt werden kann.

#### 2.2.4. Kreuzreaktivität

Antikörper haben nicht nur eine Affinität zum Antigen, das zur Immunisierung verwendet wurde, sondern auch zu anderen Epitopen, jedoch meist mit niedrigerer Affinität. Diese Kreuzreaktivität kann nachteilig sein, wenn aus einer Mischung heraus ein bestimmter Analyt quantitativ bestimmt werden soll. Strukturell verwandte Analyten werden bei entsprechender

Kreuzreaktivität miterfasst. Diese Eigenschaft kann jedoch auch ausgenutzt werden, indem man mit geeigneten Antikörpern Summenparameter bestimmt (Hock 1995; Winklmaier et al. 1997; Bjarnason et al. 1997; Van Emon et al. 1992) oder Multi-Analyt-Messungen mit komplexeren Auswertemethoden durchführt, wie es in dieser Arbeit unter Verwendung von neuronalen Netzen dargestellt werden soll.

Die Definition der Kreuzreaktivität  $KR$  ist umstritten, da die Aussagekraft dieser Zahl nicht eindeutig ist. Die Standarddefinition, die auch als Spezifikation für kommerziell erhältliche Antikörper verwendet wird, wurde von Abraham (1969) definiert.

$$KR = \frac{IC_{50, \text{Standardanalyt}}}{IC_{50, \text{Kreuzreagenz}}} \cdot 100 \quad [\%] \quad \text{Glg. 37}$$

Der  $IC_{50}$ -Wert entspricht dem Testmittelpunkt einer von 0 % bis 100 % normierten Kalibrierkurve.

Da die Standarddefinition eine unbefriedigende Lösung darstellt, haben sich viele Gruppen damit beschäftigt, eine neue Definition der Kreuzreaktivität zu finden. Lauzon et al. (1973) haben die Signaländerungen  $\Delta S$ , die jeweils durch 1 ng des Analyten verursacht wird, verglichen, wobei ein kompetitiver Assay mit radioaktiv markiertem Analytderivat verwendet wurde.

$$KR = \frac{\Delta S_{\text{Kreuzreagenz}}}{\Delta S_{\text{Standardanalyt}}} \cdot 100 \quad [\%] \quad \text{Glg. 38}$$

Der Standardanalyt wird als Referenzpunkt genommen. Problematisch ist der Wert 1 ng, da dieser keine Konzentrationsangabe darstellt und außerdem mit anderen Methoden als dem RIA nur in geringeren Volumina als in einem Liter detektierbar ist.

Ahmad et al. (2001) führen einen Bindungshemmtest, wie in Kapitel 2.2.2 erklärt, mit einem SPR-Biosensor (Biacore 3000) durch. Sie betrachten die auf 100 % referenzierten Signale als freien, also nicht inhibierten Antikörper und definieren diese Werte als Kreuzreaktivität. Mit dieser Definition wird die Kreuzreaktivität auf nicht kompetitive Assays beschränkt, da bei kompetitiven Assays die Derivatkonzentration in die Kalibrierung einfließt und so die Signale verändert.

Pratt et al. (1979) schlagen vor, die Kreuzreaktivität als Wert zu definieren, bei dem das Kreuzreagenz einen 10 %-igen Fehler bei der Bestimmung des Analyten bewirkt. Dazu wird die Steigung des Kreuzreagenzes bei dem Signal ermittelt, an dem der Standardanalyt gerade ein Zehntel der Testmittelpunktkonzentration hat. Diese Steigung wird durch die dividiert, die der Standardanalyt in diesem Punkt hat. Hier werden die Steigungen ins Verhältnis gesetzt, da

die Steigung eines Kreuzreagenzes mit geringerer Affinität automatisch einen kleineren Wert besitzt als die Steigung des Standardanalyten.

$$KR = \frac{\text{Anfangssteigung}_{\text{Kreuzreagenz}}}{\text{Anfangssteigung}_{\text{Standardanalyt}}} = \frac{-\frac{\delta S}{z(10\%Fehler)}}{-\frac{\delta S}{y_{50} \times \frac{10}{100}}} = \frac{y_{50} \times \frac{10}{100}}{z(10\%Fehler)} \quad \text{Glg. 39}$$

Hier ist  $z$  die Konzentration des Kreuzreagenzes,  $y_{50}$  die Konzentration des Standardanalyten am Testmittelpunkt und  $S$  das Signal. Die Anfangssteigungen werden bei der Blindprobe bestimmt. Bei dieser Definition wird der Einfluss, also der Fehler, den das Kreuzreagenz auf die Bestimmung des Standardanalyten ausübt, berücksichtigt. Voraussetzung ist, dass der Austausch von 10 % des Standardanalyten mit der errechneten Konzentration des Kreuzreagenzes im gesamten Konzentrationsbereich möglich ist.

Bei Oubina et al. (1996) wird die Kreuzreaktivität durch die Kalibrierung des Kreuzreagenzes mit einem Zusatz einer definierten Menge des Standardanalyten ermittelt. Aus den erhaltenen Testmittelpunkten wird nach der traditionellen Methode von Abraham die Kreuzreaktivität berechnet. Bei Oubina et al. (1997) werden verschiedene Kreuzreaktivitäten verglichen, die dadurch erhalten werden, dass der Standardanalyt unter Zusatz des Kreuzreagenzes kalibriert wird. Die Konzentration des Kreuzreagenzes wird variiert und die Kreuzreaktivität wird mit dem Testmittelpunkt der erhaltenen Kalibrierkurven berechnet. Die Kreuzreaktivität sinkt, je mehr Kreuzreagenz zugesetzt wird, da der Testmittelpunkt zu immer höheren Konzentrationen rückt, bis das Signal unabhängig von der Standardanalyt-Konzentration ist, da der Antikörper bereits durch die hohe Konzentration des zugesetzten Kreuzreagenzes vollständig inhibiert ist. Da die Messung im Zweidimensionalen betrachtet wird, ist zu erkennen, dass sich die Signaldynamik der Kalibrierkurve verringert. So kann der Fehler direkt betrachtet werden, auch wenn er nicht berechnet wird.

### 2.2.5. Kinetik

Wie bereits in Kapitel 2.2.3 erwähnt, lässt sich aus einer Kalibrierkurve die Affinitätskonstante bestimmen. Voraussetzung für eine Kalibrierkurve ist eine massentransport-limitierte Bindung des Antikörpers auf die Oberfläche. Für die Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten hingegen muss die Bindungsreaktion an der Oberfläche der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sein. Beide Arten sind Grenzfälle, da im Grunde weder die Diffusion, noch die Reaktion an der Oberfläche völlig zu vernachlässigen sind, s. Abb. 8.

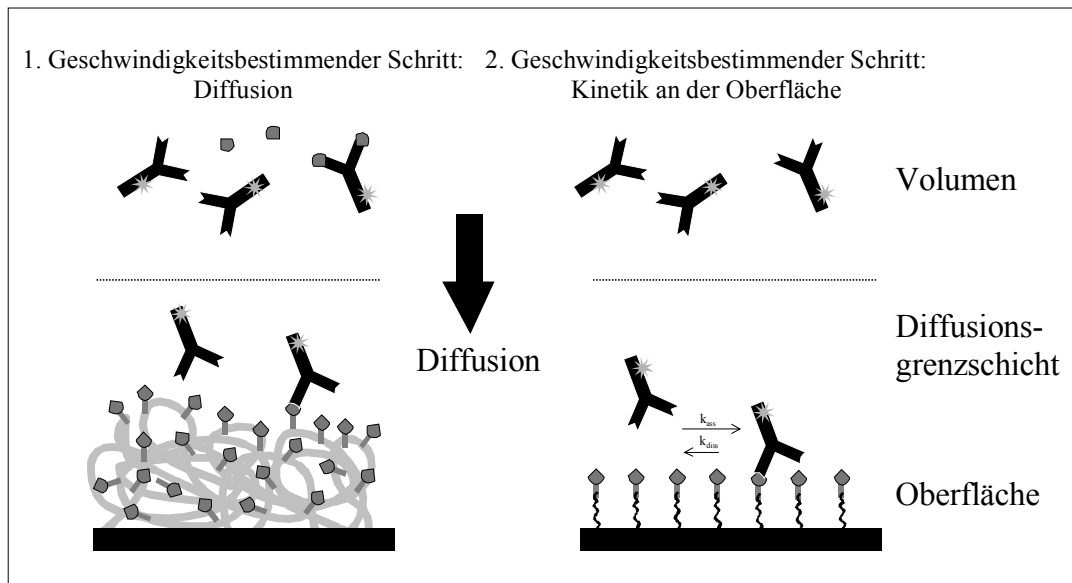


Abb. 8 Schema zur Beschreibung einer massentransport-limitierten bzw. diffusions-limitierten Messung, z.B. für Kalibrierkurven und einer Messung zur Kinetik an der Oberfläche, jeweils im Fluss.

Um den jeweiligen Grenzfall zu erreichen, muss bei der massentransport-kontrollierten Messung die Bindungsstellenkonzentration im Vergleich zu der Antikörperkonzentration sehr hoch sein, so dass alle Antikörpermoleküle, die zur Oberfläche diffundieren, sofort einen Bindungspartner finden. Eine Oberfläche, mit der dieses Verhalten erreicht wird, ist die Dextranschicht, die sehr viele Bindungsstellen zur Verfügung stellt und im gequollenen Zustand auch das Eindiffundieren der Antikörper in die Schicht zulässt. Da der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Diffusion ist, ist die Bindungskurve linear. Aus der Steigung lässt sich die Antikörperkonzentration in der Lösung und mit Hilfe der Kalibrierkurve die thermodynamische Konstante bestimmen.

Um die Kinetik an der Oberfläche zu beobachten, muss der Diffusionseinfluss minimiert werden. Dies wird durch eine geringe Bindungsstellenkonzentration an der Oberfläche möglich. Zu diesem Zweck wird Polyethylenglycol statt Aminodextran verwendet. Durch seine Struktur erhält man eine „Bürsten“-Oberfläche. Diese Oberfläche fasst maximal eine Monolage von Antikörpern. Die Reaktion an der Oberfläche wird zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, und die Bindungskurve entspricht einer Sättigungskurve.

*Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante*

In Glg. 40 wird die Gleichgewichtsreaktion zwischen Antikörper  $Ak$  und immobilisiertem Derivat  $D$  betrachtet. Die Assoziationsratenkonstante ist  $k_{ass}$  und die Dissoziationsratenkonstante  $k_{diss}$ . (O'Shannessy et al. 1996; Piehler, 1997)



Daraus ergibt sich für die  $AkD$ -Komplex-Bildungsrate bzw. den Bedeckungsgrad der Oberfläche  $\Gamma$ , unter Berücksichtigung, dass die Anzahl an freien Bindungsstellen die Differenz aus maximaler Bindungsstellenanzahl  $\Gamma_{max}$  und Bedeckungsgrad  $\Gamma$  ist, folgendes:

$$\frac{d\Gamma}{dt} = k_{ass} [Ak](\Gamma_{max} - \Gamma) - k_{diss}\Gamma \quad \text{Glg. 41}$$

Wenn die Messung im Durchfluss durchgeführt wird, ist die Antikörperkonzentration  $[Ak]$  konstant und die Kinetik pseudo-erster Ordnung. Die Lösung der Differentialgleichung lautet:

$$\Gamma(t) = \frac{k_{ass} [Ak] \Gamma_{max}}{k_{ass} [Ak] + k_{diss}} \left(1 - e^{-(k_{ass} [Ak] + k_{diss})t}\right) \quad \text{Glg. 42}$$

Vereinfacht lässt sich auch schreiben:

$$\Gamma(t) = \Gamma_{GG} \left(1 - e^{-k_{obs}t}\right) \quad \text{Glg. 43}$$

wobei  $\Gamma_{GG}$  die Gleichgewichtsbedeckung ist und  $k_{obs}$  die observable, konzentrationsabhängige Ratenkonstante ist, die sich folgendermaßen zusammensetzt:

$$k_{obs} = k_{ass} [Ak] + k_{diss} \quad \text{Glg. 44}$$

Bei Auftragung des Bedeckungsgrads  $\Gamma$  gegen die Zeit erhält man eine Bindungskurve, deren Krümmung durch  $k_{obs}$  gegeben ist. Durch Auftragung von  $k_{obs}$  gegen die Antikörperkonzentration lässt sich mit einer Geradenanpassung aus der Steigung  $k_{ass}$  und aus dem Achsenabschnitt  $k_{diss}$  ablesen. Der Quotient aus  $k_{ass}$  und  $k_{diss}$  ist die Gleichgewichtskonstante.

Die exponentielle Kurvenanpassung an eine gemessene Bindungskurve ist nur dann erfolgreich, wenn der richtige Anpassungsbereich gewählt wurde. So ist am Anfang der Kurve noch die diffusionslimitierte Bindung vorherrschend, während gegen Ende eine weitere Assoziationsratenkonstante hinzukommt, die die Bindung von schwerer zugänglichen Bindungsstellen beschreibt. Ein zusätzlicher Nachteil dieser Methode ist die Extrapolation zur Berechnung von  $k_{diss}$ . Extrapolationen sind meist mit einem hohen Fehler behaftet, da der

lineare Zusammenhang in Randbereichen nicht gegeben sein muss. Ein sehr wichtiger Faktor ist das Flussprofil. Hat es kein Rechteckprofil, entsteht ein großer Fehler dadurch, dass die Probe nach hinten heraus verdünnt wird. Diese Fehler gehen in die Konstanten ein, und werden in der Gleichgewichtskonstante fortgepflanzt. In der Literatur sind noch weitere Methoden, die aus der Dissoziationskurve  $k_{diss}$  berechnen, beschrieben, werden jedoch in dieser Arbeit nicht verwendet (O'Shannessy et al. 1996).

Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass, wenn es sich um polyklonale Antikörper handelt, jede Sorte Antikörper eine andere Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante hat. Dadurch können für die polyklonalen Antikörper nur mittlere Konstanten angegeben werden.

### ***2.3. Microcystin***

Ein spezielles Toxin, dem erst in den letzten Jahren zunehmend Aufmerksamkeit gewidmet wurde, ist das Microcystin. Es gehört zu Hepatotoxinen aus Cyanobakterien, auch Blaualgen genannt. Blaualgen existieren in Seen und Flüssen, die durch Einzugsgebiete mit intensiver landwirtschaftlicher Nutzung einen relativ hohen Eutrophierungsgrad aufweisen. Sie sind weltweit verbreitet, und häufig kommt es zu großen Algenblüten, bei denen die Massentwicklung von Algen zu einer massiven Freisetzung verschiedener Toxine führt.

Zwei verschiedene Giftklassen werden von einigen Arten dieser Cyanobakterien produziert. Eine Klasse sind Neurotoxine (very fast death factors), z.B. Anatoxin-a(s), das zu den stärksten bekannten Nervengiften zählt, da es die Acetylcholinesterase blockiert. Mit einer  $LD_{50, Maus}$  von 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  führt es in entsprechender Dosis innerhalb weniger Minuten zum Tod. Glücklicherweise werden diese Gifte nicht so häufig nachgewiesen wie die zweite Klasse, die Microcystine. Microcystine zählen zu den Hepatotoxinen (fast death factors) und verursachen Leberblutungen durch Blockieren der Protein-Phosphatase 1 und 2a mittels kovalenter Bindung (MacKintosh et al. 1990). Microcystine sind Heptacyclopeptide mit einer besonderen Aminosäure, der ADDA (3 Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-4,6-dekandiensäure). Ca. 60 Strukturanaloga sind bekannt, die hauptsächlich in zwei Aminosäuren variieren (Rinehart et al. 1994). Die Abkürzung der zwei Aminosäuren werden dem Namen angehängt. Über die Gallensäuretransporter in Leberzellen gelangen diese Giftstoffe in die Zellen und führen bei Microcystin mit einer  $LD_{50, Maus}$  von ca. 60  $\mu\text{g}/\text{kg}$  innerhalb von Stunden bis Tagen zum Tod. Bei chronischer Applikation sind zwei Gefährdungen zu betrachten. Zum einen bewirken Microcystine einen fortschreitenden Leberschaden, zum anderen wirkt Microcystin



als Tumorpromoter (Falconer et al. 1989). Es konnte bisher nicht belegt werden, dass Microcystine selbst kanzerogen sind.

Die Aufnahme dieser Giftstoffe kann durch direkten Kontakt erfolgen, vor allem beim Baden in kontaminierten Gewässern, wobei besonders die Augen, Ohren, Mund und Hals sensibel reagieren. Andererseits können diese Stoffe durch Schlucken und Aspiration aufgenommen werden. Die Symptome sind Schleimhautreizungen, Anaphylaxie, Fieber, Bauchschmerzen, Übelkeit, Brechreiz, Diarrhöe, Halsschmerzen, Husten, Kopfschmerzen bis hin zur atypischen Pneumonie und vermehrten Leberenzymen im Serum, insbesondere der Gamma-Glutamyltransferase (WHO 1998).

Bisher ist nur ein Fall bekannt, bei dem Menschen durch Dialyse mit kontaminiertem Wasser zu Tode gekommen sind. In Caruaru, Brasilien, wurde bei einem Hämodialyse-Programm eines Krankenhauses während einer Dürrezeit das Trinkwasser nicht wie zu normalen Zeiten durch Stein und Sand gefiltert, sondern direkt aus einem mit Cyanobakterien überwucherten See entnommen und lediglich stark gechlort. Danach wurde es wie üblich in der Klinik gereinigt (Sand- und Kohlefilter, Ionenaustauscher und Mikroporenfilter, allerdings keine Umkehrosiose) und für die Dialyse verwendet. Von 126 Patienten starben 60 Patienten mit neurologischen Symptomen oder an Leberversagen (Pouria et al. 1998).

Bei Tieren wurde sehr viel häufiger über Fälle im Zusammenhang mit Cyanobakterien-infiziertem Trinkwasser berichtet. Da besonders Vieh sehr viel ungereinigtes Wasser aufnimmt, ist die applizierte Dosis größer. Eine letale Intoxikation wurde bei Schafen, Rindern, Pferden, Hunden, Fischen und vielen weiteren Arten seit über einem Jahrhundert in vielen Teilen der Welt (USA, Kanada, Australien, Südafrika, Finnland, Dänemark) beobachtet (WHO Guidelines for Safe Recreational-water environments 1998).

Bei Studien wurde eine unbedenkliche einmalige Dosis bei Aufnahme von 250 ml Wasser von 100 µg/L errechnet. Die WHO fordert einen Grenzwert für Microcystin von 1 µg/l Trinkwasser (WHO Guidelines for drinking Water Quality: Recommendations 1998).

Eines der ersten Nachweissysteme für Microcystine und Neurotoxine maß die Toxizität. Eine Probe wird einer Maus injiziert und diese dann 24 Stunden beobachtet. Inzwischen sind andere Methoden etabliert worden. So können Microcystine bei vorheriger Reinigung der Proben und eventueller Aufspaltung der Zellen mit den Standardanalytikmethoden quantifiziert werden. Außerdem sind inzwischen schnelle Bioassays vorhanden, wie z.B. der Phosphatase-Assay, Beim die Eigenschaft der Microcystine ausgenutzt wird, das Protein Phosphatase Enzym Typ 1 bzw. 2a zu inhibieren (Rapala et al. 2002; Rivasseau et al. 1999).

Der Phosphatase-2a-Assay von Ricasseau et al. (1999) beruht auf der Reaktion eines Substrats (p-Nitrophenylphosphat) mit dem Enzym. Die gelbe Farbe des Produkts p-Nitrophenol wird kolorimetrisch bei 405 nm gemessen. Das Enzym wird vorher eine Stunde mit der Probe inkubiert. Eine robustere Quantifizierung ist erst nach einem Verdünnungsschritt der Probe möglich. Der Bereich, in dem Microcystin bestimmt werden kann, liegt zwischen 0.2 und 0.8 µg/l, und bei Realproben mit Matrixeffekten, wie Trinkwasser oder Flusswasser, muss die Probe vorher mit Festphasenextraktion gereinigt und konzentriert werden.

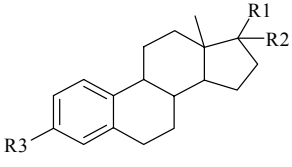
Der Phosphatase-1-Assay von Rapala et al (2002) beruht auf dem gleichen Prinzip, nur dass hier ein anderer Typ des Enzyms verwendet wird. Der Arbeitsbereich liegt zwischen 0.6 und 6.6 µg/l. Beide Assays sind durch die Enzyme relativ kostenintensiv. Außerdem beeinflussen alle Substanzen, die das Enzym in irgendeiner Weise blockieren oder dem Substrat ähneln das Ergebnis des Phosphatase-Assays.

Ein anderer Bioassay ist der ELISA. Von Zeck et al. (2001) wurde zum Beispiel ein ELISA spezifisch für [4-Arginin]-Microcystine vorgestellt. Als Testformat wird der direkte, kompetitive Assay in der Mikrotiterplatte verwendet. Dazu wird die Platte mit einem Anti-Maus-IgG beschichtet und dann mit dem Anti-Microcystin-IgG (MC10E7) inkubiert. Nach ausführlichem Waschen wird die Probe bzw. die Kalibrierlösung mit dem Analyt hinzugegeben und für 2 h inkubiert und anschließend gewaschen. Danach wird das Hapten mit Peroxidase-label zugeben und nochmals 17 min inkubiert. Nun kann das Substrat zugesetzt werden und die Farbreaktion ausgemessen werden. Die Nachweisgrenze liegt bei 0.006 µg/l (andere Definition als Glg 48). Der Testmittelpunkt liegt bei 0.063 µg/l und die Affinitätskonstante über  $0.7 \cdot 10^{11}$  l/mol für Microcystin-LR. Die Wiederfindungsraten bei Realproben mit verschiedenen Matrices (Trinkwasser, Talsperre, See und Fluss) liegen zwischen 69 % und 150 %.

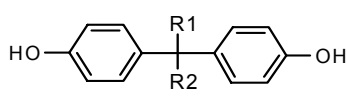
### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Analyte und Antikörper

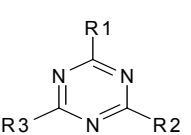
Tab. 2 Struktur der verwendeten Estrogene und Estrogenderivate\*

		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	MG*
17-β-Estradiol	E <sub>2</sub>	-OH	-H	-OH	272.4
17-α-Ethinylestradiol	EE <sub>2</sub>	-OH	-C≡CH	-OH	296.4
Estron	E <sub>1</sub>	=O		-OH	270.4
Derivat für Estron	DE <sub>1</sub>	=O		-Linker-COOH	
Derivat 1 für Estradiol	DE <sub>2</sub> 1	-OH	-H	-Linker-COOH	
Derivat 2 für Estradiol	DE <sub>2</sub> 2	-OH	-H	-Linker-COOH	
Derivat 1 für Ethinylestradiol	DEE <sub>2</sub> 1	-Linker-COOH		-OH	
Derivat 2 für Ethinylestradiol	DEE <sub>2</sub> 2	-Linker-COOH	-H	-OH	

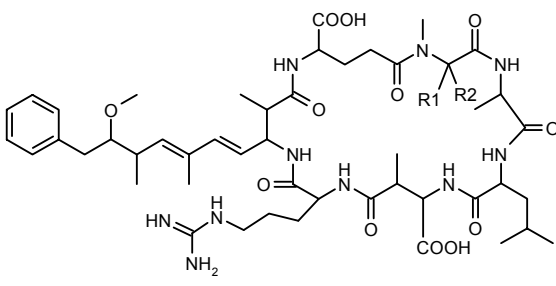
Tab. 3 Struktur von Bisphenol A und der verwendeten Derivate\*

		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	MG*
Bisphenol A	BPA	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	228.3
Derivat 1 für Bisphenol A	DBPA1	-CH <sub>3</sub>	-Linker-COOH	
Derivat 2 für Bisphenol A	DBPA2	-Linker-COOH		

Tab. 4 Struktur von Atrazin, Simazin und Irgarol 1051

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	MG
Atrazin	NH-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	Cl	215.7
Simazin	NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	Cl	201.7
Irgarol	NH-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	NH-C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	S-CH <sub>3</sub>	253.2

Tab. 5 Struktur des Blaualgentoxins Microcystin und des verwendeten Derivats

		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	MG
Microcystin-LR	MC	=CH <sub>2</sub>		995.2
NH <sub>2</sub> Microcystin-LR	MCNH <sub>2</sub>	-H	-S-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	1072.3

Die Analyte Estradiol, Estron, Ethinylestradiol, Bisphenol A wurden von Sigma, Deisenhofen, bezogen, die Analyte Atrazin und Simazin von Riedel-de Haen, Seelze, und der Analyt Microcystin-LR von Alexis Biochemicals, Grünberg.

Das Derivat von Microcystin wurde nach einer Vorschrift von I. Schaupt aus dem Arbeitskreis Dr. M.G. Weller, Institut für Wasserchemie, TU München, hergestellt.

Die Antikörper für die Estrogene Anti-E<sub>1</sub> (Schaf) und Anti-ES (Kaninchen) und für Bisphenol A Anti-BPA und die Derivate für die Estrogene und für Bisphenol A, ebenso die Antikörper für die Triazine und deren Derivate wurden freundlicherweise von Dr. R. Abuknesha vom King's College, London (England) zur Verfügung gestellt. Die Struktur der Linker unterliegt der Geheimhaltung (\*). Anti-Microcystin (MC10E7) wurde freundlicherweise vom Arbeitskreis Dr. M.G. Weller, Institut für Wasserchemie, TU München, zur Verfügung gestellt. Alle Antikörper sind affinitätsaufgereinigt.

### 3.2. Verbrauchsmaterial und Puffer

ACN	Acetonitril	Fluka, Neu-Ulm
AMD	Aminodextran 120 kD	Herstellung im Arbeitskreis nach Anleitung von J. Piehler
AMD	Aminodextran 40 kD	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
BSA	Rinderserumalbumin	Sigma, Deisenhofen
Cy5.5	aktivierter Cyaninfarbstoff bisfunktional	Amersham Life Science, Braunschweig
DA-PEG	Diaminopolyethylenglykol	Rapp Polymere, Tübingen
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid	Sigma, Deisenhofen
DC-PEG	Dicarboxypolyethylenglykol	Rapp Polymere, Tübingen
DMF	Dimethylformamid	Fluka, Neu-Ulm
DMSO	Dimethylsulfoxid	Fluka, Neu-Ulm
Essig	Essigsäure	Fluka, Neu-Ulm
GOPTS	3-Glycidyoxypropyl-trimethylsiloxan	Fluka, Neu-Ulm
HCl	Salzsäure	Merck, Darmstadt
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30 % Wasserstoffperoxidlösung	Fluka, Neu-Ulm
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	rauchende Schwefelsäure	Sigma, Deisenhofen
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka, Neu-Ulm
KOH	Kaliumhydroxid	Fluka, Neu-Ulm
NaCl	Natriumchlorid	Fluka, Neu-Ulm
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat	Fluka, Neu-Ulm
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
NaOH	Natronlauge (5 N)	Fluka, Neu-Ulm
NHS	N-Hydroxysuccinimid	Fluka, Neu-Ulm
Ova	Ovalbumin	Sigma, Deisenhofen
Pepsin	Pepsin	Sigma, Deisenhofen
Propions.	Propionsäure	Fluka, Neu-Ulm
SDS	Natriumdodecylsulfat	Fluka, Neu-Ulm
Microcon	Mikrokonzentrador 30 kD	Millipore Corporation, Bedford, MA, USA
Säule	Sephadex G-25 Säule	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Tinte	absorbierende Tinte 485 23-9	Staedtler, Nürnberg

*Herstellung verschiedener Lösungen**Phosphatgepufferte Kochsalzlösung**(Phosphate buffered saline PBS)*

8.76 g Natriumchlorid (150 mmol) und 1.36 g Kaliumdihydrogenphosphat (10 mmol) werden mit deionisiertem Wasser auf 1 L aufgefüllt und 2 M Kalilauge auf pH 7.4 titriert.

*Carbonatpuffer pH 9.5*

10.6 g Natriumcarbonat (100 mmol) wird mit deion. Wasser auf 1 Liter aufgefüllt und mit 100 mM Natriumhydrogencarbonatlösung (8.4 g auf 1 L aufgefüllt) auf pH 9.5 eingestellt.

*Piranha-Lösung*

60 Vol% konzentrierte Schwefelsäure und 40 Vol% Wasserstoffperoxidlösung (30 %) werden gemischt und direkt weiter verwendet.

*synthetisches Abwasser*

nach DIN 38 412, L26

Stammlösung A: 32 g Pepton aus Casein, 22 g Fleischextrakt, 6 g Harnstoff, 1.4 g Natriumchlorid, 0.8 g Calciumchlorid, 0.4 g Magnesiumsulfat, in 1 L Trinkwasser.

Für die längere Haltbarkeit wurde diese Lösung autoklaviert (20 min, 120°C).

Stammlösung B: 33.5 g Dikaliumhydrogenphosphat in 1 Liter deionisiertem Wasser

Die Festsubstanzen wurden von Frau Schittko, AK Bilitewski TU Dresden, zur Verfügung gestellt. Beide Stammlösungen wurden im Kühlschrank gelagert.

1.5 ml der Lösung A und 0.25 ml der Lösung B wurden auf 600 ml mit Leitungswasser aufgefüllt. Dieses synthetische Abwasser wurde sofort verwendet.

*Pepsin-Regenerationslösung*

2 mg/ml Pepsin wird in deion. Wasser gelöst und PBS mit 2 N HCl auf pH 1.8 eingestellt. Die Pepsin-Lösung wird mit PBS im Verhältnis 1:9 gemischt und kann tiefgefroren mehrere Jahre aufbewahrt werden. Bei RT ist sie nur ca. 3 – 4 Tage haltbar.

*Acetonitril-Regenerationslösung*

50 Volumenteile Acetonitril werden mit 50 Volumenteilen deion. Wasser und einem Volumenteil Propionsäure gemischt.

*SDS-Regenerationslösung*

0.5 % SDS in deion. Wasser wird mit HCl (5 N) auf pH 1.9 eingestellt (falls die Lösung saurer ist, kann sie nicht zurücktitriert werden, sondern wird so eingesetzt).

### 3.3. Geräte

#### *RIANA*

Als TIRF-Sensor wurde der River-Analyser verwendet. Dieser Prototyp wurde in dem von der EU geförderten Projekt RIANA unter anderem in Zusammenarbeit mit PE Applied Biosystems, Überlingen, hergestellt. Das Gerät wird mit einem PC über eine AD-Karte (DAS 1601 Keithley Instruments, Germering) und ein mit Testpoint™ programmiertes RIANA Assay-Programm von A. Klotz gesteuert.

Das RIANA-Grundgerät besteht aus:

- einer 1 ml Hubkolbenspritze mit T-Ventil für das Cavro-Modul XL3000 von Tecan, Crailsheim;
- einer Probenschleife, bestehend aus einem Teflonschlauch mit ca. 2 ml Gesamtvolumen (ID = 0.8 mm) von Ismatec, Glattbrugg-Zürich (Schweiz);
- einem 6-Wege-Ventil (ID = 1.5 mm) mit einem Flusszellenschlauch (0.7 ml Gesamtvolumen, ID = 0.5 mm) von Ismatec, Glattbrugg-Zürich (Schweiz);
- einer Flusszelle aus Plexiglas mit gefrästem Flusskanal (ID = 0.35 µm) und Swagelok-Anschlüssen für Ein- und Auslass von Proliquid, Überlingen;
- einem bulkoptischen Transducer aus BK7 Glas mit der Größe 60 x 14 x 1.5 mm von Desag, Grünenplan, die 45°-Anschrägung und Polierung wurde von PE Applied Biosystems, Überlingen, vorgenommen;
- einer modulierten Laserdiode mit einer Wellenlänge von 635 nm und 15 mW Leistung von Coherent, Auburn (USA);
- sechs Polymerfasern mit einer Numerischen Apertur von 0.46;
- sechs Kantenfilter 700 EFLP mit einem Durchmesser von 25 mm, einer Dicke von 4.5 mm und einer maximalen Transmission von 90% von Omega Optical, Wörthsee;
- sechs Photodioden mit integriertem Vorverstärker OSI 5-100M/1K und 50 M/2 K von Eurodis, Stuttgart;
- einer Elektronik mit Lock-In-Verstärker, der innerhalb des Projekt speziell für dieses Gerät entwickelt wurde.

Im Laufe dieser Arbeit wurde der Autosampler ausgetauscht und damit die Fluidik des Geräts verändert. Außerdem wurde das RIANA Software-Programm entsprechend modifiziert.

Der erste Autosampler AS 91 von Perkin Elmer wird vom Controller AS90/AS91 gesteuert und besteht hauptsächlich aus einem beweglichen Arm mit einer Nadel (ID = 0.8 mm) und einem Probensteller für 160 Proben. Die Proben werden mit der Spritzenpumpe des RIANA-

Geräts durch die Nadel aufgesaugt. Der Autosamplerschlauch hat ein Gesamtvolumen von ca. 0.35 ml. Dieser Autosampler wird direkt mit der RIANA-Software angesteuert.

Später wird ein zweiter Autosampler verwendet, der HTC PAL von CTC Analytics, Zwingen (Schweiz), bezogen über Axel Semrau GmbH, Sprockhöfel. Er besteht hauptsächlich aus einer beweglichen 1 ml Spritze, einer Waschstation, einem Inject/Load-Ventil (Valco) mit sechs Anschlüssen, einem Probenhalter für 98 1-ml-Proben und einem Probenhalter für fünf 10-ml-Proben. Das Softwareprogramm Cycle Composer steuert den Autosampler über einen separaten PC. Die Kommunikation der beiden PCs erfolgt über eine Relais-Karte. Der Autosampler mischt die Proben selbstständig und injiziert sie über das Valco-Ventil in die eigene Probenschleife (Teflonschlauch, ca. 0.9 ml, ID = 0.8 mm, Ismatec, Glattbrugg-Zürich (Schweiz)).

### *RIFS*

Die Beschreibung der RIFS-Anlage ist bei Piehler (1997) zu finden.

### *Pipettierstation*

Die Pipettierstation von Canberra Packard, Dreieich, arbeitet mit vier 1-ml-Hubkolbenspritzen und dementsprechend vier Injektionsnadeln. Die Steuerung mit Hilfe des PCs erfolgt über das Programm Easyprep.

### *Verschiedenes*

Zum Tropfen der Oberflächenchemie wird ein Mikrodispenser von Microdrop verwendet, eine Kühlzentrifuge Labofuge 400 R Heraeus, Kendro Laboratory Products, Osterode und ein UV/Vis-Spektrometer Specord M500 von Analytikjena AG, Jena.



### 3.4. Methoden

#### 3.4.1. Oberflächenchemie und Fluoreszenzmarkierung

##### *Oberflächenbeschichtung*

Zur Beschichtung des Glatransducer werden zwei verschiedene Verfahren verwendet, eines für die Einzelanalyt-Messungen und ein anderes für die Multi-Analyt-Messungen. Bei den Einzelanalyt-Messungen wird der Transducer vollständig beschichtet. Diese Methode ist im Arbeitskreis für TIRF und RIFS Transducer etabliert und einfach durchzuführen. Bei den Multi-Analyt-Messungen wird eine orts aufgelöste Modifizierung der Transducer unter Verwendung eines Mikrodosiersystems benötigt. Ein genaues Spotten der Oberfläche ist jedoch nur mit Wasser, nicht mit Dimethylformamid gewährleistet. Da für den letzten Schritt der Modifizierung das Derivat in DMF gelöst wird, muss die Chemie für orts aufgelöste Modifizierung umgestellt werden.

In beiden Fällen wird zunächst die Glasoberfläche gereinigt und aktiviert. Dazu werden die Glasplättchen 30 min in eine frische Piranha-Lösung gelegt und anschließend mit deionisiertem Wasser gut abgespült. Nach dem Trocknen im Stickstoffstrom wird der Transducer mit 50 µl GOPTS belegt, ein zweiter darauf gelegt (Sandwichtechnik) und beide in einer trockenen Kammer gelagert. Nach 60 min werden die Transducer zügig mit trockenem Aceton abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Sodann muss der Transducer sofort weiter umgesetzt werden.

##### *Vollmodifikation eines Transducers*

Die aktivierten Transducer werden mit 50 µl Aminodextran-Wasser-Lösung (1:2) bedeckt und zusammengeklappt (Sandwichtechnik). Über Nacht werden sie in einer Wasserdampf-atmosphäre gelagert. Anschließend werden sie mit deionisiertem Wasser abgespült und getrocknet. In diesem Zustand sind sie über Jahre haltbar (Piehler et al. 1996).

Nun folgt die Umsetzung mit dem Derivat. Dazu wird ca. 5 mg des Derivats in wenig trockenem DMF gelöst und mit der 1.1-fachen Molmenge DCC in DMF gemischt. Diese Lösung wird auf den Transducer gegeben und wieder mit der Sandwichtechnik in einer mit DMF gesättigten Kammer mindestens 5 h gelagert. Danach werden die Transducer erst mit DMF und dann mit deionisiertem Wasser abgespült. Der fertige Transducer kann mindestens ein halbes Jahr bei RT und trockener Atmosphäre gelagert werden. Nach dem Einbau in den Sensor sollte er zunächst mindestens 1000 s mit Puffer in der Flusszelle equilibriert und im

Anschluss zweimal mit Ovalbumin (1 mg/ml) blockiert werden. Durch dieses Messprogramm wird der Transducer gleichzeitig mit Regenerationslösung gespült.

#### *Ortsaufgelöste Modifikation eines Transducers*

Der mit GOPTS aktivierte Transducer wird zügig mit einem Konjugat aus Derivat und Aminodextran mit Hilfe des Microdrop-Dosiersystem betropft. Der Spottedurchmesser beträgt 3 mm und der Abstand der Spots 6.5 mm. Das Konjugat wird aus dem Aktivester des Derivats und Aminodextran (40 kD) hergestellt. Dazu wird ca. 5 mg des Derivats in wasserfreiem DMF gelöst und die 1.1-fache Molmenge an NHS und die 1.5-fache Molmenge DCC (jeweils in DMF gelöst) zugegeben. Die Lösung wird schnell in Eis gekühlt und über Nacht geschüttelt. Ein weißer Niederschlag fällt aus (Harnstoffkristalle). Zur Bildung des Konjugats wird Aminodextran in einer Mischung aus Carbonatpuffer pH 9.5 und DMF (1:1) gelöst. 0.125 Moläquivalente Aktivester werden zur AMD-Lösung zugefügt. Die Lösung wird über Nacht geschüttelt. Anschließend wird das Konjugat mit Methanol gefällt, gewaschen und gefriergetrocknet. Das Konjugat wird in deionisiertem und gefiltertem Wasser gelöst (2 mg/ml). Mit dieser Lösung wird der Transducer per Mikrodosiersystem betropft, auf der Rückseite markiert und die noch freien Stellen des Transducers mit einer AMD-Wasserlösung (1:2) bedeckt (Barzen et al. 2002).

#### *Modifikation mit PEG*

Für die Kinetik-Messungen werden DA-PEG Transducer verwendet. Bei diesen wird genauso verfahren wie bei AMD-Transducer, nur dass statt einer AMD-Lösung eine PEG-Dichlormethanolösung (4 mg/ml) verwendet wird und die Sandwiches über Nacht im Ofen bei 70° C gelagert werden. Danach werden sie zügig mit warmen Wasser abgespült und analog den AMD-Schichten weiterverarbeitet.

#### *Derivatisierung des Microcystins*

Ein geschlossenes 5-ml-Schraubglas mit Rührfisch wird mit 300 µl deion. Wasser, 400 µl DMSO und 80 µl NaOH (5N) bestückt und mit Stickstoff geflutet. 200 mg Cysteamin (bei 4°C gelagert) wird in 200 µl HCl (rauchend) aufgelöst und zügig zum Gemisch gegeben. Der pH-Wert muss sofort kontrolliert und mit NaOH schnellstmöglich auf pH 11 eingestellt werden. Dann wird sofort 1 mg Microcystin, in 200 µl MeOH gelöst, zugegeben. Eine Stickstoffatmosphäre ist stets sicherzustellen, ohne die Lösungsmittel zu reduzieren. Die Lösung wird dann für eine Dauer von 2 h bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion dann

mit 200 µl deion. Wasser, 200 µl DMSO, 1380 µl Eisessig und 9000 µl Essigsäure (5 %ig) gestoppt. Nun wird mit einem Rotationsverdampfer bei leichter Wärme (ca. 40°C) die Lösung im Vakuum eingengt und über HPLC aufreingt (Gradient 100 % Wasser + 0 % ACN bis 0 % Wasser + 100 % ACN, innerhalb 20 min, Rückgradient innerhalb 5 min).

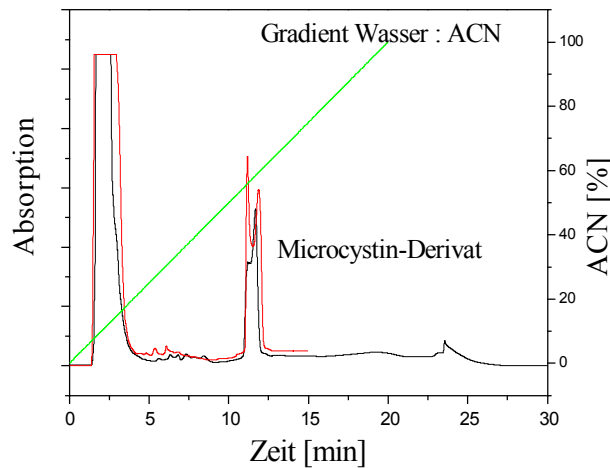


Abb. 9 HPLC-Lauf nach der Aminomodifizierung von Microcystin. Es sind zwei Probenläufe dargestellt.

#### Markierung der Antikörper

Um einen Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Cy5.5) zu markieren, wird der gelöste Antikörper mit Hilfe von Microcon in Carbonatpuffer (pH 9,5) überführt und zum Farbstoff gegeben (s. Anleitung des Herstellers). Hierbei muss sofort eine adäquate Durchmischung gewährleistet werden. Nach einer Stunde Schütteln wird die Lösung mit Hilfe der Ausschlusschromatographie vom Farbstoff getrennt. Dazu wird eine Sephadex-Säule mit PBS-Puffer eine Stunde equilibriert. Nach dem zügigen Auftragen des Antikörpers auf die Säule wird die Fraktion mit dem markierten Antikörper nach ca. 2.1 ml Vorlauf aufgefangen. Das Volumen der Fraktion liegt ungefähr bei 2 ml. Die Ausbeute und der Markierungsgrad wird entsprechend den Angaben des Herstellers mit einer UV/Vis-Messung bestimmt. Der Markierungsgrad sollte bei 2 liegen.

#### 3.4.2. TIRF mit RIANA Gerät

Der optische Aufbau des RIANA Gerätes besteht aus einer Laserdiode, die einen Abstand von ca. 2 - 5 cm vom Transducer hat. Über die angeschrägte Kante des Glastransducers wird das Laserlicht in diesen eingekoppelt, s. Abb. 10 (Klotz et al. 1998; Brecht et al. 1998). Durch Totalreflexion wird der Strahl innerhalb des Transducers weitergeleitet und am Ende von

einer schwarzen Schicht absorbiert. Die Reflexionspunkte befinden sich im Abstand von ungefähr 6.5 mm. An diesen Stellen entsteht oberflächennah in der Flusszelle ein evaneszentes Feld, in dem Fluoreszenzfarbstoffe angeregt werden können. Auf der Rückseite des Transducers leiten Polymerfasern die Fluoreszenz über Kantenfilter zu den Photodioden. Durch die eingesetzte Lock-In-Technik wird das Laserlicht moduliert, und nur die ankommende, entsprechend modulierte Strahlung wird detektiert. Dadurch wird das Rauschen, welches z.B. durch Umgebungslicht verursacht wird, verringert. Die Signale werden online mit dem PC aufgezeichnet.

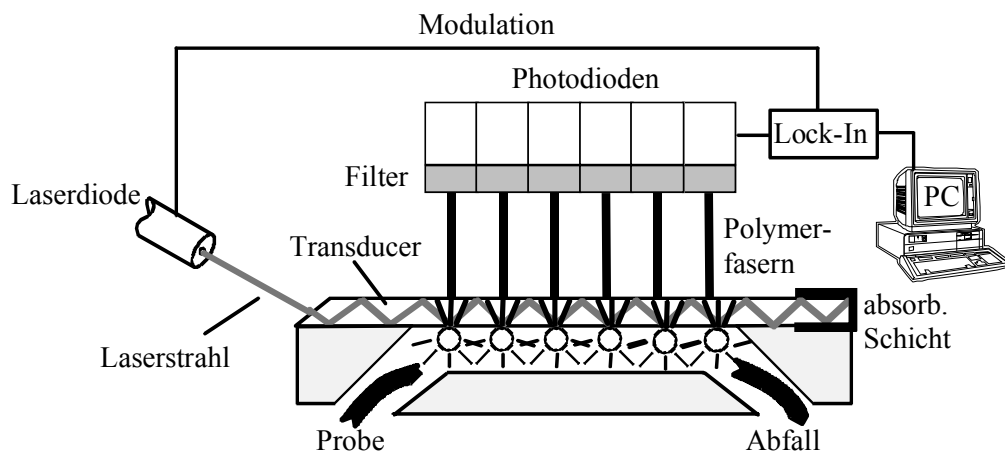


Abb. 10 Schematische Darstellung des optischen Aufbaus im RIANA-System mit Einkopplung des Lasers und Totalreflexion.

Da die Einsammeffizienz des Polymerleiters ohne Sammeloptik extrem gering ist, muss die Intensität des anregenden Lichts sehr stark sein, damit ein genügend hohes Signal detektiert werden kann. Als Folge wird der Farbstoff extrem schnell gebleicht. Deshalb kann die Bindung des Antikörpers an die Oberfläche nicht zeitaufgelöst gemessen werden. Stattdessen wird die Laserdiode während des Injizierens ausgeschaltet und erst wieder angeschaltet, wenn die Probe vollständig über den Transducer geflossen ist und die Flusszelle gewaschen wurde. Das höchste Signal ergibt nach Abzug der Basislinie (vor dem Injizieren) das eigentliche Signal, s. Abb. 11.

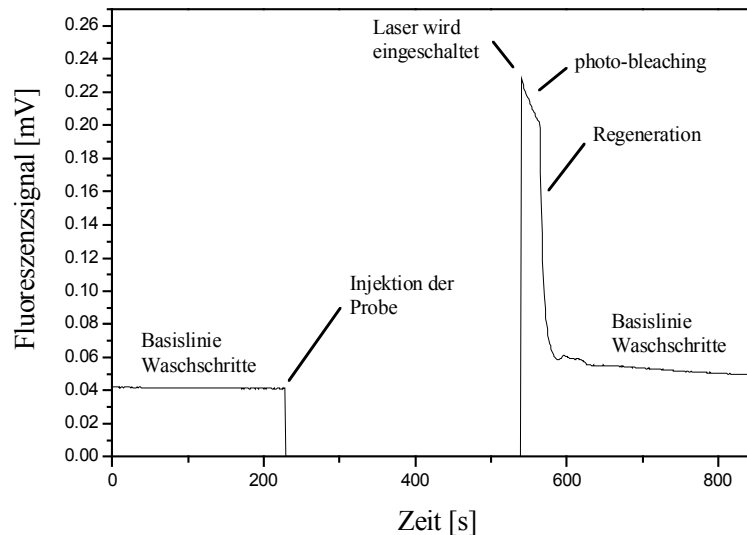


Abb. 11 Typische Messkurve bei der Bindung eines markierten Antikörpers an die Oberfläche.

Die Fluidik variiert bei den zwei verwendeten Autosamplern. Auf die Messungen hat es nur insofern Auswirkungen, dass die Genauigkeit der Fluidik mit dem PAL deutlich größer ist als vorher mit dem AS91.

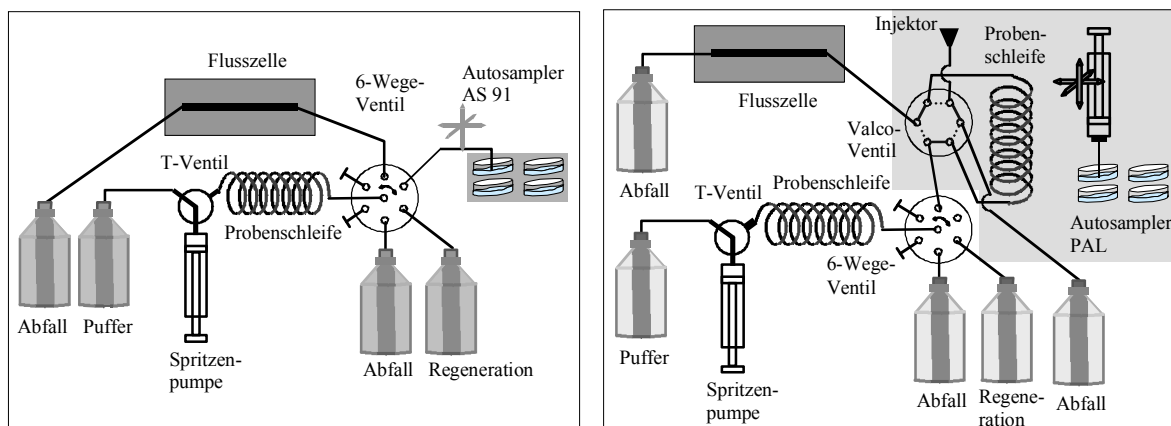


Abb. 12 Links ist die Fluidik mit dem AS91 Autosampler dargestellt, rechts die veränderte Fluidik mit dem PAL Autosampler.

Beim AS91 wird die Probe, die bereits den Antikörper enthält, mit Hilfe der Spritzenpumpe des RIANA-Geräts über die Autosamplernadel in die Probenschleife aufgesaugt und dann langsam durch die Flusszelle gepumpt, wobei die Probe, die sich noch im Totvolumen des Autosamplerschlauchs befindet (ca. 300  $\mu$ l), verloren geht.

Beim PAL wird die Probe vom Autosampler selbst gemischt und in die Probenschleife des Valcoventils injiziert. Danach pumpt die RIANA-Spritzenpumpe die Probe langsam über die Flusszelle. Dadurch kann zum einen mehr Probe verwendet werden, da es kaum zu Verlusten durch Totvolumina kommt. Zum anderen wird die Probe im RIANA nur einmal gepumpt,

aber nicht durch Aufsaugen dekomprimiert, wodurch eine geringere Dispersion entsteht und insgesamt eine deutliche Zeitersparnis zu verzeichnen ist. Zusätzlich kann der Antikörper direkt vor der Messung zur Probe gegeben werden. Dies hat mehrere Vorteile: Erstens ist das Zeitintervall zwischen Mischen und Messung immer gleich, zweitens wird der Antikörper geschont, da er sich nur relativ kurze Zeit in eventuell aggressiven Matrices befindet, und drittens kann der Antikörper im Vorratsgefäß gekühlt gelagert werden, ohne dass der komplette Probenteller gekühlt werden muss. Durch Verwendung dieses Autosamplers ergeben sich also immense Vorteile für die Messung, was sich anhand geringerer Standardabweichung bei Mehrfach-Messungen belegen lässt.

### 3.4.3. RfS

Bei der reflektometrischen Interferenz-Spektroskopie (RfS) wird ein Transducer aus Glas und einer Interferenzschicht ( $\text{Ta}_2\text{O}_5$  und  $\text{SiO}_2$ ) mit weißem Licht bestrahlt und das reflektierte Licht detektiert, um die optische Schichtdicke der modifizierten Interferenzschicht zu bestimmen. An jeder Grenzfläche wird das eingestrahlte Licht zu einem Teil reflektiert. Die reflektierten Strahlen überlagern sich, so dass ein Interferenzmuster entsteht, das vom Einstrahlwinkel, der Wellenlänge, der tatsächlichen Schichtdicke und dem Brechungsindex abhängt, s. Abb. 13. Im praktischen Aufbau wird eine senkrechte Einstrahlung des Lichts umgesetzt. Details finden sich in (Schmitt et al. 1997).

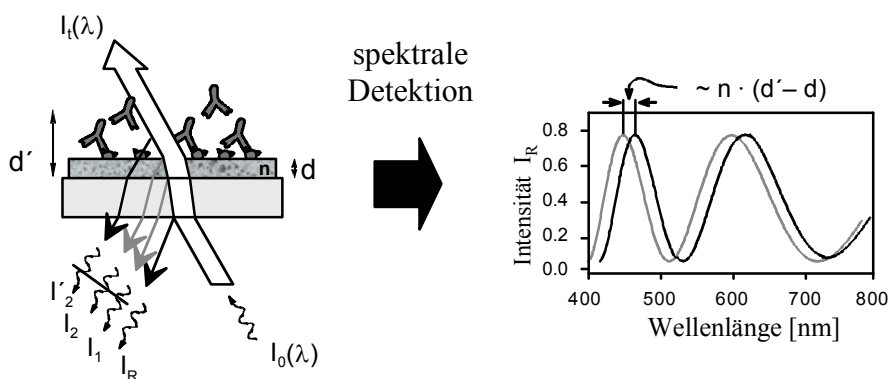


Abb. 13 Strahlengang im RfS-Transducer und Interferenzmuster bei verschiedenen Schichtdicken.

Die optische Schichtdicke  $n \cdot d$  kann dadurch bestimmt werden, dass über einen Parabelfit die Wellenlänge  $\lambda_{extr}$  eines Extremums bestimmt wird. Die optische Schichtdicke berechnet sich wie folgt (Gauglitz et al. 1993):

$$n \cdot d = \frac{m \cdot \lambda_{extr}}{2} \quad \text{Glg. 45}$$

wobei  $m$  die Ordnung des Extremums ist. Letztlich werden bei RIfS-Messungen nur relative Schichtdickenänderungen betrachtet. Da zeitaufgelöst gemessen werden kann, ist die Online-Verfolgung der Bindung des Antikörpers an die Oberfläche möglich. Prinzipiell ist die Sensitivität von Interferenzmethoden geringer als von Fluoreszenzmethoden und bei einem parallelen Aufbau ist auch die praktisch zu realisierende Sensitivität geringer. Zusätzlich bereiten schwierige Matrices, wie z.B. Abwasser, Probleme durch den Einfluss vom Brechungsindex bei RIfS. Deshalb wird RIfS in dieser Arbeit nur für die Charakterisierungsmessungen, unter Ausnutzung der zeitauflösende Messung, verwendet, nicht jedoch für die eigentlichen Kalibrierungsmessungen.

### 3.5. Datenauswertung bei Einzelanalyt-Kalibrierungen

Für die Berechnung von analytischen Qualitätsmerkmalen bei Einzelanalyt-Kalibrierungen werden sämtliche Analytkonzentrationen mindestens dreifach gemessen und damit die Kalibrierung robuster dargestellt. Der Blindwert wird neunmal bestimmt. Aus den erhaltenen Daten der Replika werden der Mittelwert  $\bar{y}$ , die Standardabweichung  $sd_y$  und aus denen der Blindwert-Messungen  $y_0$  die Erkennungsgrenze bestimmt. Diese stellt den  $y$ -Wert der Nachweisgrenze dar. Hier wird die allgemein übliche Definition benutzt, bei der der Studentfaktor gleich 1.5 gesetzt wird und die für homoskedatische Standardabweichungen gilt (Miller et al. 1988). Die Bestimmungsgrenze  $y_{qua}$  errechnet sich aus der zehnfachen Blindwertstandardabweichung. Die Standardabweichung der Umkehrfunktion  $sd_x$  berechnet sich aus  $sd_y$  und der Steigung  $y'$  der Kurve in dem Punkt, wenn als Näherung ein linearer Zusammenhang gewählt wird (Dudley et al. 1985). Mit  $sd_x$  lässt sich der Variationskoeffizient  $x_{cv,i}$  eines Wertes bestimmen, aus dem ein Präzisionsprofil resultiert, welches die Präzision einer Kalibrierung angibt. Die Präzision entspricht dem höchsten Variationskoeffizienten innerhalb des Arbeitsbereichs.

$$\bar{y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i \quad \text{Glg. 46}$$

$$sd_y = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad \text{Glg. 47}$$

$$y_{dec} = y_0 + 3 \cdot sd_y \quad \text{Glg. 48}$$

$$y_{qua} = y_0 + 10 \cdot sd_y \quad \text{Glg. 49}$$

$$sd_x = \frac{sd_y}{y'} \quad \text{Glg. 50}$$

$$x_{cv,i} = \frac{sd_{x_i}}{x_i} \cdot 100 \quad \text{Glg. 51}$$

Die Kurvenanpassung einer Kalibrierkurve erfolgt mit der Logistik-Funktion (Dudley et al. 1985).

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2 \quad \text{Glg. 52}$$

Hier ist  $A_1$  der höchste y-Wert,  $A_2$  der kleinste und  $x_0$  der Testmittelpunkt.  $p$  ist der „Steigungsfaktor“.

Um die Richtigkeit einer Kalibrierung festzustellen, lässt sich die Wiederfindungsrate ermitteln. Dazu werden Realproben, deren Analytkonzentrationen mit HPLC-Methoden bestimmt wurden, mit dem Sensor gemessen und die Daten verglichen, oder es werden Matrizes verwendet, die den entsprechenden Analyten in nicht nachweisbaren Konzentrationen enthalten und mit diesem Analyten aufgestockt („gespiked“) werden.

Die Wiederfindungsrate  $WFR$  für Testproben ergibt sich aus dem Mittelwert der Replikamessungen  $\bar{x}$  und dem wahren Wert  $x_w$ :

$$WFR = \frac{\bar{x}}{x_w} \cdot 100 \quad \text{Glg. 53}$$

### 3.6. Datenauswertung mit ANN

Die neuronalen Netze (Artificial Neural Networks, ANN) beruhen nicht auf einem starren Modell mit festen Parametern wie die klassischen statistischen Methoden. In Anlehnung an die Biologie übernimmt ein flexibles Netzwerk die Berechnungen. Ein Netz besteht aus verschiedenen einfachen Einheiten (Neuronen), die gerichtet miteinander verbunden sind. Über diese Verbindungen (Links) werden die Informationen verarbeitet. Während einer Trainingsphase mit Kalibrierdaten lernt das Netz, wobei ein Feedforward-Backpropagation-Netz verwendet werden kann. Das bedeutet, dass die Anpassung der Netze in umgekehrter Richtung im Vergleich zu dem Datenfluss erfolgt. Durch veränderte Gewichtungsfaktoren für die Links werden die Netze trainiert und können mit dem pruning- oder greedy-Verfahren auf- bzw. abgebaut werden. Ein neuronales Netz ist damit extrem flexibel und kann auch nichtlineare Probleme kalibrieren.

Die Netze bestehen aus mehreren Ebenen. Die Eingabeschicht enthält so viele Neuronen, wie Signalerzeuger vorhanden sind. In dieser Arbeit ist dies die Anzahl der Spots, deren Signale in das Netz eingegeben werden. Über eine oder zwei versteckte Schichten werden die eingegebenen Signale verarbeitet, wobei über Gewichtungsfaktoren der Links, Aufsummierung aller genutzten Links, Aktivierungsfunktion (tanh) und Ausgabefunktion (lineare Transformation) die berechneten Werte an die Ausgabeschicht weitergegeben werden. Der Wert der Aus-



gabeschicht entspricht der Konzentration eines Analyts. In der vorliegenden Arbeit werden Netze mit zwei versteckten Schichten mit fünf bzw. drei Neuronen verwendet, s. Abb. 14. Im Netz sind alle Links aktiv.

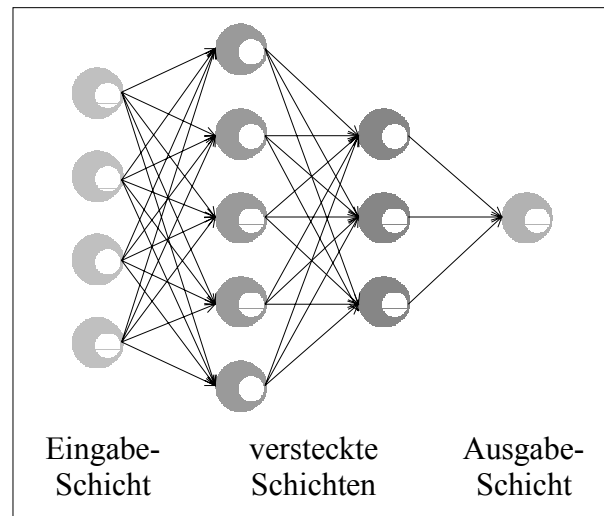


Abb. 14 Netzwerktopologie eines neuronalen Netzes mit Eingabe-, Ausgabe- und versteckten Neuronen, wobei zwei versteckte Schichten verwendet werden.

Es wird in dieser Arbeit eine weiterentwickelte Methode des Backpropagation-Netzes verwendet, das einen Algorithmus benutzt, der „scaled conjugate gradient“ genannt wird (Moller 1993). Mit diesem Algorithmus konvergiert die Berechnung schneller als mit dem Standard-Backpropagation-Algorithmus. Dieser kann besser mit lokalen Minima umgehen und ist robuster gegenüber der Änderung der Anfangsparameter.

Durch Training eines vollverdrahteten Netzes mit möglichst vielen Daten werden die Gewichtungsfaktoren der Links verändert. Während des Trainings wird das Netz mit der Kreuzvalidierung überprüft und verbessert. Nach Abschluss des Trainings wird die Güte des Netzes mit einem Testdatensatz überprüft, der nicht für die Kalibrierung genutzt wurde. Bei ausreichender Rechenzeit können gleich mehrere Netze mit den Kalibrierdaten trainiert und mit den Testdaten überprüft und gemittelt werden. So erhält man eine viel robustere Aussage über das Netz und die Kalibrierung.

Um das Problem des Auswendiglernens durch „overtraining“ zu vermeiden, wird das early-stopping-Prinzip angewendet (Sarle 1995). Bei dieser Methode wird das Training abgebrochen, wenn die Kreuzvalidierung einen steigenden Fehler aufweist. Durch weiteres Training ließe sich nur der Fehler der Trainingsdaten verringern, der Fehler der Kreuzvalidierdaten würde hingegen ansteigen. Details zu den verwendeten Netzen und Methoden, mit denen die Daten in dieser Arbeit ausgewertet wurden sind bei (Dieterle 2003) zu finden. Für die

Berechnungen wurde der Stuttgart Neuronale Netzwerk Simulator verwendet (Zell 2002; Rapp 1996).

Als Qualitätsmerkmal einer Kalibrierung kann sowohl die Nachweisgrenze angegeben werden, als auch der „root mean square“-Fehler (RMSE).

Die Nachweisgrenze ist schwieriger zu bestimmen als bei Einzelanalyt-Kalibrierungen. Mehrere Gruppen haben sich mit dieser Thematik beschäftigt (Currie 1997; Faber et al. 1997; Geiß et al. 2001). Da bei den in dieser Arbeit gemessenen Kalibrierungen die Standardabweichungen heteroskedatisch sind und oft eine systematische Abweichung in den vorhergesagten Daten zu finden ist, wird die Nachweisgrenze aus Glg. 54 berechnet (Currie 1997).

$$x_0 + t_{1-\alpha, f_1} s_0 \leq x_{lod} - t_{1-\beta, f_2} s_{lod} \quad \text{Glg. 54}$$

Hierbei ist  $x_0$  die vorhergesagte Konzentration für die Blindwerte,  $t$  der einseitige Studentfaktor für die entsprechende Anzahl an Freiheitsgeraden  $f$ , wobei die Parameter  $\alpha$  und  $\beta$  auf 0.05 Irrtumswahrscheinlichkeit gesetzt sind,  $s_0$  die Standardabweichung des Blindwertes,  $x_{lod}$  die vorhergesagte Konzentration der Nachweisgrenze und  $s_{lod}$  die zugehörige Standardabweichung. Hierbei ist die Nachweisgrenze als die nächste, „nachweisbare“ Konzentration definiert, die kalibriert worden ist.

Das RMSE-Rauschen (root mean square error) ist das Fehlermaß für die Datenvorhersage. Es berechnet sich folgendermaßen:

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2} \quad \text{Glg. 55}$$

Hier ist  $\hat{y}_i$  der vom Modell vorhergesagte Wert und  $y_i$  der wahre bzw. experimentelle Wert.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

Zum Aufbau eines Multi-Analyt-Assays müssen zunächst die einzelnen Substanzen charakterisiert werden, d.h. die Bindungskapazität, kinetische Konstanten, Affinitätskonstanten und Kreuzreaktivitäten müssen bestimmt werden. Ebenso ist die Stabilität der Antikörper und der Oberflächen zu untersuchen, um Einzelanalyt-Kalibrierungen zu etablieren und optimieren. Mit diesen Ergebnissen können dann die Multi-Analyt-Kalibrierungen aufgebaut werden, wobei zunächst binäre Mischungen verwendet werden, bevor auf ternäre Mischungen übergangen wird.

### 4.1. Charakterisierung für den Estrogen-Assay und Bisphenol A-Assay:

#### 4.1.1. Bindungskapazität

Zur Herstellung von Transducern für Kalibrierungen muss die Bindungskapazität der Oberfläche sehr hoch sein. Dazu muss eine große Konzentration an Derivat auf der Oberfläche immobilisiert und zugänglich sein. Zusätzlich muss die Affinität des bindenden Antikörpers zum Derivat sehr hoch sein. Zu diesem Zweck werden Transducer mit verschiedenen Derivaten modifiziert und dann mit RI/S charakterisiert. Dazu wird der Transducer zunächst mit einem beliebigen Protein, in diesem Fall Ovalbumin (1mg/ml), auf unspezifische Bindung getestet. Ist diese nicht vorhanden, wird die spezifische Bindung untersucht, indem man eine große Konzentration an spezifischem Antikörper injiziert und die Höhe der Bindungskurve (Bindungskapazität) verschiedener Antikörper auf verschiedenen Derivaten vergleicht. Die Messkurven in Abb. 15 sind ein Beispiel für die Charakterisierung von DE<sub>21</sub> mit den zwei Antikörpern Anti-E<sub>1</sub> und Anti-ES (jeweils 50 µg/ml).

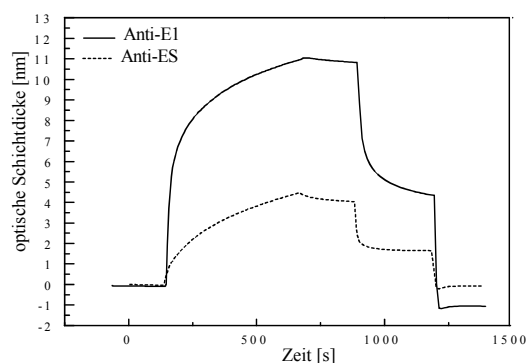


Abb. 15 Bestimmung der Bindungskapazität des Derivats DE<sub>21</sub> mit den zwei Antikörpern Anti-E<sub>1</sub> und Anti-ES (jeweils 50 µg/ml) unter Verwendung von RI/S als Detektionssystem; mit dem maximalen Bindungssignal wird die Bindungskapazität berechnet.

Tab. 6 Bindungskapazitäten [optische Schichtdicke in nm] verschiedener Derivate (Maximalsignal bei Zugabe von 50 µg/ml Antikörper); Abk. s. Tab. 2.

Derivat	Anti-E <sub>1</sub>	Anti-ES	Anti-BPA
DE <sub>1</sub>	<b>10.2</b>	2.9	0.2
DE <sub>2</sub> 1	<b>14.9</b>	3.5	0.4
DE <sub>2</sub> 2	<b>12.1</b>	2.6	0.1
DEE <sub>2</sub> 1	2.6	<b>8.4</b>	2.3
DEE <sub>2</sub> 2	1.1	2.1	1.1
DBPA1	0.7	4.0	<b>17.1</b>
DBPA2	0.8	0.9	<b>11.1</b>

Für Anti-E<sub>1</sub> zeigen die Derivate DE<sub>1</sub>, DE<sub>2</sub>1 und DE<sub>2</sub>2 die höchste Bindungskapazität (fett geschriebene Werte), allerdings steht DE<sub>2</sub>2 nur in sehr begrenzten Mengen zur Verfügung. Für Anti-ES ist DEE<sub>2</sub>1 geeignet. Für Anti-BPA sind die Derivate DBPA1 und DBPA2 passend, wobei letzteres verwendet wurde, da es von den beiden anderen Antikörpern nicht erkannt wird.

Bei der Verwendung von Transducern, die nicht vollständig, sondern nur lokal modifiziert sind, ist die Bindungskapazität herabgesetzt. Dies resultiert daraus, dass das Dextran mit 40 kD eine geringere Aminomodifizierung (ca. 3 %) aufweist als das Dextran mit 250 kD (ca. 10 %), welches zu voluminös für die Piezopipetten des Microdrop-Systems ist. Weiterhin wird das Derivat nicht erst auf der Oberfläche an das Dextran gekoppelt, sondern schon vorher in einer Lösung, während bei der Vollmodifizierung das Dextran bereits kovalent auf der Oberfläche fixiert ist und alle restlichen Aminogruppen für die Umsetzung mit dem Derivat zur Verfügung stehen. Bei der Ankopplung in Lösung muss mindestens die Hälfte der Aminofunktionen zur Anbindung an die Oberfläche frei bleiben. Diese sind statistisch verteilt, so dass insgesamt weniger und schwerer zugängliche Bindungsstellen entstehen. In Abb. 16 werden verschiedene Oberflächenmodifikationen verglichen, die mit der RfS-Methode charakterisiert worden sind. Die Messungen werden mit 25 µg/ml Anti-E<sub>1</sub> auf verschieden modifizierten DE<sub>1</sub>-Oberflächen durchgeführt. Zwischendurch wird mehrfach regeneriert.

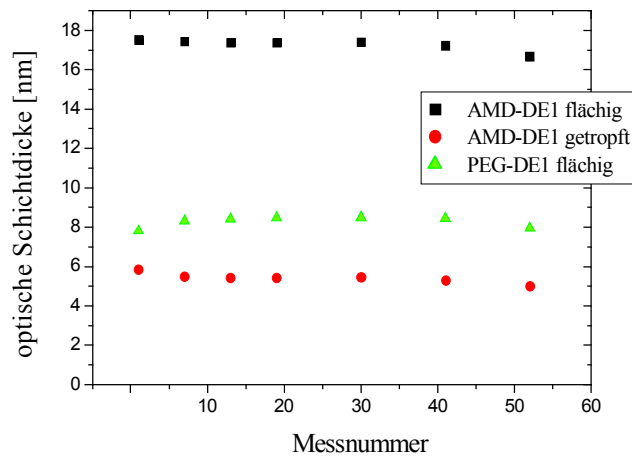


Abb. 16 Vergleich verschiedener  $DE_1$ -modifizierter Oberflächen mit jeweils  $25 \mu\text{g/ml}$  Antikörper; nach jeder Bindung wird die Oberfläche mehrfach regeneriert.

Die AMD- $DE_1$  Oberfläche zeigt, wie erwartet, das höchste Signal mit ca. 17.4 nm optischer Schichtdicke. Die PEG- $DE_1$  beschichtete Oberfläche erreicht nur 45 % der Bindungskapazität der AMD Oberfläche und die getropfte Oberfläche sogar nur 33 %. Bei letzteren überschreitet man auch bei Messungen mit geringen Antikörperkonzentrationen, wie z.B. bei Kalibrierungen, leicht den massentransport-limitierten Bereich. Dies führt zu einer Einflussnahme der Antikörper-Derivat-Bindung auf das Gleichgewicht zwischen Antikörper und Analyt, die bei einer Multi-Analyt-Kalibrierung mit kreuzreaktiven Antikörpern erwünscht ist.

#### 4.1.2. Kinetik

Zur Bestimmung von Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten kann ebenfalls die RfS-Methode verwendet werden. Dazu muss ein Transducer hergestellt werden, bei dem gewährleistet ist, dass die Bindung eines Antikörpers an die Oberfläche nur von der eigentlichen Bindungskinetik, nicht jedoch von Diffusionsprozessen zur Oberfläche hin oder innerhalb der Oberflächenschicht beeinflusst wird. Die Oberfläche wird mit Diamino-PEG modifiziert, das durch seine büstenartige Struktur nur Bindungsstellen anbietet, die sich an der Oberfläche befinden und nicht innerhalb der PEG-Schicht. Bei der Belegung der Oberfläche mit nur geringen Mengen an Derivat wird der Bindungsschritt des Antikörpers an die Oberfläche geschwindigkeitsbestimmend. Außerdem ist die unspezifische Bindung auf PEG minimal. Mit verschiedenen Antikörpern werden Bindungskurven aufgenommen und entsprechend Kapitel 2.2.5 die Krümmung angepasst. Für den Anpassungsbereich werden nur die Punkte ausgewählt, deren Ableitung des Signals gegen das Signal aufgetragen auf einer Geraden liegen, denn nur dieser Bereich entspricht der Exponentialfunktion. Typische

Bindungskurven sind in Abb. 17 dargestellt. Da es sich hier ausschließlich um polyklonale Antikörper handelt, sind die erhaltenen Konstanten nur mittlere Werte.

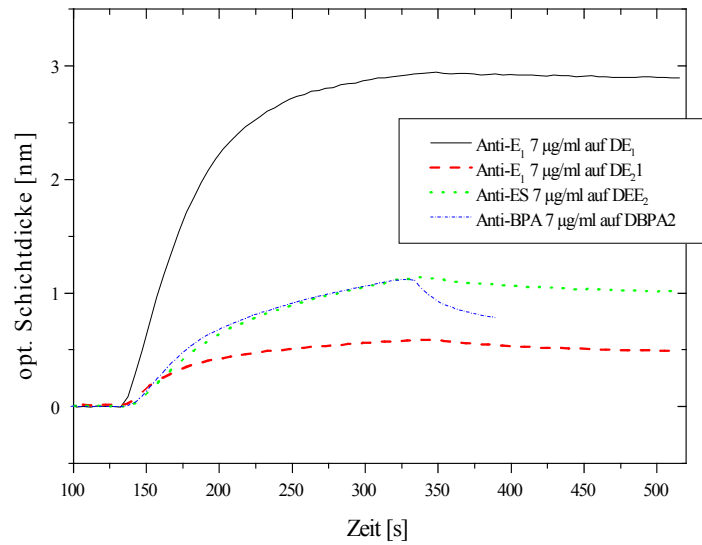


Abb. 17 Beispiel für RfS-Assoziationskurven von Antikörpern ( $7 \mu\text{g/ml}$ ) auf verschiedenen Derivaten. Die Krümmung wird durch die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante, die Höhe durch die Bindungsstellenkapazität und die Affinität der jeweiligen Oberfläche bestimmt.

Durch Auftragen der erhaltenen  $k_{obs}$ -Werte gegen die Konzentration können die Größen von  $k_{ass}$  und  $k_{diss}$  berechnet werden, s. Abb. 18. Aufgrund der hohen Standardabweichung bei einigen Messungen sind vor allem die  $k_{diss}$ -Werte nur ungefähre Angaben.

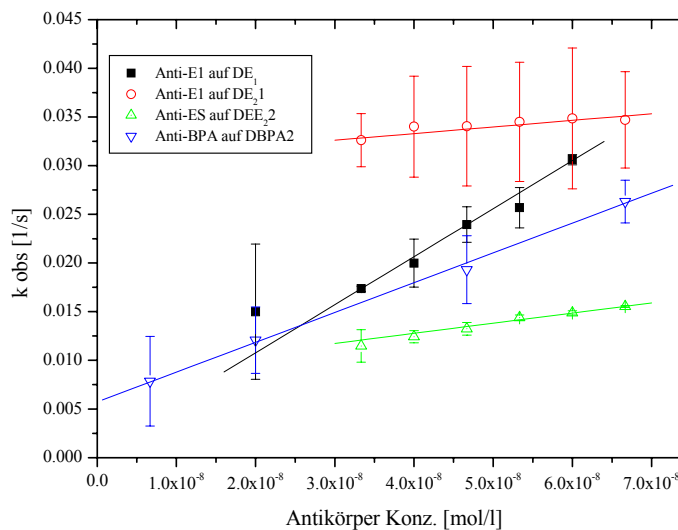


Abb. 18 Die Auftragung der  $k_{obs}$ -Werte gegen die Antikörperkonzentration ergibt eine Gerade, deren Steigung der  $k_{ass}$  und deren Achsenabschnitt der  $k_{diss}$  entspricht.

Die erhaltenen Konstanten sind in Tab. 7 aufgelistet. Die Standardabweichungen resultieren aus der linearen Anpassung bei der Auftragung der Konzentration gegen  $k_{obs}$ , der eigentliche Fehler von  $k_{obs}$  ist jedoch nicht berücksichtigt. Die ermittelten Affinitätskonstanten sind vergleichsweise gering, da meist eine Affinität von  $10^9$  l/mol zu erwarten ist. Hier soll noch einmal auf die Fitprobleme hingewiesen werden, s. auch Kapitel 2.2.5. Außerdem ist das Flussprofil nicht exakt, da darauf verzichtet wird, die Probe mit Luftpolstern vom Fließpuffer zu separieren. Dieses hat ebenso Einfluss auf die Konstanten.

Tab. 7 *Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten, so wie daraus berechnete Affinitätskonstanten für ausgewählte Antikörper-Derivat Reaktionen*

Antikörper	Derivat	$k_{ass}$ $l\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_{diss}$ $\text{s}^{-1}$	$K=k_{ass}/k_{diss}$ $l\text{mol}^{-1}$
anti-E <sub>1</sub>	DE <sub>1</sub>	$(4.93 \pm 0.11) 10^5$	$(9.03 \pm 4.54) 10^{-4}$	$5.46 10^8$
anti-E <sub>1</sub>	DE <sub>2</sub> 1	$(6.78 \pm 1.46) 10^4$	$(3.06 \pm 0.07) 10^{-2}$	$2.22 10^6$
anti-ES	DEE <sub>2</sub> 1	$(1.23 \pm 0.07) 10^5$	$(7.50 \pm 0.36) 10^{-3}$	$1.64 10^7$
anti-BPA	DBPA2	$(3.06 \pm 0.11) 10^5$	$(5.72 \pm 0.56) 10^{-3}$	$5.35 10^7$

Die kinetischen Daten wurden nur für die Derivate aufgenommen, die bei den Kalibrierungen Anwendung gefunden haben.

### 4.1.3. Affinitätskonstante

Die thermodynamische Affinitätskonstante lässt sich auf zwei verschiedene Arten bestimmen. Im vorherigen Kapitel wurde bereits die Methode über die Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante beschrieben. Sie lässt sich aber nur für Systeme bestimmen, bei denen der eine Partner (das Derivat) auf der Oberfläche immobilisiert ist. Außerdem ist bei der verwendeten Anpassungsmethode für die kinetische Messung die Dissoziationsratenkonstante mit einem großen Fehler behaftet, der direkt in die Affinitätskonstante eingeht.

Um die Affinität eines Antikörpers zu verschiedenen Analyten in Lösung zu bestimmen, muss eine Kalibrierkurve mit einem Bindungshemmtest aufgenommen werden. Dazu wird ein Transducer mit hoher Bindungsstellenbeladung (AMD-Derivat, s. Kapitel 3.4.1) hergestellt. Die Proben bestehen aus verschiedenen Konzentrationen von Analyt, inkubiert mit einer bestimmten, möglichst geringen Konzentration an Antikörper in PBS. Zusätzlich wird noch Ovalbumin in hoher Konzentration (200 µg/ml Probe) zugefügt, um die unspezifische Bindung des Antikörpers an Schläuche etc. zu verhindern. Analyt und Antikörper werden solange

inkubiert, bis sich ein dynamisches Gleichgewicht einstellt. Da es sich um eine sehr schnelle Reaktion handelt, ist das Gleichgewicht innerhalb von Minuten erreicht. Die gemischte Lösung wird in einem konstanten, aber langsamen Fluss (ca. 0.2 ml/min) über den modifizierten Transducer gepumpt. Durch den ständigen Fluss kann sich das Gleichgewicht zwischen Antikörper, Analyt und Derivat nicht einstellen. Nur die nicht durch den Analyten inhibierten Antikörper können an die Derivate auf der Oberfläche binden. Das Signal ist somit linear proportional zur freien Antikörperkonzentration. Bei der TIRF-Messung lässt sich dieses jedoch nicht beobachten, da auf Grund des starken Photobleachings eine zeitaufgelöste Messung nicht möglich ist. Für die Kalibrierkurve wird eine gleichbleibende Antikörperkonzentration mit verschiedenen Analytkonzentrationen titriert. Der Signalunterschied wird gegen die Analytkonzentration aufgetragen und mit der Logistik-Funktion angepasst. Aus dem erhaltenen Testmittelpunkt lässt sich die Affinitätskonstante, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, berechnen.

*Tab. 8 Vergleich der Affinitätskonstanten der verwendeten Antikörper zu verschiedenen Analyten. Da es sich um polyklonale Antikörper handelt, ist die Affinitätskonstante nur ein mittlerer Wert. Die aktiven Konzentrationen sind aus (Bucher 1999) entnommen.*

Antikörper	Analyt	Derivat	Testmittelpunkt Affinitätskonst.	
			µg/l	l/mol
Anti-E <sub>1</sub>	E <sub>1</sub>	DE <sub>1</sub>	0.29	2.93 10 <sup>11</sup>
Anti-E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	DE <sub>1</sub>	1.66	5.59 10 <sup>8</sup>
Anti-ES	E <sub>1</sub>	DEE <sub>2</sub> 1	0.62	1.6 10 <sup>9</sup>
Anti-ES	E <sub>2</sub>	DEE <sub>2</sub> 1	0.24	2.61 10 <sup>10</sup>
Anti-ES	EE <sub>2</sub>	DEE <sub>2</sub> 1	0.84	1.58 10 <sup>9</sup>
Anti-ES	BPA	DEE <sub>2</sub> 1	2496.35	2.21 10 <sup>5</sup>
Anti-BPA	BPA	DBPA2	0.71	3.23 10 <sup>9</sup>

Die erhaltenen Affinitätskonstanten in Tab. 8 bewegen sich größtenteils im Bereich von 10<sup>8</sup> – 10<sup>11</sup> l/mol, wie es für die Antikörper erwartet wird. Nur für BPA mit Anti-ES erhält man einen deutlich kleineren Wert, da die strukturelle Ähnlichkeit zu dem speziellen Analyten, in diesem Fall dem Steroidgerüst der Estrogene, nur gering ist. Aus den Testmittelpunkten dieser Messungen lässt sich die Kreuzreaktivität nicht berechnen, da nicht die gleichen Antikörperkonzentrationen verwendet wurden.



#### 4.1.4. Kreuzreaktivität

Die mathematische Definition der Kreuzreaktivität  $KR$  von Abraham, s. Glg. 37, setzt die Testmittelpunkte des Standardanalyten und des Kreuzreagenzes ins Verhältnis, wobei der Testmittelpunkt des Kreuzreagenzes 100 % darstellt. Die Aussage, dass man bei einer Kreuzreaktivität von 10 % zehnmal soviel Kreuzreagenz braucht wie Standardanalyt, um das gleiche Signal zu erhalten, gilt nur, wenn die Parameter der Logistik-Funktion für die mathematische Anpassung, s. Glg. 52, bei beiden Kalibrierkurven bis auf den Testmittelpunkt  $x_0$ , gleich sind. Das bedeutet, dass beide Kalibrierungen jeweils auf 0 % bis 100 % normiert sind, und dass der Exponent  $p$  identisch ist. Die Fragen, die sich hierbei stellen, sind:

1. Ist eine Referenzierung von 0 % auf 100 % für beide Kalibrierungen mit den jeweiligen Rohwerten für 0  $\mu\text{g/ml}$  des entsprechenden Analyts und unendlich viel Analyt sinnvoll?
2. Erhält man bei der Referenzierung der Kreuzreagenz-Kalibrierungen mit den Rohwerten der Kalibrierung des Standardanalyten auch automatisch eine 0 % bis 100 % Referenzierung?
3. Ist der Steigungsfaktor  $p$  bei einem Antikörper für verschiedene Analyten mit und/oder ohne Referenzierung konstant?

Die erste Frage ist nur dann mit ja zu beantworten, wenn gleichzeitig auch die zweite Frage positiv zu beantworten ist. Denn nur wenn die Ableitung der Affinitätskonstante aus Kapitel 2.2.3 gültig ist, ist der Antikörper bei unendlicher Analytkonzentration, unabhängig von seiner Affinitätskonstante, vollständig inhibiert und ergibt kein Bindungssignal. Der Gültigkeitsbereich beschränkt sich zudem auf monoklonale Antikörper. Außerdem muss der Einfluss der Rückbindung und der unspezifischen Bindung unterdrückt werden.

Befindet man sich nicht in diesem Gültigkeitsbereich, weil z.B. polyklonale Antikörper betrachtet werden, ist eine Referenzierung für jeden einzelnen Analyten nicht sinnvoll. Mit der Aussage, dass man zehnmal soviel Kreuzreagenz wie Standardanalyt braucht, um das gleiche Signal zu erzeugen, sind eigentlich nicht die jeweils referenzierten Signale gemeint, sondern die vergleichbaren unreferenzierten Werte.

Die dritte Frage lässt sich mit nein beantworten, da bei Vergleich der Logistik-Funktion Glg. 52 mit der Affinitätsfunktion Glg. 36 sofort zu erkennen ist, dass  $p$  eine Funktion der Affinitätskonstante ist.

Ist zumindest die Referenzierung mit dem Standardanalyten möglich, dann stimmt die Aussage bei 50 % des Signals, da dort die Kreuzreaktivität berechnet wurde. Für alle anderen

Signalwerte ist die Aussage nicht mehr gültig. Insbesondere bei hohen Signalen, also bei kleinen Analytkonzentrationen, wäre ein aussagekräftiger Wert wünschenswert.

Aus diesen Betrachtungen ist zu schließen, dass zum einen die Referenzierungsstrategien überprüft werden müssen. Zum anderen sollte noch der experimentelle Beweis geführt werden, dass der Steigungsfaktor  $p$  für einen Antikörper nicht konstant ist. Außerdem ist ein Modell zu finden, das es erlaubt, den Einfluss des Kreuzreagenzes auf eine Kalibrierung darzustellen. Damit kann der Fehler, den das Kreuzreagenz auf eine Standardanalyt-Kalibrierung ausübt, berechnet werden. Eine neue Definition der Kreuzreaktivität, die für alle Antikörper bei sämtlichen Konzentrationen des Standardanalyten gültig ist, würde sich jedoch nicht auf einen Faktor beschränken, sondern eine komplizierte Gleichung darstellen und wäre damit für eine allgemeine Etablierung bei Immunoassays ungeeignet.

#### *Referenzierung der Kalibrierungen und Anpassung des Steigungsfaktors*

Um zu überprüfen, ob der Parameter der Logistik-Funktion  $p$  (Steigungsfaktor) bei verschiedenen Analyten, die mit dem gleichen Antikörper kalibriert werden, gleich ist, wird der polyklonale Antikörper Anti-ES mit verschiedenen Analyten kalibriert und die Kurven mit der Logistik-Funktion angepasst. Dazu werden die Rohsignale zunächst nur auf 100 % normiert, indem das Signal durch das Signal des Blindwerts dividiert wird. Als zweites wird dieses Ergebnis mit der Referenzierung auf 0 % und 100 % verglichen, dabei werden die Signale zusätzlich auf das Signal eines Analyten bei höchster Konzentration bezogen. Da der Parameter  $A_2$  bei den beiden Derivaten DEE<sub>2</sub>1 und DEE<sub>2</sub>2 gleich ist und zusätzlich das niedrigste Signal für alle Kalibrierungen darstellt, sind alle Kalibrierungen mit diesem Parameter angepasst worden. Als dritter Fit wird zusätzlich noch der Parameter  $p$  festgehalten, in diesem Fall mit dem  $p$ -Wert, der für DEE<sub>1</sub>1 erhalten wird. In Abb. 19 sind die Kalibrierungen mit ihren Fitfunktionen gezeigt.

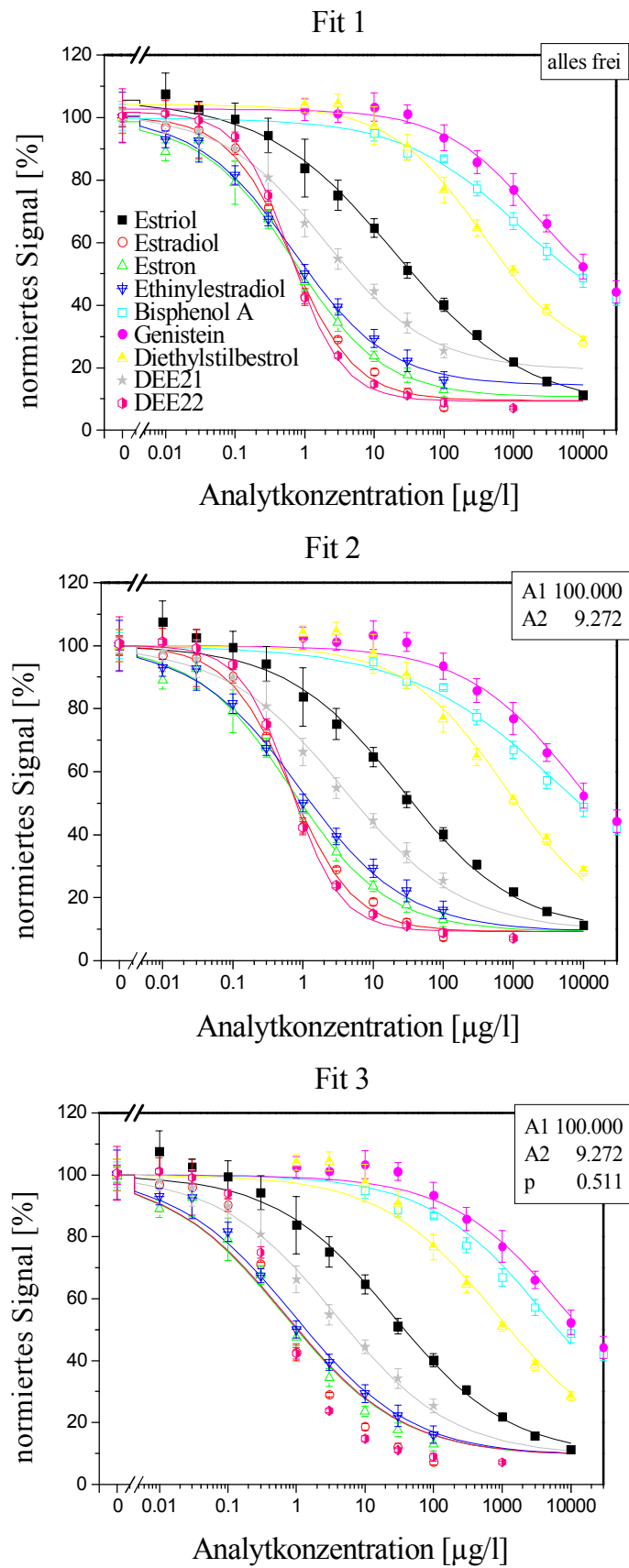


Abb. 19 Logistik-Funktionen mit unterschiedlichen Parametern für Anti-ES (0.3 µg/ml) und verschiedene Analyte; bei Fit 1 sind alle Parameter frei, bei Fit 2 sind  $A_1$  und  $A_2$  für alle Kalibrierungen gleich und bei Fit 3 zusätzlich noch  $p$ .

Grafisch betrachtet, ist der Unterschied zwischen Fit 1 und Fit 2 in Abb. 19 nicht zu erkennen. Bei Fit 3 sind die rechts verlaufenden Kurven, mit hohen Testmittelpunkten gut angepasst, aber für Kalibrierungen mit niedrigerem Testmittelpunkt stimmen die Kurven nicht mit den Datenpunkten überein. Um darüber statistische Sicherheit zu gewinnen, werden die „root mean square errors“ (RMSE) nach Glg. 55 für jeden Datenpunkt zur Fitfunktion berechnet. Dabei wird die Abweichung in der Signalrichtung, nicht in der Konzentrationsrichtung, betrachtet. In Tab. 9 sind die Fehler aufgelistet.

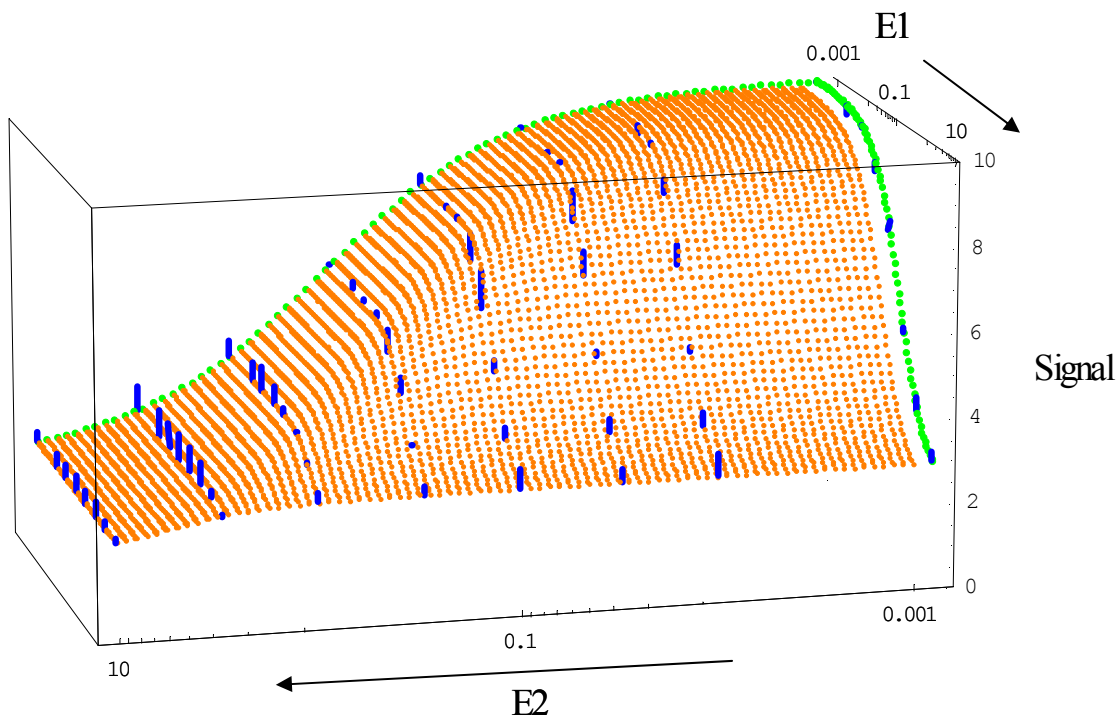
Tab. 9 *RMSE-Werte der Logistik-Funktionen mit verschiedenen Parametern für verschiedene Analyte, gemessen mit Anti-ES (0.3 µg/ml).*

Analyt	Fit1	Fit2	Fit3
Estriol	4.79	4.89	4.92
Estradiol	3.90	3.90	8.91
Estron	3.56	3.55	4.61
Ethinylestradiol	5.11	5.29	5.61
Bisphenol A	2.80	3.07	4.51
Genistein	3.54	4.11	4.15
Desethylstilbestrol	4.26	4.72	5.27
DEE <sub>2</sub> 1	3.49	3.75	3.75
DEE <sub>2</sub> 2	4.04	4.10	11.15

Mit diesen RMSE-Daten wird ein robuster, gepaarter Test durchgeführt, der Wilcoxon-Test für Paardifferenzen. Bei diesem Test muss keine Normalverteilung den Daten zugrunde liegen. Er vergleicht die Fehler von zwei Fits für jeden Analyten paarweise. Es wird ein zweiseitiger Test durchgeführt. Das Ergebnis ist, dass Fit 1 und Fit 2 nicht signifikant unterschiedlich sind ( $p_{12} = 0.5056$ ), wenn eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % angenommen wird, während die Fits 1 und 3 und die Fits 2 und 3 signifikant unterschiedlich sind ( $p_{13} = 0.0142$ ;  $p_{23} = 0.0468$ ). Dies entspricht genau der Vermutung, die die grafische Betrachtung nahe gelegt hat. Daraus ist abzulesen, dass es nicht allgemein zulässig ist, die Logistik-Funktion mit konstantem Parameter  $p$  anzupassen. Ganz davon abgesehen ist es schwierig zu beurteilen, wie groß dieser Parameter für alle Kurven sein sollte. Würden bei diesem Antikörper alle Kalibrierungen mit dem Analyten, der als Standardanalyt definiert wird, das Estradiol, angepasst werden, ist die Abweichung viel größer, da er in diesem Beispiel sogar einen deutlich anderen Wert für den Parameter  $p$  besitzt.

*Modell für die dreidimensionale Betrachtung von Mischungen (Übereinstimmung und Mischeffekte)*

Um den Einfluss eines Kreuzreagenzes auf die Signale eines Standardanalyten (hier: E<sub>2</sub>) für einen Antikörper darzustellen, werden Kalibrierungen mit dem reinen Standardanalyten, dem reinen Kreuzreagenz und Mischungen aus beiden in einer dreidimensionalen Grafik aufgetragen, s. Abb. 20 und Abb. 21.



*Abb. 20* Auftragung der Signale bei der Kreuzreaktivitätsmessung mit Anti-ES (0.3 µg/ml) und den beiden Analyten Estradiol (E<sub>2</sub>) und Estron (E<sub>1</sub>). Die senkrechten Balken stellen die Abweichungen des Modells von den experimentellen Daten dar. Das Fluoreszenzsignal ist auf die Blindwerte normiert.

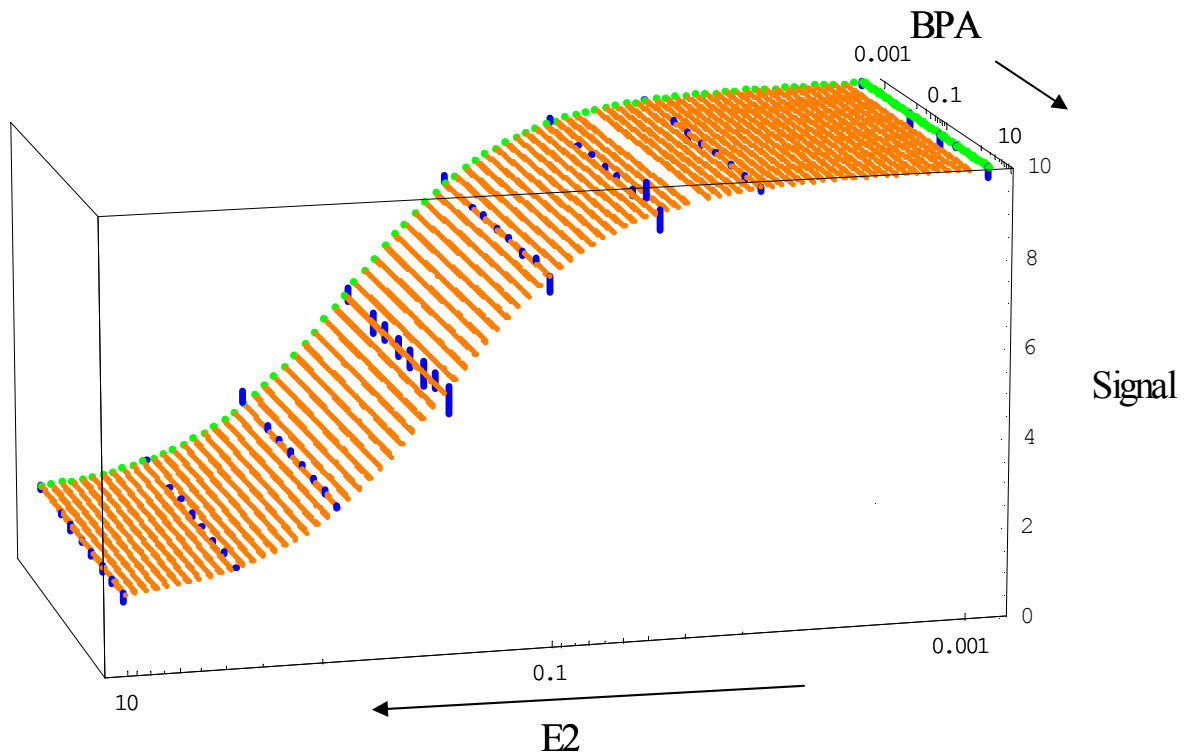


Abb. 21 Kreuzreaktivitätsmessung mit Anti-ES (0.3 µg/ml) und den beiden Analyten Estradiol (E2) und Bisphenol A (BPA).

Eine Achse stellt die Konzentration des Standardanalyten dar und die zweite die Konzentration des Kreuzreagens, während die Signale in z-Richtung aufgetragen sind. Die Kalibrierungen formen eine unsymmetrische Viertel-Glocke, wenn beide Analyten im gemessenen Kalibrierbereich den Antikörper vollständig inhibieren. Wenn der zweite Analyt den Antikörper nicht inhibiert, bleibt die Logistik-Funktion in der dritten Dimension gleich, s. Abb. 21. Mit einem dreidimensionalen Modell wird die Form an die Datenpunkte im Raum angepasst. Beim Vergleich des Modells mit den experimentellen Daten kann überprüft werden, ob z.B. Mischungseffekte auftreten. Diese Mischungseffekte können sich z.B. durch Eindellungen oder Wölbungen in der Glockenform zeigen. Für das Modell wird die Logistik-Funktion bei reinen Konzentrationen zu Grunde gelegt. Die Höhenlinien des Modells bilden Ellipsenausschnitte. Dieses Modell kann durch die folgenden Gleichungen beschrieben werden.

$$n(a,b) = f(x) = g(y) \quad \text{Glg. 56}$$

$$a = x \cos(t) \quad \text{mit } 0 \leq t \leq \frac{\pi}{2} \quad \text{Glg. 57}$$

$$b = y \sin(t) \quad \text{Glg. 58}$$

Wobei  $f(x)$  die Logistik-Funktion des Standardanalyten mit  $x$  als Konzentration,  $g(y)$  das Kreuzreagenz mit  $y$  als Konzentration und  $n(a,b)$  das Mischungssignal beschreibt. Dieser Modellansatz wird in Abb. 22 grafisch dargestellt.

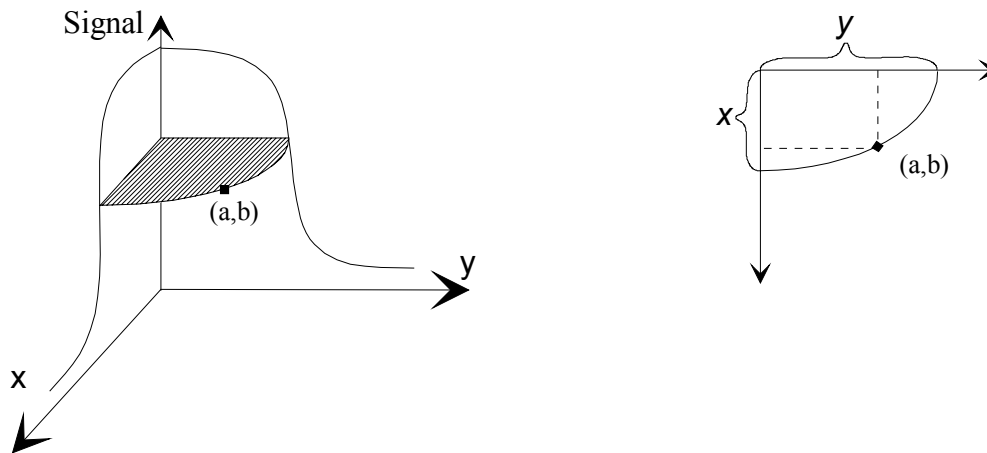


Abb. 22 Grafische Darstellung des elliptischen Zusammenhangs der Konzentrationen des Standardanalyten  $x$  und des Kreuzreagenz  $y$  auf einer Signalthöhe; die Konzentration der Mischung ist  $(a,b)$ ; links ist die räumliche Darstellung, rechts die Projektion in Signalrichtung gezeigt.

Anti-ES wird mit verschiedenen Analytmischungen kalibriert. An die Daten der reinen Analytkonzentrationen wird jeweils eine Logistick-Funktion angepasst. Diese Parameter werden für das dreidimensionale Modell verwendet und die RMSE-Werte für die Logistick-Funktion der reinen Analyte und für das Modell der Mischungen berechnet, s. Tab. 10

Tab. 10 Die RMSE-Werte der Kalibrierungen gemessen mit Anti-ES ( $0.3 \mu\text{g/ml}$ ) mit verschiedenen Analytmischungen, berechnet für die Logistick-Funktionen der reinen Analyte und das dreidimensionale Modell der Mischungen.

Analytenpaar	E2/E1	E2/EE2	E2/Estriol	E2/DE1	E2/BPA	E2/Coumestrol
RMS 1. Analyt	0.258	0.247	0.308	0.209	0.182	0.351
RMS 2. Analyt	0.207	0.28	0.175	0.161	0.702	0.177
RMS Modell	0.367	0.461	0.368	0.37	0.216	0.303

Die RMSE-Werte für die Modelle sind in den meisten Fällen etwas größer als die RMSE-Werte für die Logistick-Funktionen, s. Tab. 10. Die Ursache ist, dass das Modell mit diesen Logistick-Funktionen aufgebaut wird und dadurch eine Fehlerfortpflanzung erhalten wird. Es ist aber zu erkennen, dass das Modell insgesamt den gemessenen Daten sehr gut entspricht. Es treten keine Mischeffekte auf und die Glockenform des Modells spiegelt den Verlauf der experimentellen Daten wider.

Um den Einfluss, den ein Kreuzreagenz auf die Kalibrierung eines Standardanalyten ausübt, darzustellen, wird das Signal des Kreuzreagenzes von dem Signal des Standardanalyts subtrahiert und dieses Signal auf das Signal des Standardanalyts normiert. Auf der  $z$ -Achse ist der Fehler im Signal abzulesen, den das Kreuzreagenz verursacht, s. Abb. 23.

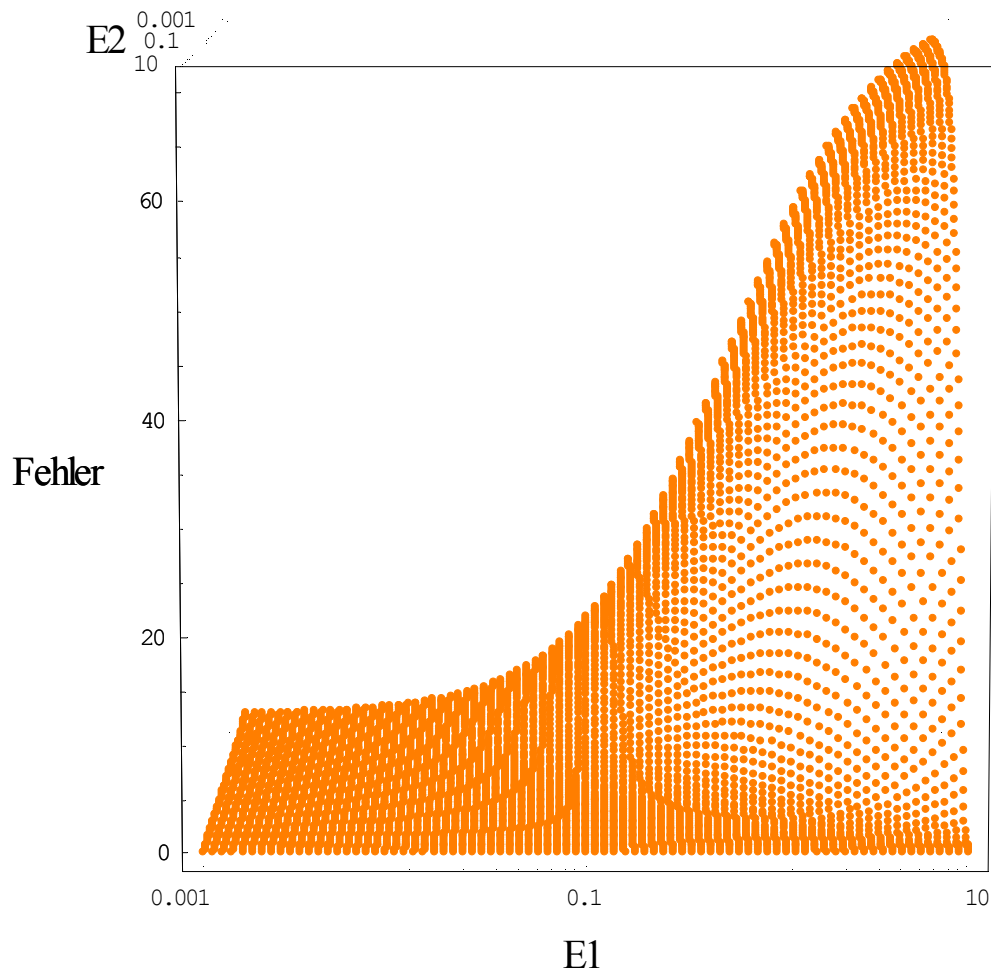


Abb. 23 *Einfluss des Kreuzreagenzes auf das Signal des Standardanalyts; der aufgetragene Fehler entspricht dem Fehler im Signal des Standardanalyts, der durch das Kreuzreagenz entsteht.*

In Abb. 24 ist eine Projektion bei  $z = 5\%$  gezeigt. Innerhalb der Teilellipsen ist der Fehler größer 5 %, den ein Kreuzreagenz auf die Bestimmung des Standardanalyts in der Signaldomäne ausübt. Für Bisphenol A erhält man keine Inhibition im betrachteten Kalibrierbereich damit auch keine Kreuzreaktivität, so dass der Fehler auf das Signal des Standardanalyts bei 0 % liegt.



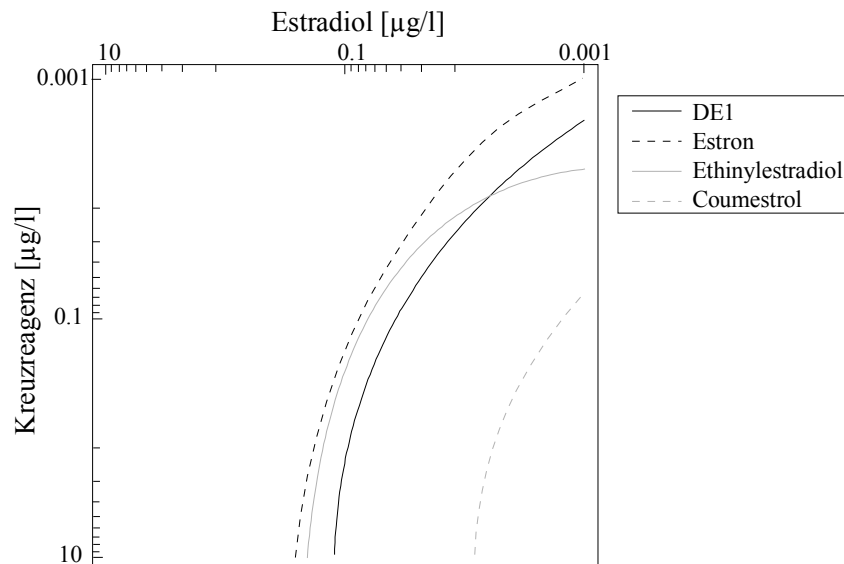


Abb. 24 Projektion der 5 %-Fehlerebene für Kreuzreagenzien mit Anti-ES und gegen Estradiol gemessen.

#### Kreuzreaktivität nach der Abraham-Methode:

Für die Antikörper Anti-E<sub>1</sub> und Anti-ES werden die Kreuzreaktivitäten nach Glg. 37 für verschiedene Analyte berechnet, s. Tab. 11. Dazu werden Kalibrierungen bei gleicher Antikörperkonzentration mit den Analyten durchgeführt. Für Anti-E<sub>1</sub> wird Estron als Standardanalyt definiert und für Anti-ES Estradiol. Anti-BPA bindet nur Bisphenol A und zeigt keine Kreuzreaktivität zu den anderen Analyten.

Tab. 11 Kreuzreaktivitäten in Prozent für Anti-E<sub>1</sub> und Anti-ES mit der Abraham-Methode bestimmt, Standardanalyt für Anti-E<sub>1</sub> Estron und für Anti-ES Estradiol.

	Anti-E <sub>1</sub>	Anti-ES
E <sub>1</sub>	100.00	55.79
E <sub>2</sub>	9.99	100.00
EE <sub>2</sub>	0.00	53.45
DE <sub>1</sub>	102.16	16.18
DEE <sub>2</sub> 1	0.00	148.15
Estriol	0.00	14.36
Coumestrol	0.00	0.00
BPA	0.00	0.00

#### 4.1.5. Stabilität der Antikörper unter Laborbedingungen und im Abwasser

Der Stabilität der Antikörper kommt eine entscheidende Rolle zu, wenn das Gerät für die Online-Überwachung von Oberflächengewässern eingesetzt werden soll. Antikörper sind als biologische Reagenzien das schwächste Glied in der Kette eines ferngesteuerten, vollautomatischen Sensorsystems, das möglichst lange ohne personellen Aufwand betriebsbereit sein soll. Weiterhin ergeben sich auf Dauer vermutlich Probleme mit Verstopfungen durch kleine Partikel im Vorfilter, Schläuchen, Pumpen oder Ventilen. Außerdem ist Algenbewuchs ein ernst zu nehmendes Problem, und auch die Oberflächenstabilität verringert sich auf Dauer bzw. durch häufige Benutzung, s. Kapitel 4.1.6. Wenn jedoch die Antikörperlösung jeden zweiten Tag gewechselt werden muss, treten die anderen Probleme in den Hintergrund.

Um die Langzeitstabilität der Antikörperlösung zu verbessern, gibt es verschiedene Möglichkeiten, da es im wesentlichen darum geht, Enzyme und ähnliches daran zu hindern, die Antikörper zu zersetzen oder zu denaturieren. Eine Möglichkeit wären sterile Lösungsmittel, jedoch kann der Antikörper selbst nicht sterilisiert werden. Die zweite Möglichkeit sind Zusätze, wie z.B. Azide. Besonders geeignet ist Natriumazid, da es die Messung nicht beeinflusst. Die dritte Möglichkeit ist die Kühlung der Proben, da die Stabilität der Antikörper signifikant steigt, wenn sie bei 4-8°C oder sogar im gefrorenen Zustand gelagert werden. Allerdings ist mit dem Autosampler nur die Kühlung auf 4-8°C realisierbar. Eine ganz andere Methode ist die Aliquotierung der Antikörper auf die gewünschte Menge pro Probe und anschließende Gefriertrocknung. In Abb. 25 sind Langzeitmessungen von Antikörpern gezeigt, die verschieden gelagert werden. Ein Teil der Antikörper wird in Lösung bei Raumtemperatur gelagert, ein anderer Teil wird aliquotiert, lyophilisiert und bei RT bzw. bei 4-8°C gelagert. Die Proben werden mit Aliquots verglichen, die bei -20°C tiefgefroren werden und erst kurz vor der Messung aufgetaut werden. Die gefriergetrockneten Proben bestanden aus einer Antikörperlösung in 10-fach-konzentriertem PBS-Puffer und einer Ovalbumin-Konzentration von 500 µg/100µl à 100 µl aliquotiert. Nach der Trocknung werden sie kurz vor der Messung mit 1000 µl PBS aufgefüllt. Die tiefgefrorenen Proben werden mit 900 µl aufgefüllt. Bei den Messungen mit lyophilisiertem, bei RT gelagertem Antikörper wird Anti-Atrazin-Cy5.5 verwendet, bei allen anderen Anti-E1-Cy5.5.

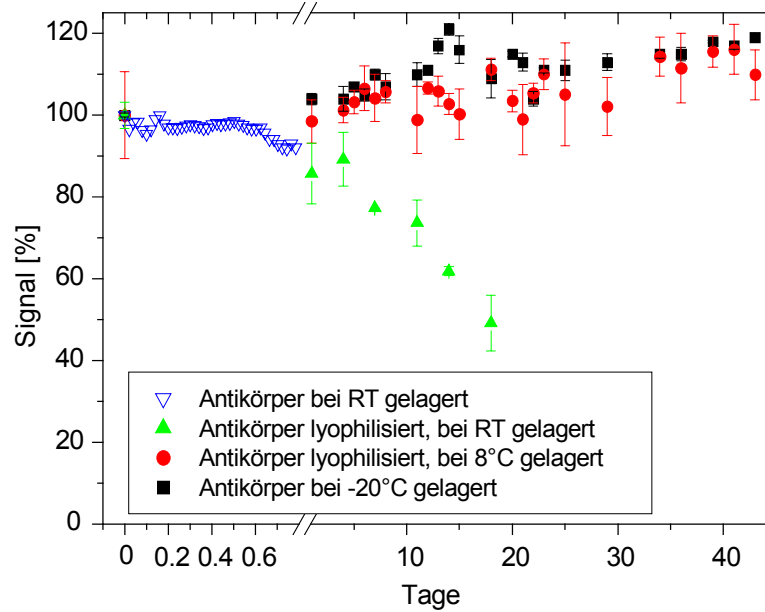


Abb. 25 Vergleich der Stabilität verschieden gelagerter Antikörper mit TIRF gemessen.

Antikörper, die bei Raumtemperatur in Lösung ohne jeden Zusatz gelagert werden, zeigen bereits nach 12 Stunden eine Abnahme der Aktivität. Ebenso ausgeprägt ist die Abnahme bei den Antikörperproben, die bei Raumtemperatur lyophilisiert gelagert werden. Nach 20 Tagen sinkt das Signal auf die Hälfte des Ausgangswertes. Die Stabilität der Antikörper, die im gefrorenen Zustand oder lyophilisiert und gekühlt gelagert werden, ist auch nach 40 Tagen gewährleistet. Die starken Schwankungen im Signal sind vermutlich Pipettier- und Fluidikungengenauigkeiten, während die großen Fehlerbalken durch Verluste beim Lyophilisieren erzeugt werden. Um Proben zu lyophilisieren, werden diese mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und dann im Vakuum getrocknet. Bei dieser Prozedur kann es durch leichtes Antauen zu Siedeverzügen kommen, bei denen die Probe aus dem Gefäß heraussprudelt. Wenn die Proben direkt im Lyophilisator gefroren werden, kann das Antauen vermieden werden. Somit ist die Methode der Aliquotierung und Lyophilisierung eine hervorragende Möglichkeit, die Stabilität der Antikörper für über einen Monat, vermutlich sogar über mehrere Monate hinweg, zu gewährleisten.

Ein weiterer Punkt, der die Stabilität von Antikörpern beeinträchtigt, ist die Matrix in Realproben. Besonders schwierig sind Proben aus Kläranlagen, da selbst der Ausfluss aus einer Kläranlage noch sehr viele Schwebstoffe, Organismen und aggressive Bestandteile enthält, die keine zuträgliche Umgebung für Antikörper darstellen. Deshalb wird versucht, mit Hilfe des Hintergrundproteins Ovalbumin unspezifische Bindungen zu vermeiden, indem durch

einen großen Überschuss an Ovalbumin der Antikörper quasi geschützt wird. In Abb. 26 sind Messungen von Antikörpern (0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in synthetischem Abwasser mit verschiedenen Ovalbumin-Konzentrationen dargestellt.

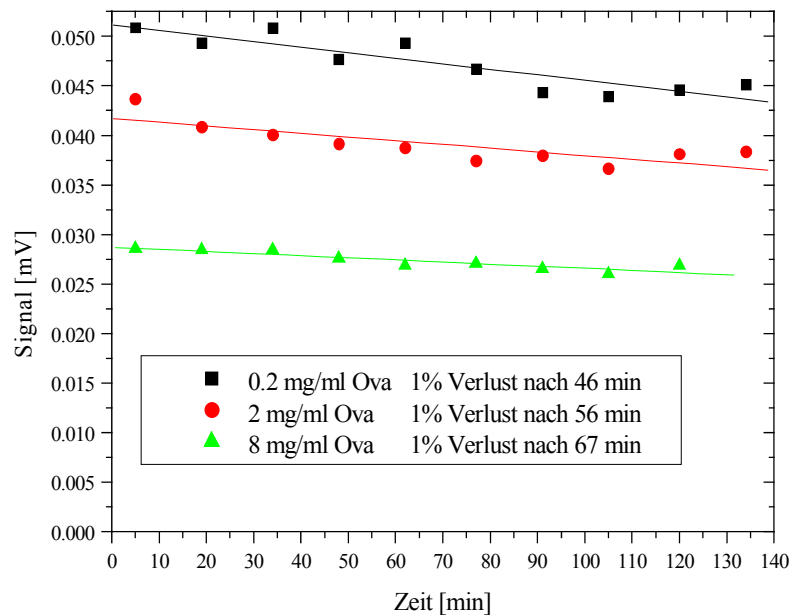


Abb. 26 Vergleich von Antikörperproben mit gleicher Konzentration in synthetischem Abwasser mit verschiedenen Ovalbumin-Konzentrationen.

Bei Verwendung von 0.2 mg/ml Hintergrundprotein ist das Signal nach 45 Minuten um 1 % gesunken, während es bei 2 mg/ml Ovalbumin erst nach 56 Minuten und bei 8 mg/ml nach 67 Minuten um 1 % gesunken ist. Es ist die Tendenz erkennbar, dass durch Erhöhung der Hintergrundproteinkonzentration die Stabilität des Antikörpers steigt. Allerdings wird durch die große Ovalbuminkonzentration die Dynamik stark vermindert, da bei Erhöhung der Ovalbuminkonzentration von 0.2 auf 2 mg/ml das Fluoreszenzsignal um 14 % sinkt und bei Erhöhung von 0.2 auf 8 mg/ml um fast 45 % sinkt. Diese Verringerung der Signaldynamik steht in keinem Verhältnis zu dem Gewinn an Zeit, in welcher der Antikörper dem Abwasser ausgesetzt sein kann. Deshalb ist für Realprobenmessung nur ein kurzer Kontakt zwischen Antikörper und Realprobe zu empfehlen, gerade solange, dass sich ein Gleichgewicht zwischen Antikörper und Analyt einstellen kann. Da unbekannte Matrices zum Teil sehr viel aggressiver sind als das hier verwendete synthetische Abwasser, wird für spezielle Messungen dennoch eine erhöhte Ovalbuminkonzentration empfohlen.

#### 4.1.6. Oberflächenstabilität

Die Oberflächenstabilität wird von mehreren Faktoren beeinflusst, so hat z.B. das Regenerationsmittel gleich in zweierlei Hinsicht einen besonderen Einfluss auf die Stabilität. Zum einen kann es die Oberfläche auf Dauer zersetzen. Zum anderen kann die Oberfläche nach mehreren Messungen von nicht vollständig entfernten Antikörpern blockiert werden.

Nur wenn das Regenerationsmittel den Antikörper vollständig von der Oberfläche entfernt, sind die Bindungsstellen für die nächste Messung wieder zugänglich. Die Regenerationsmittel Pepsin oder HCl und Acetonitril, sind bei den RfS-Messungen erfolgreich, jedoch mit TIRF ist keine vollständige Regenerierung erkennbar. Da bei TIRF-Messungen die Farbstoffe durch Photobleaching-Effekte gelöscht werden, lässt sich nicht beobachten, ob die Antikörper von der Oberfläche entfernt oder nur gebleicht werden. Um diesem Problem zu begegnen, wird die TIRF-Apparatur mit der RfS-Methode gekoppelt. Dazu wird ein RfS-Transducer mit entsprechender Interferenzschicht und passendem Format hergestellt, so dass er in die TIRF-Flusszelle eingebaut werden kann. Eine der Polymerfasern wird durch den RfS-Lichtwellenleiter ausgetauscht und dieser aus dem Gerät heraus zum Diodenzeilenspektrometer geleitet. Die ersten Spots werden für die TIRF-Messung genutzt, einer der hinteren für die RfS-Messung, da bei diesem Lichtleiter und Transducer mit Glycerin verbunden werden. Durch das Glycerin werden die Bedingungen für die Totalreflexion gestört, so dass der Laserstrahl aus dem Transducer ausgekoppelt werden kann und die nachfolgenden Spots nicht mehr genügend Intensität für TIRF-Messungen haben.

Die Suche nach einem geeigneten Regenerationsmittel wird mit Anti-E<sub>1</sub> auf einem Transducer, der mit DE<sub>1</sub> modifiziert ist, ausgeführt und beschränkt sich nicht nur auf eine Auswahl an Reagenzien, sondern erstreckt sich auch auf die Variation von Fließgeschwindigkeit und Volumen. In Abb. 27 ist die Fluoreszenzmessung mit TIRF und die simultane Messung der Schichtdickenänderung mit RfS bei der Bindung von 1 µg/ml Anti-E<sub>1</sub> auf die Oberfläche aufgetragen. Bei der ersten Messung ist der Laser durchgängig eingeschaltet, so dass der Farbstoff stark ausbleicht. Bei der zweiten Messung wird der Laser während der Injektion ausgestellt und erst nach einem PBS-Spülvorgang wieder eingeschaltet. Bei beiden RfS-Bindungskurven ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen, da hier der Laser so eingekoppelt ist, dass er nur minimal in den Wellenleiter für die RfS-Messung einfällt. Im Auswertebereich des Interferenzmusters findet sich keine Störung durch den Laser. Die optimale Einkoppelung, bei der der Laser in der RfS-Messung nicht beobachtet werden kann, ist nicht immer möglich. Besonders wenn die RfS-TIRF-Kopplung für andere Zwecke

verwendet wird, bei der die TIRF-Beobachtung mehrerer Spots im Vordergrund steht, muss man einen Einfluss des Lasers auf die RIfS-Messungen tolerieren (Kröger 2003).

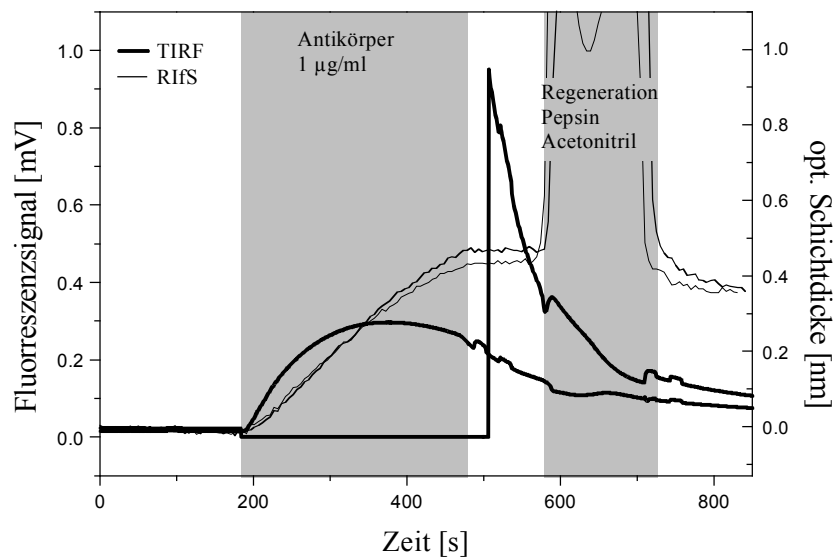


Abb. 27 RIfS-TIRF-Kopplung zur simultanen Beobachtung von Fluoreszenz und optischer Schichtdicke bei der Bindung von Antikörpern auf die Oberfläche und der nachfolgenden Regeneration.

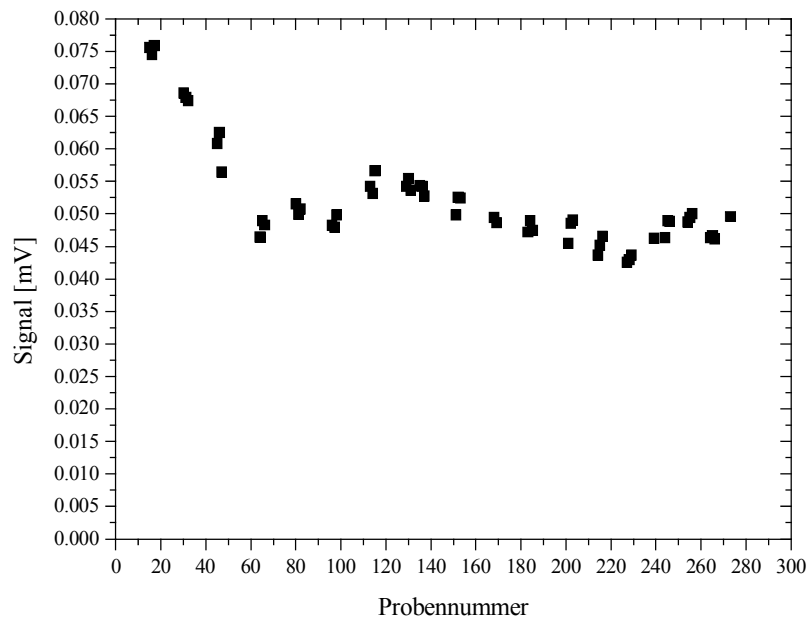
In Abb. 27 ist zu erkennen, dass die Regeneration mit Pepsin und Acetonitril nicht erfolgreich war. In Tab. 12 sind die weiteren Versuche aufgelistet.

Tab. 12 Verschiedene Lösungen werden als Regenerationsmittel eingesetzt. Anti- $E_1$  (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) wird mit einer RIfS-TIRF-Kopplung beobachtet und die prozentuale Regeneration ausgewertet.

1. Lösung	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]	2. Lösung	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]	Pumprate [ml/min]	Regeneration [%]
Pepsin (frisch)	400	ACN	200	0.8	32.7
Pepsin (1 Tag alt)	400	ACN	50	1.0	34.4
Pepsin (3 Tage)	500	--	---	0.1	<b>64.7</b>
Pepsin (frisch)	6 min stehend	---	---	0	49.9
ACN	400	--	---	0.7	5.8
Glycin 0.1 M, pH 2.7	400	--	---	0.8	0.0
Glycin 0.1 M, pH 2.7	200	HCl pH 1.8	200	0.1	63.8
Ammoniumsulfat	500	---	---	0.1	0.0
SDS (1%)	100	Pepsin	300	0.9	<b>63.7</b>
SDS (0.5%, pH 1.9)	600	---	---	0.9	<b>100</b>

Die traditionelle Regeneration mit Pepsin und Acetonitril zeigt bei der TIRF-Flusszelle nur eine geringe Regeneration von ca. einem Drittel der Antikörperbindung. Nur wenn das Pepsin drei Tage bei RT gelagert wird (nicht viel länger, da danach ein Abbauprozess einsetzt) oder wenn es mindestens 6 min in der Flusszelle steht, erhöht sich der Regenerationsgrad. Eine vollständige Regeneration der Oberfläche wird nicht erzielt. Ein ähnliches Resultat lässt sich mit der Kombination von Glycin und anschließend HCl erzielen, jedoch muss hier sehr langsam gepumpt werden. Auch bei einer nachgeschalteten, zweiten Regeneration lässt sich das Ergebnis nicht steigern. Eine Kombination aus SDS und Pepsin erbringt ein ähnliches Ergebnis in wesentlich kürzerer Zeit. Ein hundertprozentiges Regenerationsmittel ist die Mischung aus den beiden Lösungen, anstatt die hintereinander geschaltete Verwendung von SDS mit Pepsin. Das teure und nicht lange haltbare Pepsin kann durch HCl ausgetauscht werden. Das optimale Regenerationsmittel, das lange haltbar und zudem kostengünstig ist, besteht aus einer Lösung von 0.5 % SDS in deion. Wasser, das mit HCl auf pH 1.9 eingestellt wird.

Die Stabilität der kovalent gebundenen Derivate ist nicht isoliert von der Verringerung der Antikörperaktivität zu bestimmen, da noch keine Kühlung des Autosamplers zur Verfügung steht. Deshalb werden die Daten verwendet, die bei verschiedenen Kalibrierkurven mit einem Antikörper anfallen, bei denen gleiche Antikörperkonzentrationen eingesetzt werden. Abb. 28 zeigt Messungen, bei denen das Derivat DEE<sub>2</sub>1 kovalent auf der ganzen Oberfläche immobilisiert ist und der Antikörper Anti-ES in der Konzentration 0.25 µg/ml mit 200 µg/ml Ovalbumin in PBS eingesetzt wird.



*Abb. 28 Oberflächenstabilität eines DEE<sub>2</sub>I-Transducers bei der Messung verschiedener Kalibrierkurven mit Anti-ES (0.25 µg/ml), jeweils 9 Datenpunkte gehören zu einer Kalibrierung, es sind nur die Proben ohne Analyt dargestellt.*

In Abb. 28 ist deutlich zu erkennen, dass das Transducersignal innerhalb der ersten 50 Messungen stark abnimmt und danach weitgehend stabil bleibt. Dieses Phänomen ist bei allen Derivaten zu beobachten. Die Schwankungen entstehen durch Verwendung verschiedener Aliquots. Generell sind mindestens 300 Messungen mit einem Transducer durchführbar. Um Fehler durch Qualitätseinbußen bei der Oberfläche zu vermeiden, sollten immer wieder „Blindwerte“ gemessen werden. Diese Blindproben enthalten nur den Antikörper oder ein Gemisch von Antikörpern, aber keinen Analyten. Auf dieses Signal werden die anderen Werte referenziert.



## ***4.2. Einzelanalyt-Kalibrierungen von Estrogenen und Bisphenol A***

### **4.2.1. Kalibrierung**

Um die Analytkonzentration einer unbekanntenen Probe zu bestimmen, ist bei dem RIANA-Biosensor eine Kalibrierung unerlässlich. Aus den Fluoreszenzsignalen, die das Gerät in Millivolt-Einheiten misst, können die Fluoreszenzintensitäten nicht berechnet werden, da die Anregungsintensität (hier das evaneszente Feld) bei jeder neuen Einkopplung des Lasers in einen Transducer variiert. Das bedeutet, ein neujustierter Transducer kann zu Beginn kalibriert werden, und solange nichts an der Justierung geändert wird, ist die Kalibrierung gültig. Da die Laserintensität durch Streuung von Spot 1 zu Spot 6 stark zurückgeht, muss jeder Spot kalibriert werden. Diese Einschränkung bezieht sich lediglich auf den optischen Teil der Messung, die Konzentration des Antikörpers, und sein Markierungsgrad spielen selbstverständlich ebenso eine Rolle wie die Oberflächenstabilität. Wie schon in Kapitel 4.1.5 gezeigt, nimmt die aktive Konzentration des Antikörpers mit der Zeit ab. Das bedeutet, dass auch das Fluoreszenzsignal abnimmt. Um diesen Fehler und den auszugleichen, der durch die abnehmende Oberflächenqualität entsteht, muss bei Messungen, die über längere Zeit hinweg erfolgen werden, immer wieder eine Blindwert-Messung durchgeführt werden. Die Messwerte werden gegen die Blindwerte referenziert. Dazu wird eine entsprechende Kurve an den Zeitverlauf der Blindwerte angepasst und das Analytsignal durch den entsprechenden Wert der Fit-Funktion dividiert. Die Form der Kurvenanpassung ist für kurze Zeiträume (bis zu 40 Messungen) durchaus mit einer Geraden möglich, bei längeren Zeiträumen kann am Anfang eine Exponentialfunktion verwendet werden (bis ca. 100 Messungen), danach geht diese in eine lineare Funktion über ( $> 100$  Messungen). Jedoch muss im Einzelfall entschieden werden, ob diese Funktionen die Realität zutreffend reflektieren. Optimale Anpassungen sind mit Spline-Funktionen möglich, s. Kapitel 4.3.

Nachdem die Antikörper, Derivate und Analyte vollständig charakterisiert sind, kann nun der Assay für jeden einzelnen Analyten konstruiert und optimiert werden. Die Zielsetzung ist eine optimale Quantifizierung von Proben in Realmatrizes, wie z.B. Abwasser, und eine minimale Nachweisgrenze. Die Breite des Arbeitsbereichs wird nicht optimiert. Der Bereich von 20% bis 80% Signal deckt zum Teil nur eine halbe Größenordnung an Analytkonzentration ab. Da die zu untersuchenden Proben erwartungsgemäß extrem kleine Analytkonzentrationen enthalten, ist die Optimierung der Nachweisgrenze vorrangig.

Zunächst wird versucht, den Puffer mit einem Detergens zu versetzen, um eine Verschmutzung der Schläuche zu verhindern. Messungen mit Anti-E1 und Estradiol ergeben, dass durch

die Zugabe von Tween 20 (0.05 %) die Affinität des Antikörpers leicht herabgesetzt wird, so dass dieser Effekt den Vorteil des „Säuberns“ aufhebt. Der Zusatz von MeOH in verschiedenen Konzentrationen (5 %, 10%) im Puffer zur Vermeidung des Verschleppens von Bisphenol A hat keine ausreichende Wirkung, so dass auch darauf verzichtet wird. Wie bereits in Kapitel 4.1.5 beschrieben, führt die Erhöhung der Ovalbumin-Konzentration zwar zu einer Verringerung der Signaldynamik, aber auch einer geringfügig längeren Stabilität des Antikörpers in synthetischem Abwasser. Die Kalibrierungen werden in 0.2 mg/ml Ovalbumin bzw. in 2 mg/ml Ova durchgeführt, s. Tab. 13. Da eine Referenzierung auf die Blindwerte vorgenommen wird, ist die Signaldynamik der Rohdaten nicht erkennbar. Den Haupteinfluss auf die Präzision hat nicht die Signaldynamik, sondern die Standardabweichung der Replika. Bei Verwendung des PAL-Autosamplers sind die Standardabweichungen und die Präzision deutlich geringer als bei Verwendung des AS91 Autosamplers. Z.B. kam bei der Kalibrierung E<sub>1</sub> mit Anti-E<sub>1</sub> der PAL zum Einsatz. Da der PAL-Autosampler erst gegen Ende der Arbeit zur Verfügung stand, wurde darauf verzichtet, sämtliche Analyte ein zweites Mal zu kalibrieren. Die Konzentrationen der Antikörper unterscheiden sich in der Hinsicht, dass Anti-E<sub>1</sub> in sehr kleinen Konzentrationen (0.15 µg/ml) verwendet werden kann, während Anti-ES und Anti-BPA in etwas erhöhten Konzentrationen (0.25-0.30 µg/ml) eingesetzt werden, da das erzeugte Signal bei diesen beiden Antikörpern geringer ist. Ursache ist der Markierungsgrad, die aktive Konzentration und die Affinität.

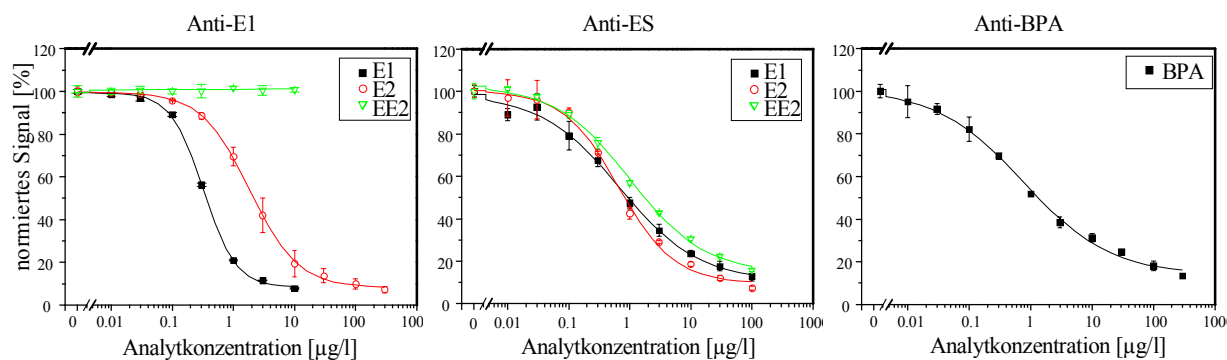


Abb. 29 Die Einzelanalyt-Kalibrierkurven der drei Antikörper Anti-E<sub>1</sub>, Anti-ES und Anti-BPA sind hier aufgezeigt. Die Qualitätsmerkmale der Kalibrierungen sind in Tab. 13 aufgelistet.

Aus den Kalibrierkurven von Anti-E<sub>1</sub> ist deutlich zu erkennen, dass dieser Antikörper die Position 17 im Steroidgerüst erkennt. Ist an dieser Position keine Carbonylgruppe, sondern wie z. B. beim Estradiol eine Hydroxy-Gruppe, so ist die Affinität vermindert und damit der Testmittelpunkt zu höheren Analytkonzentrationen verschoben. Die Ethinyl-Gruppe wird von

Anti-E<sub>1</sub> bereits nicht mehr erkannt. Der Anti-ES Antikörper bindet die Position 3 des Steroidgerüsts, s. Tab. 2, und zeigt dadurch zu allen drei Estrogenen eine hohe Affinität. Das Hapten für Anti-BPA ist die Phenol-Gruppe des Bisphenol A, daher zeigt dieser Antikörper zu den anderen Analyten keine Affinität. Diese Kurven sind nicht dargestellt. Um genaue Erkenntnisse über die Bindungstaschen und ihre Struktur zu gewinnen, müsste die Kristallstruktur untersucht werden.

*Tab. 13 Nachweisgrenze (NWG), Bestimmungsgrenze (BSG), Testmittelpunkt (TMP), Arbeitsbereich und Präzision der Einzelanalyt-Kalibrierungen aus TIRF-Messungen.*

Analyt	Antikörper	AK-Menge [µg/ml]	Derivat	Ova-Gehalt [mg/ml]	NWG [µg/l]	BSG [µg/l]	TMP [µg/l]	Arbeitsbereich (20% - 80%)[µg/l]	Präzision (20% - 80%)
E <sub>1</sub>	Anti-E <sub>1</sub>	0.15	DE <sub>1</sub>	0.2	0.04	0.08	0.33	0.14 - 0.75	0.05
E <sub>2</sub>	Anti-E <sub>1</sub>	0.25	DE <sub>1</sub>	2.0	0.16	0.57	1.66	0.47 - 5.86	0.39
EE <sub>2</sub>	Anti-E <sub>1</sub>	0.15	DE <sub>1</sub>	0.2	---	---	---	---	---
E <sub>1</sub>	Anti-ES	0.30	DEE <sub>2</sub> 1	0.2	0.02	0.2	0.68	0.09 - 5.35	0.7
E <sub>2</sub>	Anti-ES	0.30	DEE <sub>2</sub> 1	0.2	0.06	0.28	0.59	0.14 - 2.54	0.16
EE <sub>2</sub>	Anti-ES	0.25	DEE <sub>2</sub> 1	2.0	0.07	0.49	1.07	0.18 - 6.45	0.21
BPA	Anti-BPA	0.25	DBPA2	2.0	0.03	0.3	0.71	0.08 - 6.46	0.6

Die erreichten Nachweisgrenzen sind für alle Analyte extrem niedrig. Bis auf Estradiol mit Anti-E<sub>1</sub> liegen sie deutlich unter 0.1 µg/l (1 µg/l wird auch als 1 ppb (parts per billion) bezeichnet).

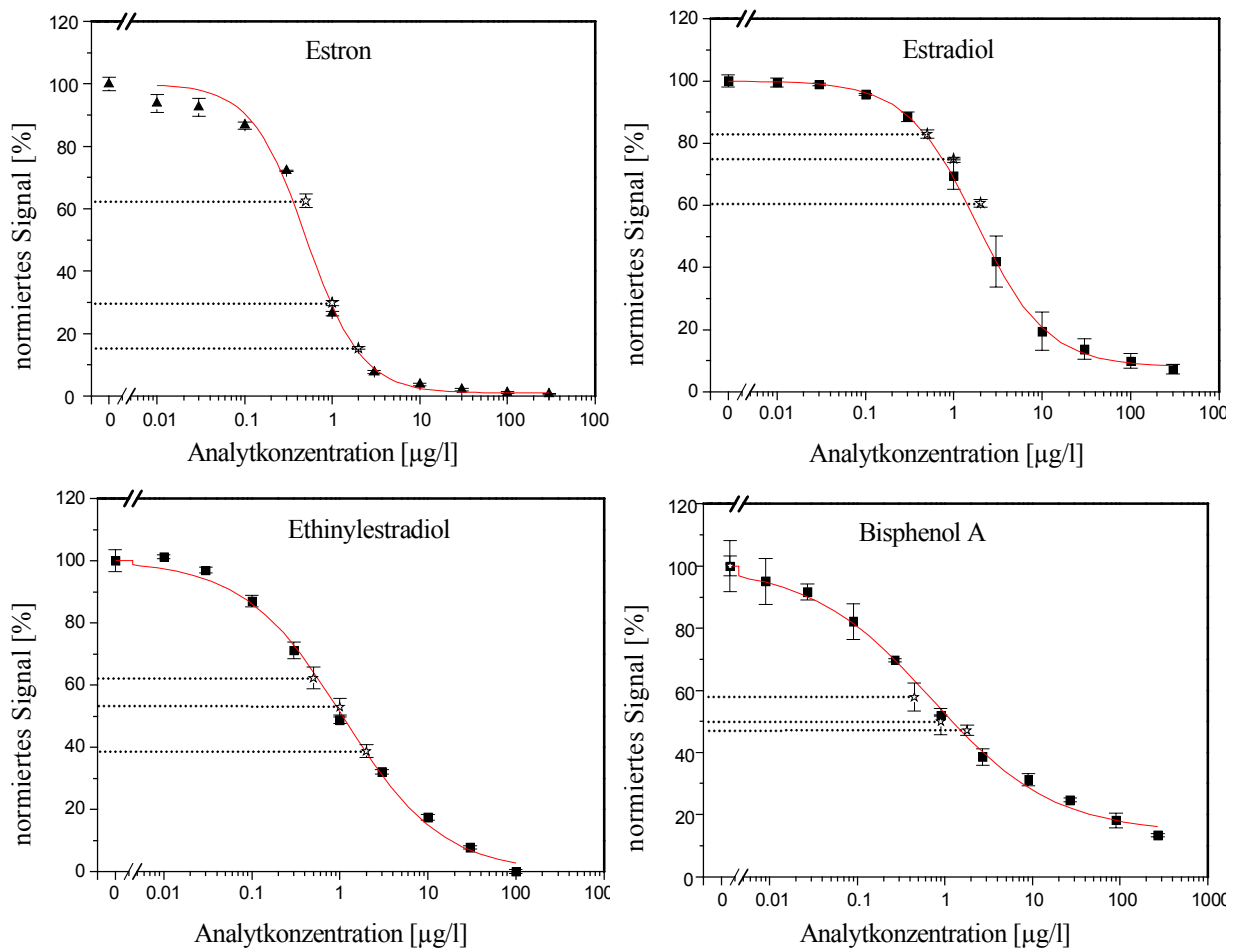
#### 4.2.2. Realproben

Die oben angegebenen Kalibrierkurven stellen ausgewählte Beispiele dar. Es ist jedoch immer notwendig, einen neu eingebauten Transducer zu kalibrieren, da die Lichtintensität durch das Einkoppeln jeweils stark variieren kann. Die Antikörperkonzentrationen sind zum Teil höher gewählt worden, da eine möglichst hohe Dynamik im erwarteten Konzentrationsbereich im Vordergrund steht und nicht eine besonders niedrige Nachweisgrenze. Die entsprechende Kalibrierung ist im folgenden bei einigen Testproben-Messungen mit angegeben.

Als erstes wird zur Simulierung von realem Abwasser synthetisches Abwasser mit verschiedenen Analyten versetzt (aufgestockt) und dann mit TIRF gemessen. Als zweites wird ein Feldexperiment beschrieben, bei dem bei einem Projektpartner in Karlsruhe (TZW Karlsruhe) reale und aufgestockte Proben vermessen wurden.

*Synthetisches Abwasser mit einzelnen Analyten versetzt:*

Für die Messungen in synthetischem Abwasser wird dieses, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, hergestellt und mit einzelnen Analyten versetzt. Für den entsprechenden Analyten werden Kalibrierungen durchgeführt und die Abwasserproben vermessen. Die Messreihenfolge ist invers, damit der Antikörper nicht zu lange der Matrix der Abwasserproben ausgesetzt ist.



*Abb. 30 Die Einzelanalyte werden mit jeweils 0.25 µg/ml Antikörper und 2 mg/ml Ovalbumin kalibriert. Das synthetische Abwasser wird jeweils mit dem entsprechenden Analyten versetzt und mit vermessen; die Daten sind in Tab. 14 aufgelistet.*

Tab. 14 Wiederfindungsraten (WFR) der Einzelanalyte in synthetischem Abwasser, bestimmt mit den Kalibrierungen in Abb. 30.

Analyt	wahre Konz. [ $\mu\text{g/l}$ ]	Signal [%]	gemess. Konz. [ $\mu\text{g/l}$ ]	WFR [%]
Estradiol	0.5	$82.96 \pm 1.38$	$0.47 \pm 0.04$	94.74
	1	$74.89 \pm 0.34$	$0.75 \pm 0.01$	74.99
	2	$60.70 \pm 1.25$	$1.41 \pm 0.09$	70.33
Estron	0.5	$62.46 \pm 2.16$	$0.35 \pm 0.09$	70.69
	1	$29.88 \pm 0.79$	$0.96 \pm 0.02$	96.40
	2	$15.35 \pm 0.39$	$1.84 \pm 0.04$	91.80
Ethinylestradiol	0.5	$62.29 \pm 3.51$	$0.56 \pm 0.11$	111.73
	1	$53.01 \pm 2.72$	$0.91 \pm 0.13$	91.39
	2	$38.84 \pm 2.05$	$1.92 \pm 0.20$	95.89
Bisphenol A	0.5	$59.37 \pm 4.54$	$0.66 \pm 0.40$	132.85
	1	$51.33 \pm 4.18$	$1.21 \pm 0.75$	121.06
	2	$48.35 \pm 1.66$	$1.52 \pm 0.98$	76.07

Die Wiederfindungsraten liegen bei den Estrogenen im Bereich von 70 % bis 112 %. Damit befinden sie sich genau im erlaubten Bereich der AOAC, die einen Schwankungsbereich von 70 % bis 120 % zulässt (Parker 1991). Die Abweichungen bei Bisphenol A sind etwas höher, allerdings ist dort auch die Standardabweichung des Signals sehr viel größer. Die Werte liegen also nicht systematisch außerhalb des erlaubten Bereichs.

Interessanterweise sind die Wiederfindungsraten bei vielen Messungen kleiner als 100 %. Das heißt, die gemessene Konzentration ist kleiner als die reale, und damit ist das Signal eher zu hoch als zu niedrig. Eigentlich wird erwartet, dass der Antikörper durch die aggressive Matrix angegriffen wird oder zum Teil unspezifisch bindet. In beiden Fällen wäre das Antikörpersignal erniedrigt. Hier lässt sich diese Tendenz nicht beobachten, woraus zu schließen ist, dass es möglich ist, mit Antikörpern in synthetischem Abwasser zu messen. Der Schwankungsbereich entsteht durch Pipettier- und Fluidikungenauigkeiten.

In Abb. 31 ist zu erkennen, dass der dynamische Bereich der Kalibrierung nicht die Konzentration der unbekannt Probe abdeckt, so dass eine genaue Quantifizierung nicht möglich ist. Es stellt sich die Frage, ob eine exakte Quantifizierung bei sehr hohen Konzentrationen überhaupt notwendig ist oder ob es nicht sinnvoller ist, kleine Konzentrationen genau zu quantifizieren und Konzentrationen über einem bestimmten Schwellenwert nur als ungefähren Wert über der Schwellenkonzentration anzugeben.

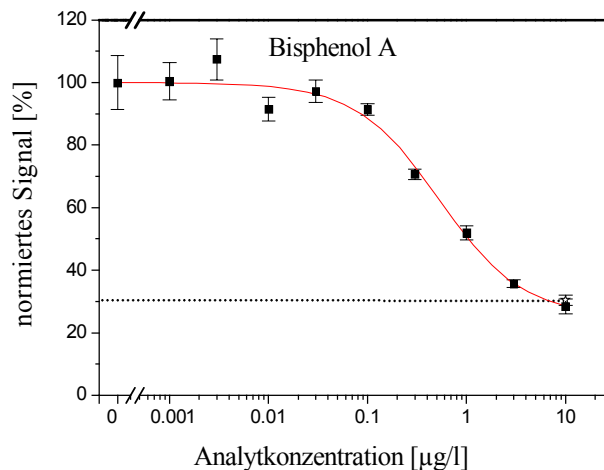


Abb. 31 Kalibrierung mit Bisphenol unter Verwendung von 0.51 µg/ml Anti-BPA zur Bestimmung der Konzentration in der synthetischen Abwasserprobe.

Bei der Kalibrierung in Abb. 31 wird bereits deutlich mehr Antikörper verwendet als bei den Einzelanalyt-Kalibrierungen in Tab. 13, trotzdem verschiebt sich der Testmittelpunkt nur bis zu 0.5 µg/l Bisphenol A. Die Bestimmung der unbekannt Probe, die bei einem Projektpartner aufgestockt und dann tiefgefroren nach Tübingen geschickt wurde, ergab eine Konzentration von  $5.20 \pm 0.62$  µg/l, während die eigentlich aufgestockte Konzentration 10 µg/l ist. Da die Dynamik der Kurve in diesem Konzentrationsbereich sehr gering ist, beträgt die Wiederfindungsrate nur 52%.

*Realproben direkt gemessen und mit einzelnen Analyten versetzt:*

Für die Messungen in dem Feldversuch in Karlsruhe wurde in Tübingen vor dem Transport ein „Testkit“ vorbereitet, das Proben mit Antikörperlösung enthielt, zu denen nur noch 900 µl der zu untersuchenden Proben pipettiert werden musste. Außerdem enthielt das Kit drei Blindproben, die sich aus 100 µl der Antikörperlösung und 900 µl deion. Wasser zusammensetzten und drei „Grenzwertproben“ mit 0.1 µg/l Bisphenol A und der entsprechenden Antikörperkonzentration. In Tübingen wurde die Kalibrierung des Transducers durchgeführt, während in Karlsruhe nur noch das Testkit zum Referenzieren gemessen wurde.

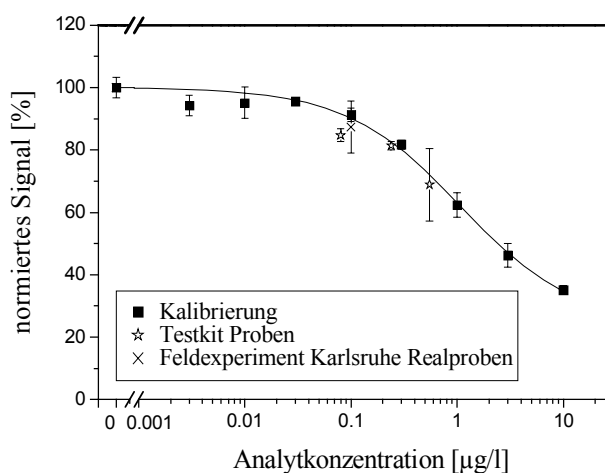


Abb. 32 Nach der Kalibrierung von Bisphenol A mit 0.15 µg/ml Anti-BPA wurde das Gerät mit eingebautem Transducer nach Karlsruhe gebracht und dort ein vorher hergestelltes Testkit gemessen, bestehend aus Blindprobe, Grenzkonzentration 0.1 µg/l, und Proben, die bereits den Antikörper enthielten und mit Realproben (Flusswasser), deren Bisphenol A-Gehalt mit HPLC bestimmt wurde, aufgefüllt wurden.

Mit den Blindwerten aus dem Testkit wurden die anderen Proben referenziert, da die Rohwerte auf Grund des Alters des Antikörpers und vielleicht auch durch geringfügige Dejustierung des Lasers während des Transports nicht verglichen werden konnten. In Abb. 32 und Tab. 15 ist zu erkennen, dass die Referenzierung auf den Blindwert erfolgreich war. Allerdings hat die Grenzkonzentration eine hohe Standardabweichungen, so dass auf möglich andere Referenzierungsmethoden verzichtet wurde. Mit dieser Referenzierung konnten die Realproben bestimmt werden, wobei zwei Proben zutreffend wiedergefunden wurden und in einer Probe etwas zuviel Bisphenol A gemessen wurde, s. Tab. 15.

Tab. 15 Testkit mit Bisphenol A zur Bestimmung von Realproben im Feldexperiment in Karlsruhe.

Probe	Konz (HPLC oder gespikt) [µg/l]	Signal [%]	Konz (TIRF) [µg/l]	WFR [%]
Blank	0	100.00 ± 1.19		
Grenzkonz.	0.1	87.28 ± 8.38	0.15 ± 0.15	147.44
Real 1	0.24	81.34 ± 1.30	0.27 ± 0.03	111.81
Real 2	0.08	84.78 ± 2.14	0.19 ± 0.04	242.14
Real 3	0.55	68.85 ± 11.62	0.69 ± 0.54	124.81

Der zweite Versuchsteil beinhaltete Messungen mit einem Multi-Analyt-Transducer, wobei eine Analytkombination eingesetzt wurde, bei der die Antikörper keine Kreuzreaktivitäten

untereinander aufweisen. In einem zweiten RIANA-Gerät wurde ein Transducer für Bisphenol A, Estron, Atrazin und Isoproturon in Tübingen kalibriert. Bei den Kalibrierungen für Atrazin und Isoproturon ist auf Erfahrungen aus dem Arbeitskreis zurückgegriffen worden, die in Barzen (2000) erläutert sind.

Die Kalibrierung wurde für jeden Analyten einzeln durchgeführt. Die jeweils eingesetzte Antikörperkonzentration betrug 0.3 µg/ml.

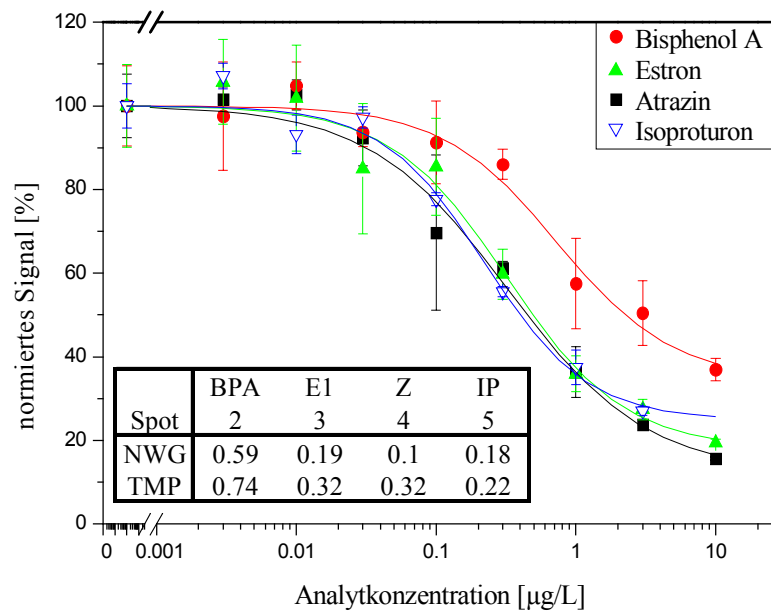


Abb. 33 Kalibrierung des Multi-Analyt-Transducers für Bisphenol A, Estron, Atrazin und Isoproturon mit den spezifischen Antikörpern (0.3 µg/ml). Mischungen wurden nicht kalibriert, da kein cross-talk vorhanden sein sollte.

In Karlsruhe wurden drei Realwasserproben, die keinen dieser Analyte in nachweisbaren Mengen enthielten, mit allen vier Analyten versetzt. Alle Realwasserproben waren schon einige Wochen alt, wobei zwei mit Natriumazid stabilisiert wurden. Die nichtstabilisierte Probe hatte vermutlich bereits starke biologische Aktivität entwickelt und den Antikörper zersetzt, da die Signale deutlich niedriger ausfallen. Die Daten für diese Probe sind nicht dargestellt.

Die Proben wurden so aufgestockt, dass ein Analyt in einer relativ hohen Konzentration von 0.5 µg/l vorhanden war und die anderen drei in einer geringeren Konzentration von 0.05 µg/l. Es sollte gezeigt werden, dass die einzelnen Analyte auch aus der Mischung heraus quantifiziert werden können.



Tab. 16 Die Realproben waren mit allen vier Analyten versetzt, der Übersichtlichkeit halber wird nur die relevante Konzentration des entsprechenden Analyten aufgeführt; in der ersten Spalte ist der Analyt erwähnt, der in der höchsten Konzentration in der Probe vorlag. (Z=Atrazin, IP =Isoproturon).

Analyt		BPA Konz gespikt [ $\mu\text{g/l}$ ]	Signal [%]	BPA Konz TIRF [ $\mu\text{g/l}$ ]	WFR [%]
Real I	BPA	0.50	$73.92 \pm 2.55$	$0.50 \pm 0.08$	99.8
Real I	E1	0.05	$100.96 \pm 1.80$	0	0.0
Real I	Z	0.05	$97.43 \pm 2.46$	$0.04 \pm 0.03$	71.5
Real I	IP	0.05	$99.38 \pm 3.31$	$0.01 \pm 0.05$	18.0
Real II	BPA	0.50	$73.07 \pm 0.94$	$0.53 \pm 0.03$	105.1
Real II	E1	0.05	$98.42 \pm 1.05$	$0.02 \pm 0.01$	44.5
Real II	Z	0.05	$99.16 \pm 3.22$	$0.01 \pm 0.04$	24.2
Real II	IP	0.05	$99.68 \pm 4.00$	$0.005 \pm 0.057$	9.7

Analyt		E1 Konz gespikt [ $\mu\text{g/l}$ ]	Signal [%]	E1 Konz TIRF [ $\mu\text{g/l}$ ]	WFR [%]
Real I	BPA	0.05	$97.61 \pm 4.70$	$0.01 \pm 0.02$	21.9
Real I	E1	0.50	$52.89 \pm 2.54$	$0.43 \pm 0.05$	85.8
Real I	Z	0.05	$93.57 \pm 2.25$	$0.03 \pm 0.01$	59.8
Real I	IP	0.05	$95.43 \pm 6.00$	$0.02 \pm 0.03$	42.1
Real II	BPA	0.05	$95.67 \pm 0.82$	$0.020 \pm 0.004$	39.8
Real II	E1	0.50	$51.71 \pm 1.53$	$0.45 \pm 0.03$	90.8
Real II	Z	0.05	$94.73 \pm 8.18$	$0.02 \pm 0.04$	48.6
Real II	IP	0.05	$95.86 \pm 8.37$	$0.02 \pm 0.04$	38.0

Analyt		Z Konz gespikt [ $\mu\text{g/l}$ ]	Signal [%]	Z Konz TIRF [ $\mu\text{g/l}$ ]	WFR [%]
Real I	BPA	0.05	$80.99 \pm 2.56$	$0.08 \pm 0.01$	151.0
Real I	E1	0.05	$81.63 \pm 0.81$	$0.072 \pm 0.005$	143.7
Real I	Z	0.50	$44.86 \pm 1.83$	$0.59 \pm 0.06$	118.8
Real I	IP	0.05	$79.33 \pm 1.27$	$0.085 \pm 0.008$	170.8
Real II	BPA	0.05	$83.57 \pm 1.27$	$0.061 \pm 0.007$	122.7
Real II	E1	0.05	$82.74 \pm 2.08$	$0.066 \pm 0.011$	131.5
Real II	Z	0.50	$45.15 \pm 1.27$	$0.584 \pm 0.041$	116.9
Real II	IP	0.05	$81.69 \pm 1.39$	$0.072 \pm 0.008$	143.0

Analyt		IP Konz gespikt [ $\mu\text{g/l}$ ]	Signal [%]	IP Konz TIRF [ $\mu\text{g/l}$ ]	WFR [%]
Real I	BPA	0.05	$94.51 \pm 1.34$	$0.052 \pm 0.014$	104.4
Real I	E1	0.05	$95.44 \pm 0.57$	$0.042 \pm 0.006$	85.0
Real I	Z	0.05	$92.75 \pm 2.72$	$0.071 \pm 0.031$	143.0
Real I	IP	0.50	$64.71 \pm 0.22$	$0.619 \pm 0.007$	123.8
Real II	BPA	0.05	$94.30 \pm 1.84$	$0.054 \pm 0.020$	108.9
Real II	E1	0.05	$92.50 \pm 1.48$	$0.074 \pm 0.017$	148.7
Real II	Z	0.05	$88.21 \pm 0.57$	$0.127 \pm 0.008$	253.7
Real II	IP	0.50	$64.52 \pm 0.64$	$0.625 \pm 0.021$	125.1

Bei allen Proben ist deutlich der Unterschied zwischen der hohen und der niedrigen Konzentration zu erkennen. Die Wiederfindungsraten schwanken allerdings erheblich, d. h. für eine qualitative Aussage ist diese Messung geeignet, für eine quantitative Bestimmung reicht sie jedoch nicht aus. Eine große Fehlerquelle stellte die Pipettiergenauigkeit dar, da für jede Probe vier Pipettierschritte notwendig waren und die Bedingungen zum Pipettieren vor Ort nicht optimal waren.

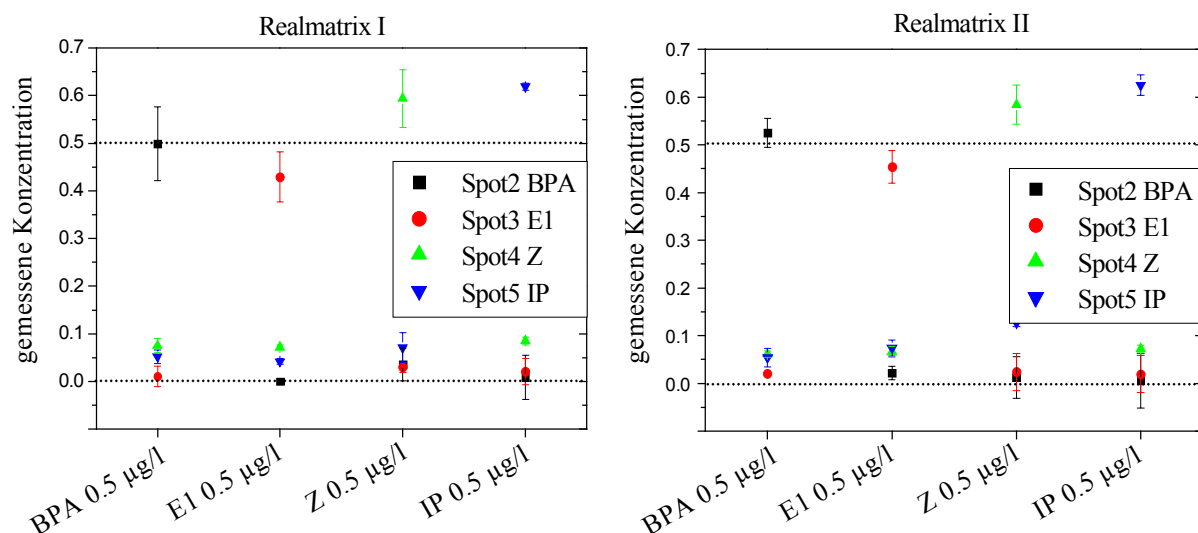


Abb. 34 Vergleich der beiden Realwasserproben; auf der Abszisse ist der Analyt aufgetragen, der in der höchsten Konzentration (0.5 ppb) in der Mischung vorhanden war, die anderen Analyten waren mit 0.05 ppb der Probe zugesetzt.

In Abb. 34 sind die Ergebnisse aus Tab. 16 grafisch aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass sich beide Matrizes ähnlich verhalten. Die Schwankungen sind auf Fehler in den Standards zurückzuführen und nicht auf einen störenden Einfluss eines Analyten oder eines Antikörpers. Wäre dies der Fall, wäre die Konzentration eines oder aller Analyte systematisch falsch. Insgesamt ist ein positives Ergebnis erreicht worden, demzufolge Realmatrizes, soweit sie nicht überaltert sind, mit dem RIANA-Gerät gut zu messen sind. Die Wiederfindungsraten können durch akkurates Arbeiten an AOAC-Standards angepasst werden.

### ***4.3. Multi-Analyt-Kalibrierungen von Estrogenen und Bisphenol A***

#### **4.3.1. Binäre Mischungen**

Mit den Erfahrungen, die in den Einzelanalyt-Kalibrierungen gesammelt wurden, wird der Multi-Analyt-Assay aufgebaut. Drei wichtige Parameter beeinflussen dabei die Güte der Kalibrierung. Dazu gehört zum einen die Auswahl der Substanzen, wie z.B. Derivate, Antikörper und die Analyte. Insbesondere die Position der Derivate auf dem Transducer und die Antikörperkonzentration spielen hierbei eine wichtige Rolle. Zum anderen hat der Versuchsplan enormen Einfluss auf die Güte der Kalibrierung. Schließlich ist auch die Auswertung hinsichtlich der Auswahl der Neuronalen Netze, Anzahl an Testproben und Reduzierung der Zeitabhängigkeit ausschlaggebend. Alle drei Parameter werden variiert, um eine optimale Kalibrierung zu erreichen. Nach der Diskussion der Parameter sind die Kalibrierungen mit den jeweils verwendeten Analyten, Antikörpern, ANN, etc. im Detail aufgelistet. Die Auswertungen der Multi-Analyt-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dipl. chem. F. Dieterle durchgeführt.

#### *Parameter 1: Substanzen*

Die Wahl der Antikörper ist schnell getroffen, da nur zwei Antikörper für die Estrogene (Anti-E<sub>1</sub> und Anti-ES) in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Die Antikörper werden zunächst in gleichen Konzentrationen eingesetzt. Da einerseits Anti-ES eine geringere aktive Konzentration als Anti-E<sub>1</sub> aufweist und andererseits der Markierungsgrad von Anti-E<sub>1</sub> höher ist, wird bei den optimierten Kalibrierungen fast doppelt soviel Anti-ES eingesetzt wie Anti-E<sub>1</sub>.

Welche Derivate bei den binären Kalibrierungen zum Einsatz kommen, geht aus der Tab. 8 hervor. Da nur die Derivate DE<sub>1</sub>, DE<sub>21</sub> und DEE<sub>21</sub> eine hinreichende Bindungskapazität aufweisen, werden diese für die Estrogen-Kalibrierungen verwendet. In welcher Reihenfolge die Derivate auf dem Transducer angeordnet werden, kann durch verschiedene Experimente ermittelt werden. Als erstes wird eine TIRF-Messung mit einer Cy5.5-Lösung bei angeschaltetem Laser durchgeführt. Durch die Verwendung einer hohen Konzentration kann ein ausreichendes Signal erzeugt werden. Der Einfluss des Photobleachings kann vernachlässigt werden, da zum einen der Farbstoff nicht auf der Oberfläche bindet und zum anderen eine sehr hohe Konzentration verwendet wird. Aus der Kurve in Abb. 35 ist das Flussprofil ablesbar. Einem relativ schnellen Anstieg folgt eine kurze Plateauphase und anschließend ein Absinken des Signals durch Verdünnung des Farbstoffs durch nachfließende Pufferlösung, da

ohne Luftpolster gearbeitet wird. Hierbei muss jedoch die Größe des Moleküls beachtet werden. Da der Farbstoff um den Faktor 100 kleiner ist als ein Antikörper bedeutet das, dass die Antikörperlösung eine geringere Diffusion zeigt. Durch die Vermeidung von Luftblasen wird zwar ein schlechtes Flussprofil erhalten, da aber bei den TIRF-Messungen die Bindung nicht zeitaufgelöst betrachtet wird, sondern nur das Endsignal detektiert wird, hat das Flussprofil keinen großen Einfluss auf die Messung.

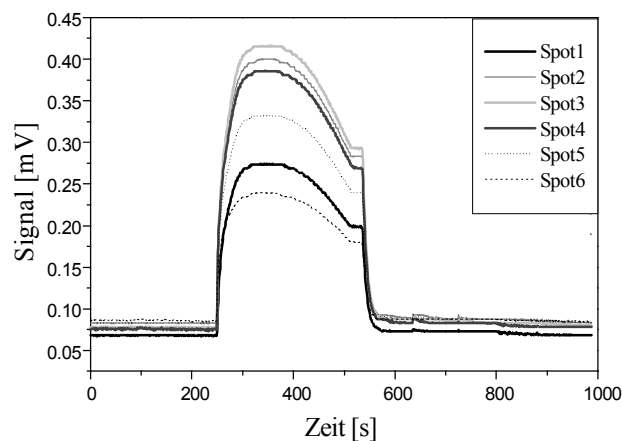


Abb. 35 *TIRF-Messung mit einer Cy5.5-Lösung bei eingeschaltetem Laser, an allen Spots gemessen.*

Aus Abb. 35 geht hervor, dass die Spots 2, 3 und 4 die höchste Anregungsintensität aufweisen. Aus diesem Grund werden diese Spots für die Multi-Analyt-Kalibrierungen eingesetzt.

Die Hauptinformation über die Konzentration von Ethinylestradiol wird über Anti-ES und damit über das Derivat DEE<sub>21</sub> erhalten, s. Abb. 37, während die Informationen der beiden anderen Analyte aus allen drei Derivaten erhalten wird. Außerdem besitzt Anti-ES bei allen Kalibrierungen einen kleineren Markierungsgrad und erzeugt dementsprechend ein geringeres Signal. Um dies mit einer erhöhten Signalintensität auszugleichen, wird DEE<sub>21</sub> an Spot 2 immobilisiert. Spot 3 und Spot 4 werden mit DE<sub>21</sub> und DE<sub>1</sub> modifiziert. In Abb. 36 ist die Signalhöhe von Anti-ES und Anti-E1 bei einem Transducer dargestellt, bei dem am Spot 2 DEE<sub>21</sub>, am Spot 3 DE<sub>21</sub> und am Spot 4 DE<sub>1</sub> immobilisiert ist. Bei den optimierten Kalibrierkurven ist die Reihenfolge der Derivate an Spot 3 und 4 invers.

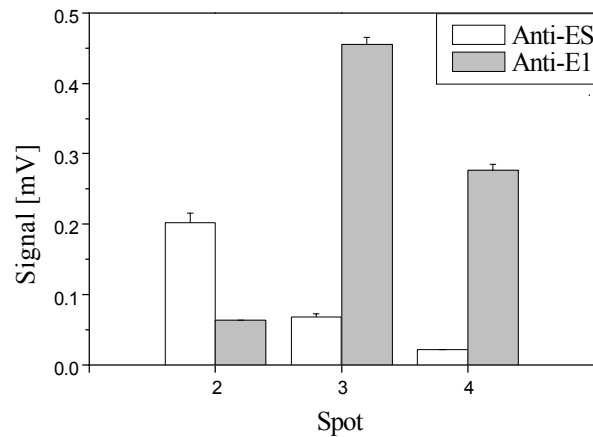


Abb. 36 Bei dieser TIRF-Messung wird ein Transducer am Spot 2 mit  $DEE_21$ , am Spot 3 mit  $DE_21$  und am Spot 4 mit  $DE_1$  modifiziert. Die Signale von Einzelmessungen mit Anti-ES ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) und mit Anti-E1 ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) werden verglichen.

In Abb. 36 ist zu erkennen, dass Anti-ES hauptsächlich an Spot 2 bindet und Anti-E<sub>1</sub> an Spot 3 und 4. Da beide Antikörper in gleicher Konzentration eingesetzt werden, der Markierungsgrad und die aktive Konzentration von Anti-ES jedoch kleiner sind, erhält man trotz niedrigerer Anregungsintensität für Anti-E<sub>1</sub> ein höheres Signal als für Anti-ES.

In Abb. 37 ist die „Information“ über einen Analyten an einem Spot bzw. Derivat, die durch einen Antikörper erhalten wird, dargestellt. Um den Einfluss von Bindungskapazität und Kreuzreaktivität zu berücksichtigen, wird das Produkt dieser beiden Größen berechnet. Dadurch lässt sich der Zusammenhang zwischen dem Signal an den Spots bzw. Derivaten und dem jeweiligen Analyten darstellen, wobei die ermittelten Werte keine physikalische Bedeutung haben. Für die Bindungskapazität und Kreuzreaktivität werden referenzierte Werte verwendet. Aus den Diagrammen ist zu schließen, dass Estron hauptsächlich von Anti-E<sub>1</sub> an  $DE_1$  und  $DE_21$  erkannt wird, während Estradiol mit Anti-ES an  $DE_21$  und  $DEE_21$  detektiert wird. Ethinylestradiol wird nur von Anti-ES erkannt und zeigt ein ähnliches Muster wie Estron mit Anti-ES. Es ist zu vermuten, dass die Kombination  $E_1/E_2$  sehr leicht zu kalibrieren ist, während  $E_2$  und  $EE_2$  voraussichtlich zu ähnlich sind, um unterschieden werden zu können. Die Kombinationen  $E_1/E_2$  und  $E_1/EE_2$  sollten besser kalibrierbar sein als  $E_2/EE_2$ .

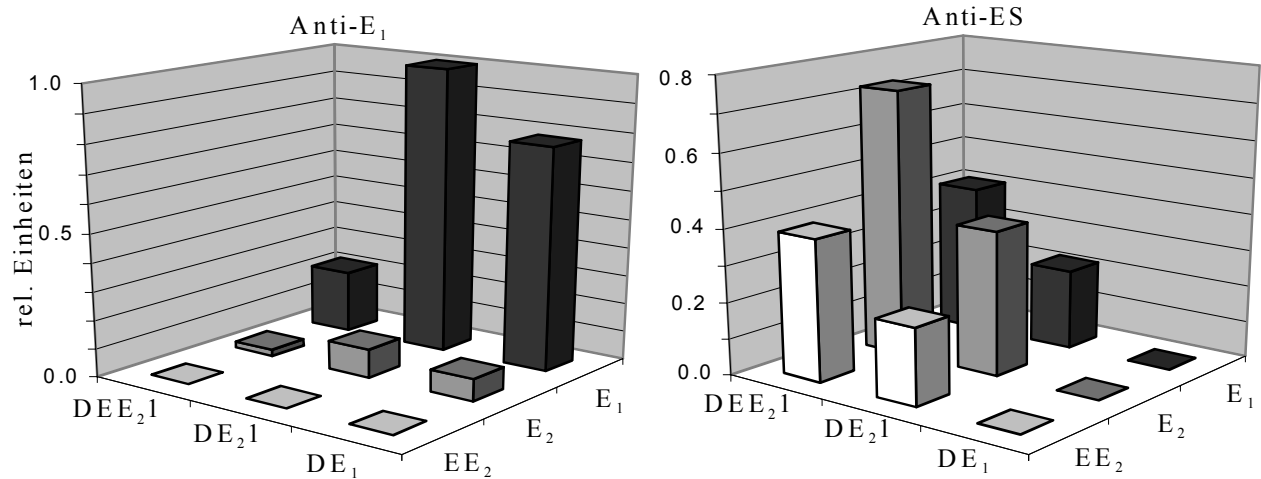


Abb. 37 Zusammenhang zwischen Analyt und Derivat für jeden Antikörper, durch Produktbildung aus Bindungskapazität und Kreuzreaktivität.

#### Parameter 2: Konzentration der Analyten

Um eine Kalibrierung mit zwei Analyten durchzuführen, muss zunächst ein Versuchsplan erstellt werden. Es gibt sehr viele verschiedene Pläne mit ihren speziellen Vor- und Nachteilen, s. Otto (1997). Für die binären Kalibrierungen wird ein vollfaktorieller Plan benutzt, bei dem jede Konzentration des einen Analyten mit jeder Konzentration des anderen Analyten kombiniert wird. Die Gesamtkonzentrationen an Estrogen variiert demnach und muss nicht bekannt sein.

Für die erste Kalibrierung wird ein Versuchsplan eingesetzt, der entsprechend der Konzentrationsstufen bei den Einzelanalyt-Kalibrierungen von 0 bis 15  $\mu\text{g/l}$  reicht und eine logarithmische Aufteilung zeigt, s. Kalibrierung 1 in Abb. 39. Die Mischungen werden zunächst dreifach gemessen. Auf diese zusätzliche statistische Sicherheit wird bei den nachfolgenden Kalibrierungen verzichtet, da letztlich nur die Konzentration eines einzelnen Analyten entscheidend ist und diese Konzentration bereits durch die Proben mehrfach gemessen wird, in denen die Konzentrationen des zweiten Analyten variiert. Aus diesem Grund werden die Messungen nur doppelt gemessen (Kalibrierung 2) und schließlich nur noch einfach (Kalibrierung 3-6). Anstatt dessen wird die Maschenweite des Versuchsplans stark verringert, indem mehr Konzentrationsstufen verwendet und zusätzlich noch die Arbeitsbereiche von 0 – 15  $\mu\text{g/l}$  auf 0 – 1  $\mu\text{g/l}$  vermindert werden. Konzentrationen über 1  $\mu\text{g/l}$  können dann nicht mehr genau vorhergesagt werden, jedoch ist dadurch der interessantere Bereich zwischen 0 und 1  $\mu\text{g/l}$  genauer zu erfassen. Die Gesamtanzahl der Messungen muss für ein neuronales Netz sehr hoch sein, um zutreffende Voraussagen zu

ermöglichen. Da der Transducer ebenso wie der Antikörper bei RT eine endliche Lebensdauer haben, ist die Zahl der durchführbaren Messungen begrenzt.

#### *Parameter 3: ANN*

Für jeden Analyten werden eigene Netze trainiert, da die Konzentrationen der verschiedenen Analyte nicht gekoppelt, sondern voneinander unabhängig sind (Despaigne et al. 1998). In die Eingabeneuronen werden die Signale der Spots eingegeben, wobei so viele Neuronen verwendet werden, wie Spots vorhanden sind. Bei den ersten zwei Kalibrierungen wird noch ein vollverdrahtetes Netz mit dem Pruning-Algorithmus verkleinert, bei den nachfolgenden Kalibrierungen entfällt das Pruning, da es zu keiner merklichen Verbesserung führt und einen immensen Rechenaufwand bedeutet. Statt dessen wird das Training mit der early-stopping-Methode rechtzeitig abgebrochen.

Interessanterweise zeigen Netze mit zwei versteckten Schichten bessere Vorhersagen als Netze mit nur einer Schicht. Das hat eine systematische Variation der Anzahl der Neuronen in einer und zwei versteckten Ebenen ergeben (Daten nicht gezeigt). Ein optimale Ergebnis wird bei Verwendung von zwei versteckten Ebenen mit fünf bzw. drei Neuronen erreicht.

Die Testproben liegen bei der Kalibrierung 1 bis 3 zwischen dem Raster des Kalibrierungsversuchsplans und werden in einem zusätzlichen Pipettierverfahren angesetzt. Durch diese Prozedur entstehen zusätzliche Pipettierungenauigkeiten, die für „echte“ Realproben bei korrekter Beprobung nicht auftreten würden. Um diesen Fehler zu minimieren und außerdem ein robusteres Bild über die Qualität der Vorhersage zu bekommen, werden 25 % der Daten nach dem Zufallsprinzip aus dem Probensatz ausgewählt und als Testdaten definiert. Dieser Datensatz wird nicht für das Training verwendet, sondern zu einer Überprüfung nach dem abgeschlossenen Training. Mit den restlichen Daten werden 20 neuronale Netze trainiert und das Netz mit den kleinsten Kreuzvalidierungsfehlern mit Hilfe der Testdaten überprüft. Diese Prozedur, die „bootstrapping“ genannt wird, wird mit einer neuen, zufälligen Auswahl an Testdaten wiederholt, insgesamt 10 bis 20 mal. Dadurch erhält man 300 bis 400 Vorhersagen für Testdaten. Für gleiche Konzentrationsstufen eines Analyten in den Testproben wird ein Mittelwert und seine Standardabweichung berechnet und in einem True-Predicted-Plot aufgetragen.

Wie bereits in Kapitel 4.1.6 beschrieben, ist in den Signalen ein zeitabhängiges Verhalten zu finden, das über Blindwert-Messungen eliminiert wird. In Kalibrierung 1 wird zum Anpassen eine exponentielle Funktion mit linearem Anteil verwendet. Bei den optimierten Kalibrierun-

gen werden Spline-Funktionen mit drei Freiheitsgeraden verwendet, da diese den Verlauf der Signale besser widerspiegeln.

Ein interessanter Punkt für die Auswertung mit ANN ist die Anzahl der Spots und ihre Modifizierung. Bei den optimierten Kalibrierungen (4-6) wird ein Transducer verwendet, der an Spot 2 und 5 mit DEE<sub>2</sub>1 modifiziert ist, an Spot 3 mit DE<sub>1</sub> und an Spot 4 mit DE<sub>2</sub>1. Bei dem Vergleich der RMSE für jeweils 20 Netze, s. Kapitel 3.6, die mit der systematischen Änderung an Spots trainiert werden, ist zu erkennen, dass das Rauschen bei der Verwendung aller vier Spots eine optimale Fehlerquote zeigt, dass es aber ausreicht, weniger Spots für die Auswertung zu verwenden. Hier ist die richtige Auswahl entscheidend. In Abb. 38 ist der Fehler der einzelnen Kombinationen für jeden Analyten aufgezeigt.

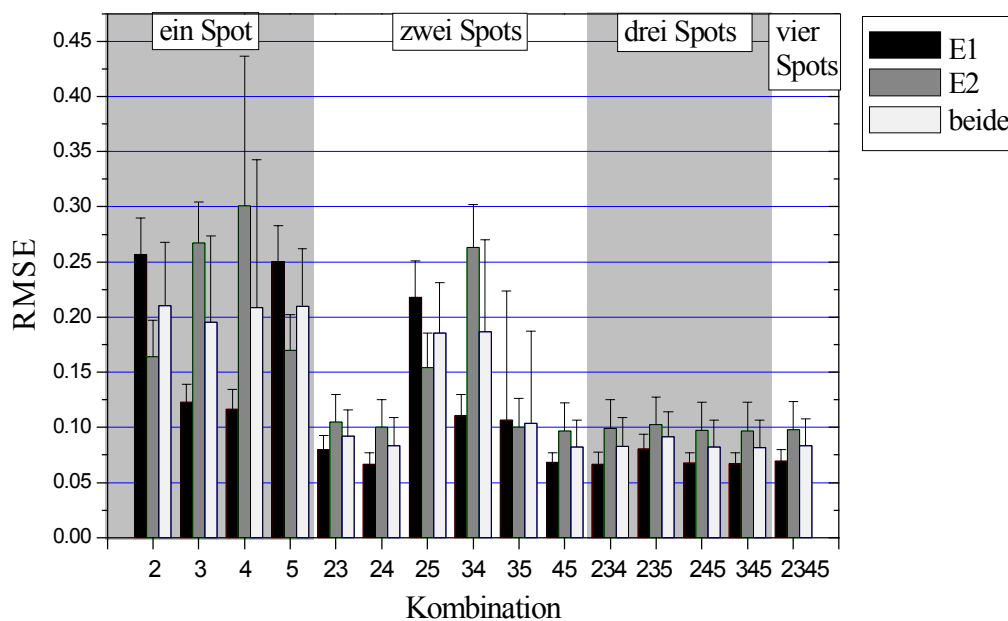


Abb. 38 Der Mittelwert von RMSE-Werten für jeweils 20 neuronale Netze wird verglichen.

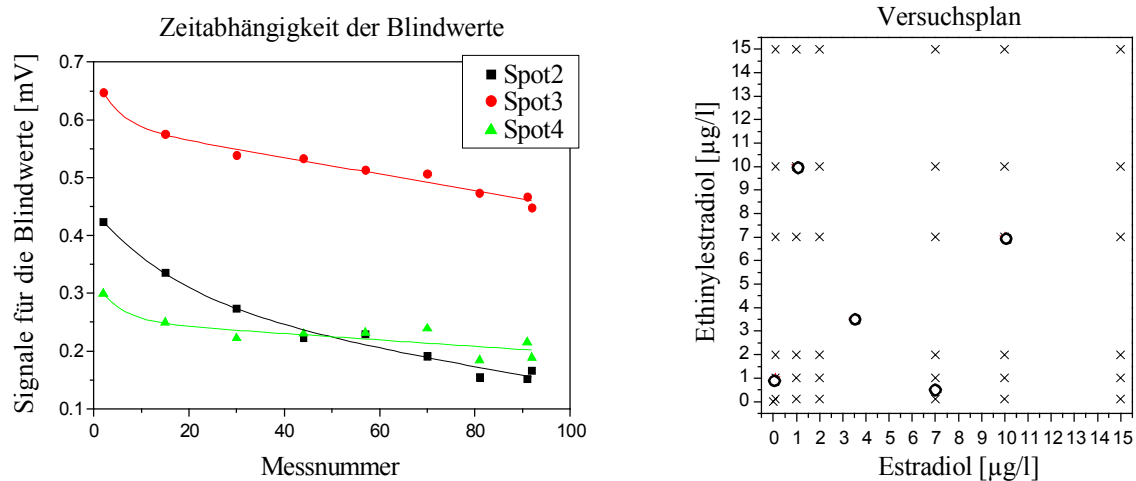
Mit dem Wilcoxon-Test für Paardifferenzen werden die RMSE-Werte verglichen (Sachs 1969). Die Fehler der Berechnung mit vier Spots (2-3-4-5) und der Berechnung mit drei Spots (3-4-5) sind sehr ähnlich ( $p = 0.6932$ ), ebenso der Vergleich der Vier-Spot-Berechnung mit den Kombinationen 2-4-5 ( $p = 0.795$ ), 2-3-4 ( $p = 0.7691$ ) und den Kombinationen mit nur zwei Spots 2-4 ( $p = 0.9463$ ) und 4-5 ( $p = 0.8099$ ). Mit den Kombinationen 2-3-5 ( $p = 0.0799$ ), 2-3 ( $p = 0.0555$ ) und 3-5 ( $p = 0.0668$ ) besteht zwar auch eine signifikante Ähnlichkeit, jedoch ist sie sehr viel geringer als bei den vorherigen Kombinationen. Die Kombinationen 3-4 ( $p = 0.0000$ ) und 2-5 ( $p = 0.0000$ ) haben keine Ähnlichkeit mit der Kombination aus allen Spots, da Spot 3 und 4 fast ausschließlich die Information über Anti-E<sub>1</sub> enthalten und Spot 2 und 5 die Information über Anti-ES.



Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, dass der Spot 4 von entscheidender Bedeutung ist, da nur Kombinationen, die diesen Spot enthalten, eine gleich hohe Qualität erreichen. Außerdem sind Spot 2 und 5 nicht nur von der chemischen Struktur äquivalent, sondern auch von ihrem Informationsgehalt, obwohl an Spot 5 die Laserleistung geometrisch bedingt geringer ist. Abschließend ist zu sagen, dass es theoretisch sogar ausreichen würde, nur Spot 2 und 4 oder Spot 4 und 5 für die Auswertung zu verwenden.

### Binäre Kalibrierung 1

Die erste Kalibrierung wird mit einem Transducer durchgeführt, der an Spot 2 mit DEE<sub>2</sub>1, an Spot 3 mit DE<sub>2</sub>1 und an Spot 4 mit DE<sub>1</sub> modifiziert ist. Sieben Konzentrationsstufen werden verwendet (0; 0.1; 1; 2; 7; 10; 15 µg/l). Die Analyte Estradiol und Ethinylestradiol werden mit gleichen Konzentrationen von den zwei Antikörpern Anti-E1 (1 µg/ml) und Anti-ES (1 µg/ml) erfasst. Als Regenerationsmittel wird HCl pH 1.5 und Acetonitril verwendet. Zur Eliminierung der Zeitabhängigkeit der Daten werden die Blindwerte mit einem exponentiellen Fit mit linearem Anteil angepasst und alle Signale darauf referenziert. Der Versuchsplan hat eine logarithmische Struktur, die auch bei den Einzelanalyt-Kalibrierungen angewandt wird. Die Kalibrierproben wurden doppelt und die Testproben dreifach vermessen. Die Signale der Testproben werden gemittelt und dann vorausgesagt, so dass keine Standardabweichung aufgetragen werden kann.



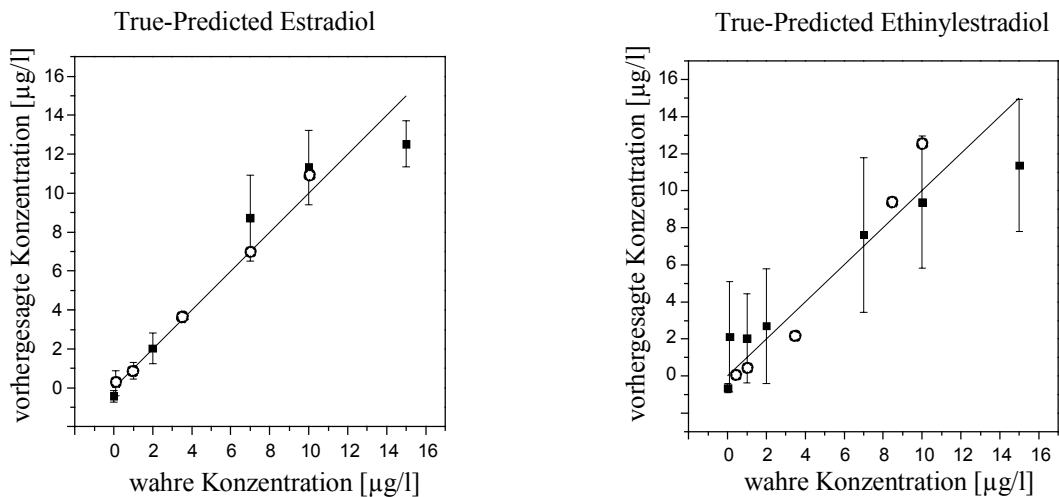


Abb. 39 Die erste Kalibrierung von Estradiol und Ethinylestradiol wird mit Anti- $E_1$  (1 µg/ml) und Anti-ES (1 µg/ml) an Spot 2 DEE<sub>2</sub>1, Spot 3 DE<sub>2</sub>1 und Spot 4 DE<sub>1</sub> durchgeführt. Die Zeitabhängigkeit wird mit einer Exponentialfunktion mit linearerem Anteil angepasst. Der Versuchsplan ist logarithmisch von 0 bis 15 µg/l, (■ Kreuzkalibrierung während des Trainings, ○ Testdaten).

Bei dieser Kalibrierung liegt die Nachweisgrenze für Estradiol bei 7 µg/l und für Ethinylestradiol bei 10 µg/l. Die Standardabweichungen sind extrem hoch, insbesondere für Ethinylestradiol. Die Testdaten werden nur für Estradiol akzeptabel vorhergesagt.

### Binäre Kalibrierung 2

Bei der zweiten Kalibrierung von Estradiol und Ethinylestradiol ist die Antikörperkonzentration auf 0.25 µg/ml reduziert, jedoch wieder für beide Antikörper gleich. Für die Regeneration wird für diese Kalibrierung und alle nachfolgenden SDS 0.5 % bei pH 1.9 verwendet, das die Oberfläche besser regeneriert und damit die Zeitabhängigkeit, besonders an Spot 2, verringert. Die Reihenfolge der Spots lautet: Spot 2 DEE<sub>2</sub>1, Spot 3 DE<sub>1</sub> und Spot 4 DE<sub>2</sub>1. Der Versuchsplan ist auf einen Bereich von 0 – 10 µg/l beschränkt, während die Anzahl der Konzentrationsstufen gleich bleibt (0; 0.1; 0.3; 0.9; 2; 4; 10 µg/l). Der Schwerpunkt ist zu kleineren Konzentrationen verschoben. Die Testwerte sind extra gemischt und werden wie die Kalibrierproben doppelt gemessen. Die Anpassung der Blindwerte wird mit einer Spline-Funktion mit drei Freiheitsgraden durchgeführt.

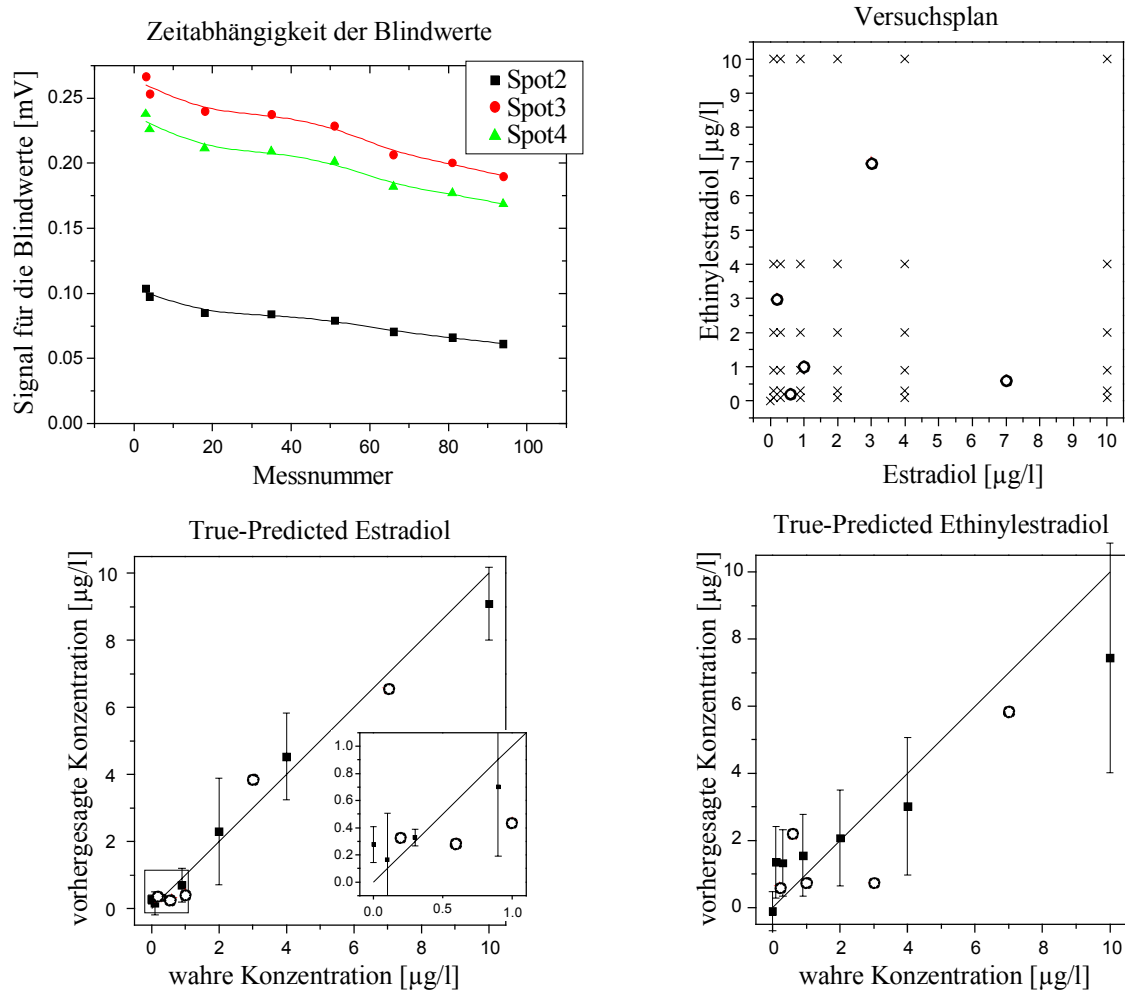
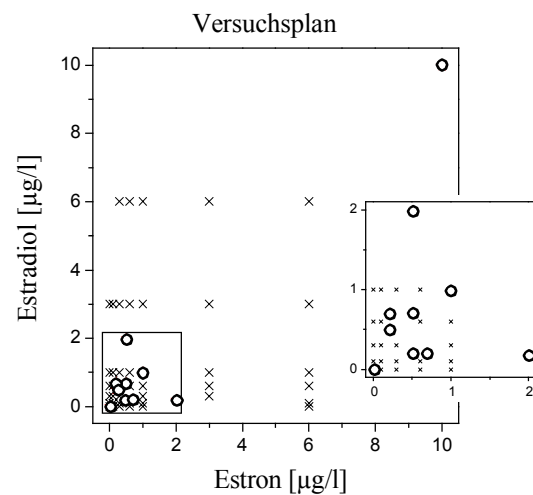
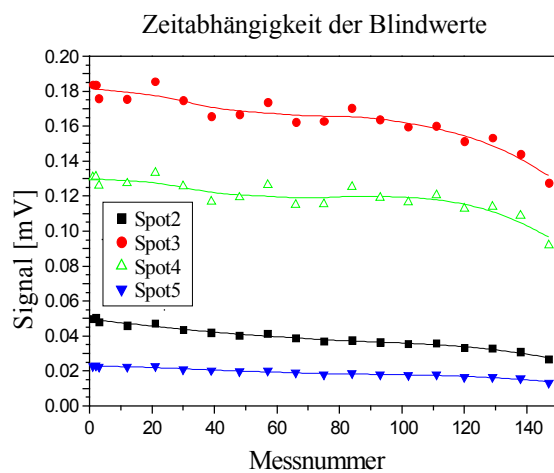


Abb. 40 Die zweite Kalibrierung von Estradiol und Ethinylestradiol wird mit Anti- $E_1$  ( $0.25 \mu\text{g/ml}$ ) und Anti- $E_S$  ( $0.25 \mu\text{g/ml}$ ) an Spot 2  $DEE_2$ , Spot 3  $DE_1$  und Spot 4  $DE_2$  durchgeführt. Die Zeitabhängigkeit wird mit einer Spline-Funktion angepasst. Der Versuchsplan ist logarithmisch von 0 bis  $10 \mu\text{g/l}$  aufgeteilt, (■ Kreuzkalibrierung während des Trainings, ○ Testdaten).

Diese Kalibrierung hat sich durch die Verwendung von geringeren Konzentrationen der beiden Antikörper im Vergleich zur ersten Kalibrierung noch verschlechtert. Die Standardabweichungen sind extrem hoch. Die Mittelwerte der Kreuzvalidierung und der Testdaten liegen außerhalb der Diagonalen. Die Nachweisgrenze für Estradiol liegt bei  $4 \mu\text{g/l}$  und für Ethinylestradiol außerhalb des Messbereichs. Für beide Analyte ist die Kalibrierung inakzeptabel.

### Binäre Kalibrierung 3

Zur weiteren Optimierung wird auf ein anderes Analytenpaar ausgewichen, da die Vorhersage von Ethinylestradiol neben Estradiol sehr schwierig ist, wie aus Abb. 37 hervorgeht. In dieser Kalibrierung wird das vielversprechende Paar Estron/Estradiol verwendet. Anti-ES wird in einer höheren Konzentration als Anti-E<sub>1</sub> eingesetzt. Zusätzlich zu den anderen Spots wird auch Spot 5 genutzt und dort das Derivat DEE<sub>2</sub>1 immobilisiert, welches auch an Spot 2 zu finden ist. Der Versuchsplan wird logarithmisch mit sieben Konzentrationsstufen angelegt, diesmal bis maximal 6 µg/l (0; 0.1; 0.3; 0.6; 1; 3; 6 µg/l). Die Kalibrierdaten werden zweifach gemessen, die Testdaten dreifach. Jedoch werden die Testdaten hier letztlich für die Kalibrierung genutzt, da z.B. die Probe mit zweimal 10 µg/l selbstverständlich nicht erkannt wird, da sie außerhalb des eigentlichen Kalibrierbereiches ist. Statt dessen wird, wie bei den folgenden Kalibrierkurven auch, ein Teil der Daten nach dem Zufallsprinzip als Testdaten definiert, in diesem Fall 15 Konzentrationen mit jeweils zwei Messungen. Mit den restlichen Daten werden 20 neuronale Netze trainiert und das Netz mit den kleinsten Kreuzvalidierungsfehlern mit den unbekanntem Testdaten überprüft. Diese Prozedur wurde 10 mal mit verschiedenen Testdaten und entsprechend neu trainierten Netzen durchgeführt, so dass man 300 Vorhersagen für einen Analyten erhält und damit eine robuste Überprüfung der Kalibrierung. Die Gesamtzahl der Proben liegt bei 147.



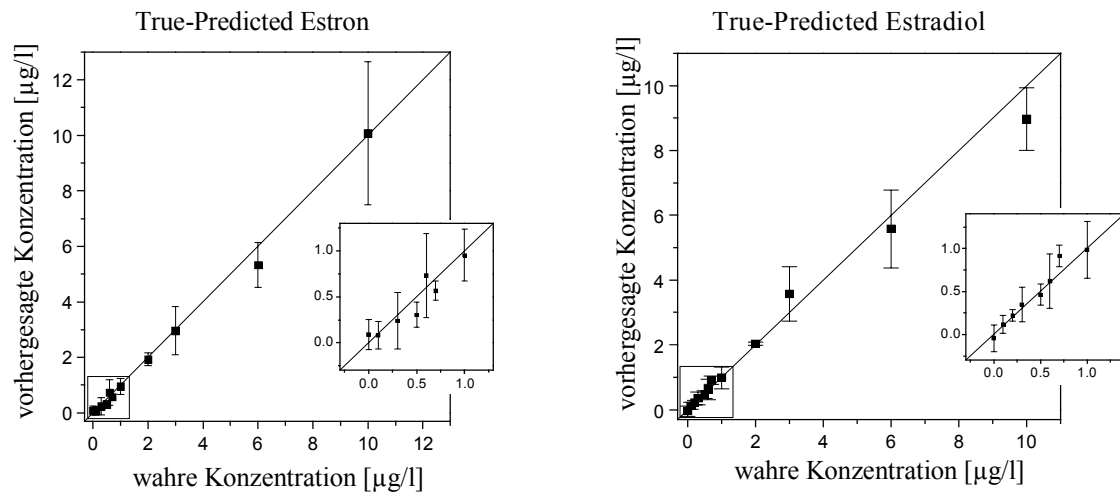


Abb. 41 Die dritte Kalibrierung von Estron und Estradiol wird mit Anti- $E_1$  (0.25 µg/ml) und Anti-ES (0.38 µg/ml), an Spot 2 und 5 DEE<sub>2</sub>1, Spot 3 DE<sub>1</sub>, Spot 4 DE<sub>2</sub>1 durchgeführt. Die Zeitabhängigkeit wird mit Spline-Funktionen mit 3 Freiheitsgeraden angepasst. Der Versuchsplan ist logarithmisch von 0 bis 10 µg/l, (x Kalibrierproben, ○ Testdaten als Kalibrierdaten verwendet, ■ Vorhersage zufällig ausgewählter Testdaten).

Obwohl die Antikörperkonzentration in der gleichen Größenordnung liegt wie bei der Kalibrierung 2, wird hier ein sehr viel besseres Ergebnis erzielt. Hauptsächlich wird dies durch den Wechsel der Analyte erreicht, wobei auch die Erhöhung der Kalibrierprobenanzahl einen bedeutenden Einfluss hat. Die Nachweisgrenze ist für Estron 0.5 µg/l und für Estradiol 1 µg/l.

### Binäre Kalibrierung 4

Wie bereits in der letzten Kalibrierung begonnen, wird die Optimierung des Versuchsplans mit der Kombination Estron/Estradiol fortgesetzt. Die Kalibrierproben werden einfach gemessen, und der Kalibrierbereich wird auf 0 bis 1  $\mu\text{g/l}$  eingegrenzt. Insgesamt werden 147 Messungen durchgeführt.

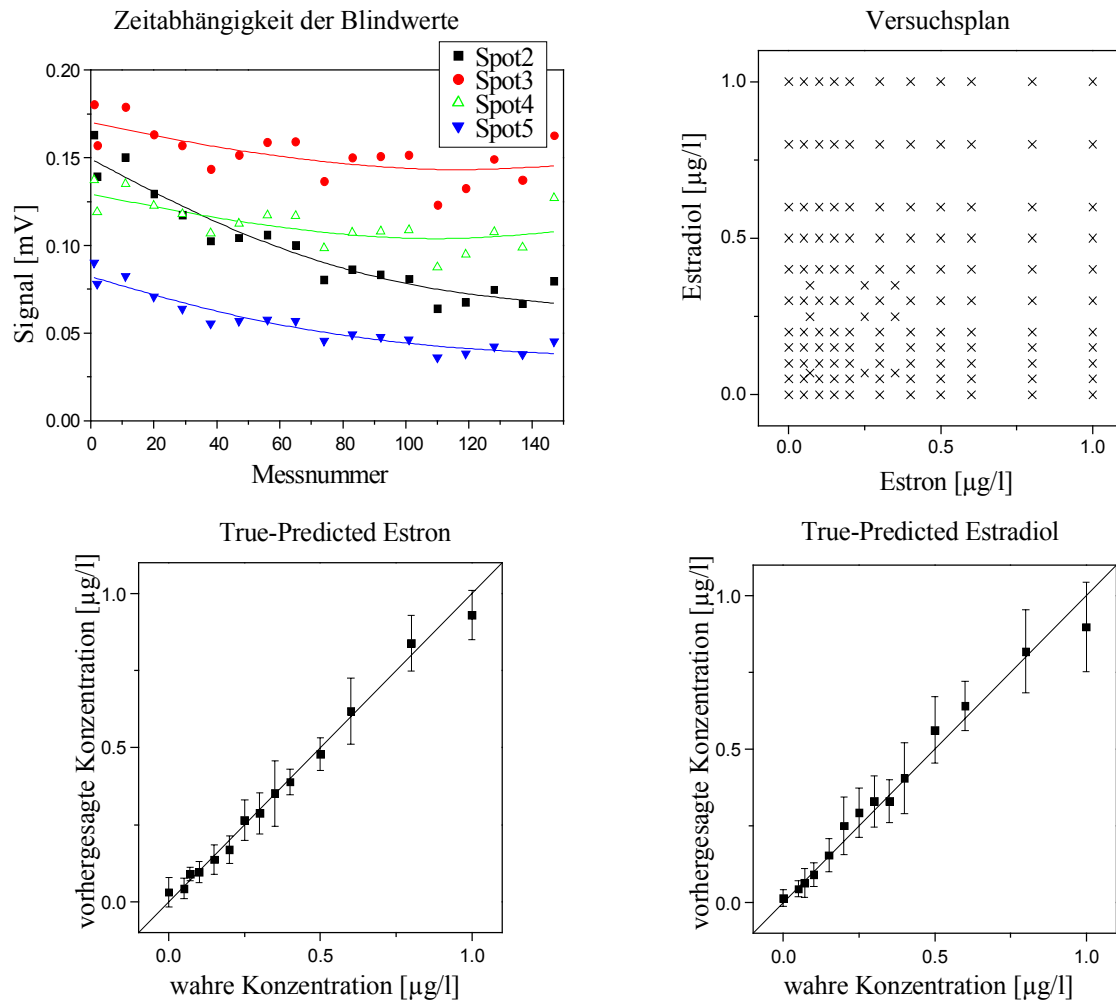


Abb. 42 Die Kalibrierung von Estron und Estradiol wird mit Anti- $E_1$  ( $0.19 \mu\text{g/ml}$ ) und Anti- $E_2$  ( $0.37 \mu\text{g/ml}$ ) an Spot 2 und 5  $DEE_2$ , Spot 3  $DE_1$ , Spot 4 durchgeführt. Die Zeitabhängigkeit wird mit Spline-Funktionen mit 3 Freiheitsgeraden angepasst. Die Konzentrationen im Versuchsplan liegen zwischen 0 und 1  $\mu\text{g/l}$ , (■ Vorhersage zufällig ausgewählter Testdaten).

Bei dieser Kalibrierung sind alle Parameter optimal eingestellt, so dass Nachweisgrenzen für Estron von  $0.15 \mu\text{g/l}$  und für Estradiol von  $0.25 \mu\text{g/l}$  erreicht werden. Die höchste Konzentration wird bei allen Kalibrierungen nicht korrekt vorhergesagt, da sie am Rand der Kalibrierung liegt, aus diesem Grund ist der Arbeitsbereich kleiner als der Kalibrierbereich.

## Binäre Kalibrierung 5

Mit den gleichen Parametern wird die Kalibrierung für Estron und Ethinylestradiol durchgeführt. Der Versuchsplan, der Transducer und die Antikörperkonzentrationen werden wie in der vorherigen Kalibrierung angewendet.

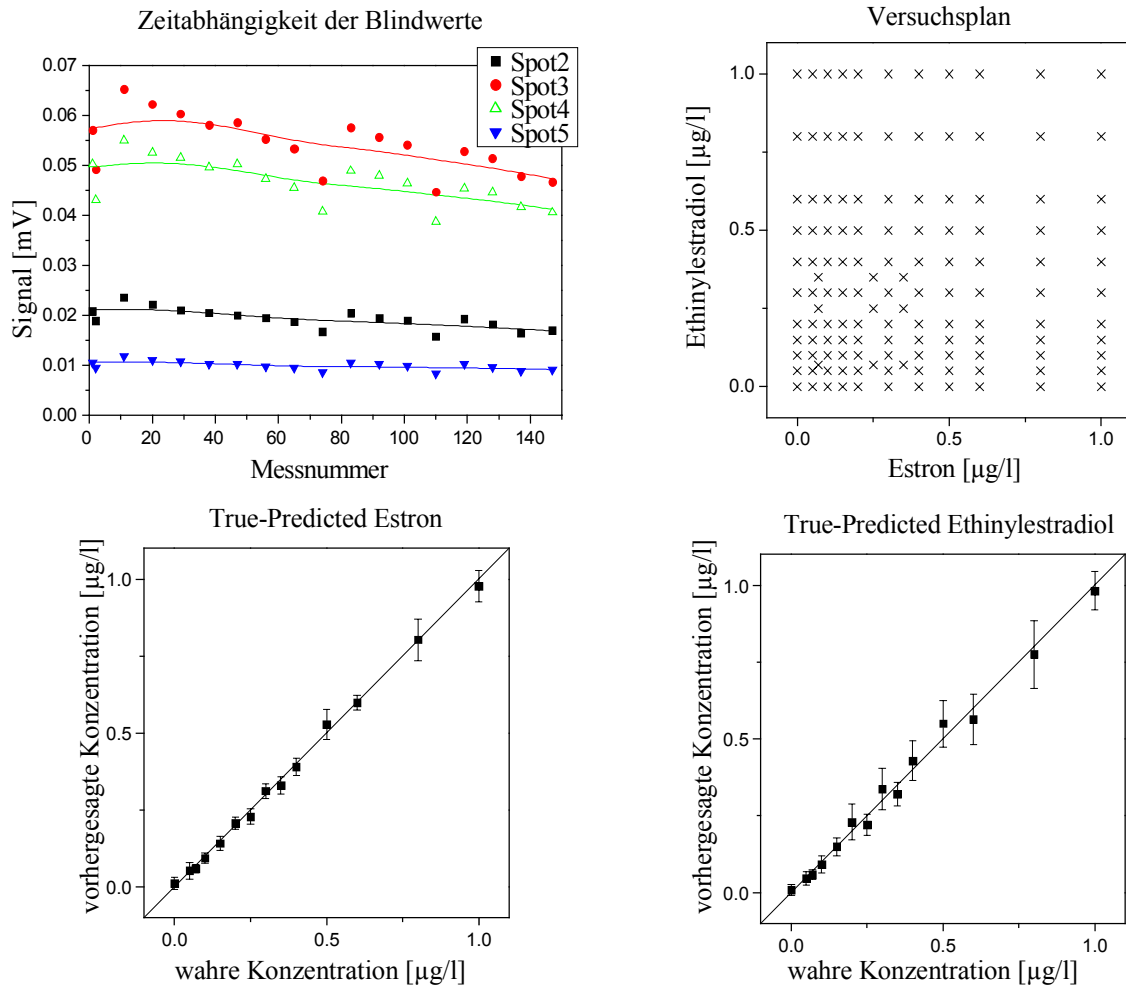


Abb. 43 Diese Kalibrierung von Estron und Ethinylestradiol wird mit Anti- $E_1$  ( $0.19 \mu\text{g/ml}$ ) und Anti- $E_S$  ( $0.37 \mu\text{g/ml}$ ) an Spot 2 und 5  $DEE_2I$ , Spot 3  $DE_1$  und Spot 4  $DE_2I$  durchgeführt. Die Zeitabhängigkeit wird mit Spline-Funktionen mit 3 Freiheitsgeraden angepasst. (■ Vorhersage zufällig ausgewählter Testdaten).

Durch Verwendung einer Spline-Funktion mit drei Freiheitsgeraden kann der Verlauf der Blindwerte nicht optimal angepasst werden. Trotz dieses Nachteils lässt sich die Mischung Estron/Ethinylestradiol sehr gut trennen. Die Nachweisgrenzen liegen für Estron bei  $0.1 \mu\text{g/l}$  und für Ethinylestradiol bei  $0.1 \mu\text{g/l}$  und sind damit besser als im Gemisch Estron/Estradiol.

## Binäre Kalibrierung 6

Zuletzt wird noch einmal die Kombination Estradiol mit Ethinylestradiol gemessen, diesmal mit den optimierten Parametern. Der Versuchsplan, die Antikörperkonzentration und Spotreihenfolge sind entsprechend der 4. Kalibrierung ausgewählt worden.

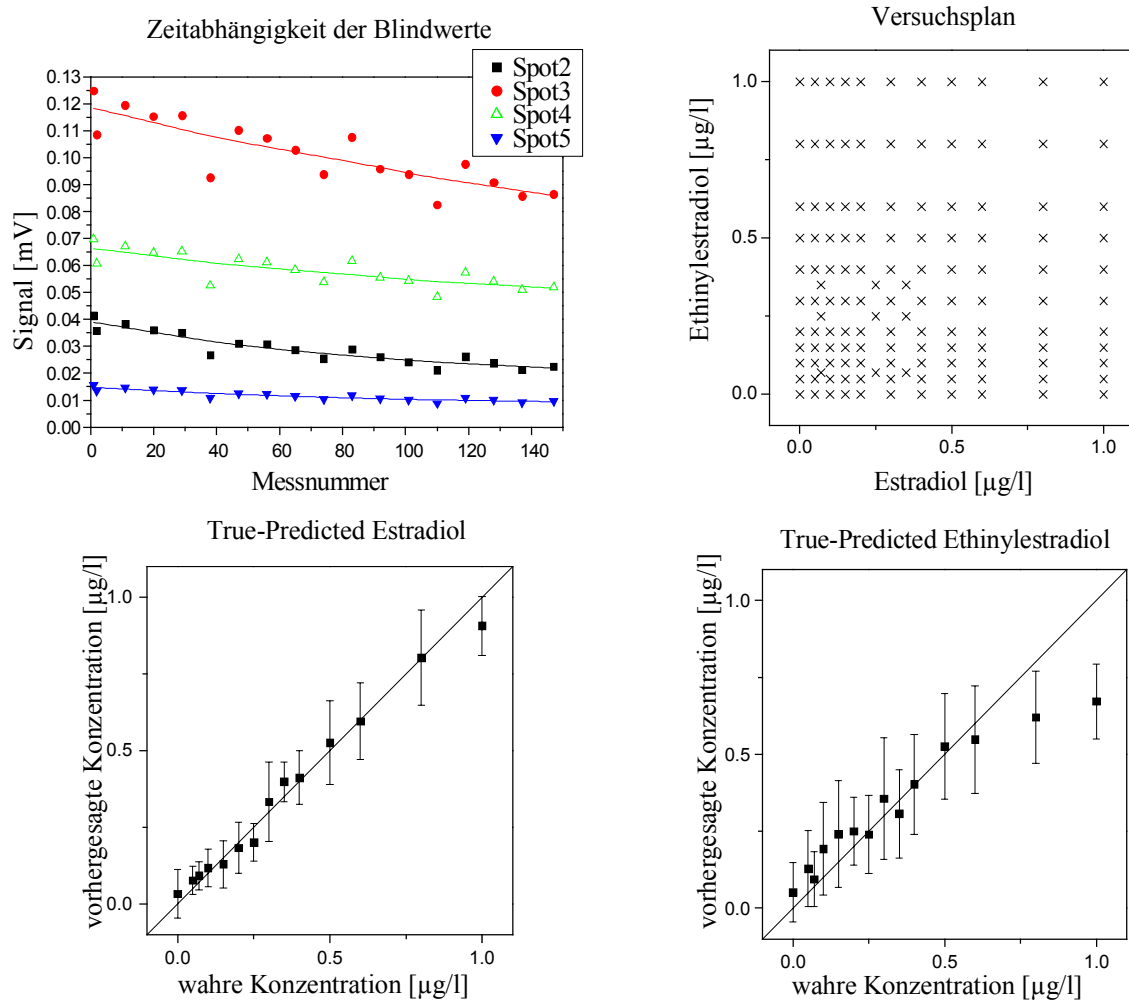


Abb. 44 Diese Kalibrierung von Estradiol und Ethinylestradiol wird mit Anti- $E_1$  (0.19  $\mu\text{g/ml}$ ) und Anti- $E_S$  (0.37  $\mu\text{g/ml}$ ) an Spot 2 und 5  $DEE_2I$ , Spot 3  $DE_1$ , Spot 4  $DE_2I$  durchgeführt. Die Zeitabhängigkeit wird mit Spline-Funktionen mit 3 Freiheitsgeraden angepasst. Die Konzentrationen im Versuchsplan liegen zwischen 0 und 1  $\mu\text{g/l}$ , (■ Vorhersage von zufällig ausgewählten Testdaten).

Bei dieser Kalibrierung zeigt sich, dass selbst die Optimierung der Parameter nicht zu einer guten Trennung der beiden Analyte Estradiol und Ethinylestradiol führt. Die Nachweisgrenzen liegen für Estradiol bei 0.35  $\mu\text{g/l}$  und für Ethinylestradiol bei 0.5  $\mu\text{g/l}$ .



*Zusammenfassung: Binäre Systeme*

Anhand der Nachweisgrenzen in Tab. 17 ist zu erkennen, dass bei den Kalibrierungen 4 – 6 die Parameter optimal ausgewählt wurden. Zu diesen Parametern gehört die erhöhte Antikörperkonzentration von Anti-ES im Vergleich zu Anti-E1. DE<sub>2</sub>1 an Spot vier ist extrem wichtig für die Kalibrierungen. Spot 2 und Spot 5, die beide mit DEE<sub>2</sub>1 modifiziert sind, sind äquivalent, daher ist es ausreichend, einen von beiden für die Kalibrierungen zu verwenden. Die Analyte sind in den Kombinationen Estron/Estradiol und Estron/Ethinylestradiol hervorragend trennbar, die dritte Kombination Estradiol/Ethinylestradiol bereitet jedoch Schwierigkeiten, so dass die Nachweisgrenzen vergleichbar hoch sind. Der Versuchsplan sollte so angelegt sein, dass möglichst viele verschiedene Mischungen mit einem sehr engmaschigen Netz über den Konzentrationsbereich gemessen werden können. Der Kalibrierbereich wurde deshalb auf 0 bis 1 µg/l eingengt.

Tab. 17 *Vergleich der Nachweisgrenzen der binären Kalibrierungen mit Estrogenen in [µg/l], berechnet nach Glg. 54.*

binär	Estron	Estradiol	Ethinylestradiol
Kalibrierung 1		7	10
Kalibrierung 2		4	> 10
Kalibrierung 3	0.5	1	
Kalibrierung 4	0.15	0.25	
Kalibrierung 5	0.1		0.1
Kalibrierung 6		0.35	0.5

### 4.3.2. Ternäre Mischungen

Die binären Kalibrierungen haben gezeigt, dass die Gemische Estron/Estradiol und Estron/Ethinylestradiol sehr gut getrennt werden und die Nachweisgrenzen zwischen 0.1 und 0.3 µg/l liegen. Allerdings ist Ethinylestradiol in Gegenwart von Estradiol mit den vorhandenen Antikörpern nur schwer zu messen.

Da für die Estrogene nur zwei Antikörper in ausreichender Menge zur Verfügung stehen, wird bei den ternären Kalibrierungen ein Antikörper für Bisphenol A hinzugenommen, so dass die Gemische Estron/Estradiol/Bisphenol A und Estron/Ethinylestradiol/Bisphenol A untersucht werden können. Außerdem werden mit diesen Kalibrierungen Realproben untersucht, zunächst Flusswasser, das mit HPLC gemessen wurde und Bisphenol A enthält. Dieses wird zusätzlich mit den Estrogenen in verschiedenen Konzentrationen versetzt. Anschließend wird Trinkwasser untersucht, das mit den Estrogenen und Bisphenol A in verschiedenen Konzentrationen versetzt wird.

#### *Kalibrierung 1: Estron/Estradiol/Bisphenol A mit Flusswasserproben*

Bei dieser Kalibrierung wird ein vollfaktorieller Versuchsplan für Estron und Estradiol mit 11 Konzentrationsstufen im Bereich von 0 bis 1 µg/l verwendet. Da Bisphenol A nur geringen Einfluss auf die Messung der Estrogene haben sollte, wird dieses mit 20 Konzentrationsstufen von 0 bis 0.35 µg/l in zufälliger Reihenfolge zum vollfaktoriellen Plan der Estrogene hinzugegeben. Ein vollfaktorieller Plan für alle drei Analyte würde die sinnvolle, maximale Anzahl an Kalibrierproben überschreiten. Zusätzlich werden noch Realproben mit natürlichem Bisphenol A-Gehalt mit den beiden Estrogenen in verschiedenen Konzentrationen aufgestockt. Die Bisphenol A-Konzentration ist mit HPLC bestimmt worden, allerdings sind die Proben einige Wochen im Kühlschrank gelagert worden, bevor sie mit dem Biosensor für die Multi-Analyt-Kalibrierungen genutzt werden. Daher ist es durchaus möglich, dass das Bisphenol A abgebaut wurde.

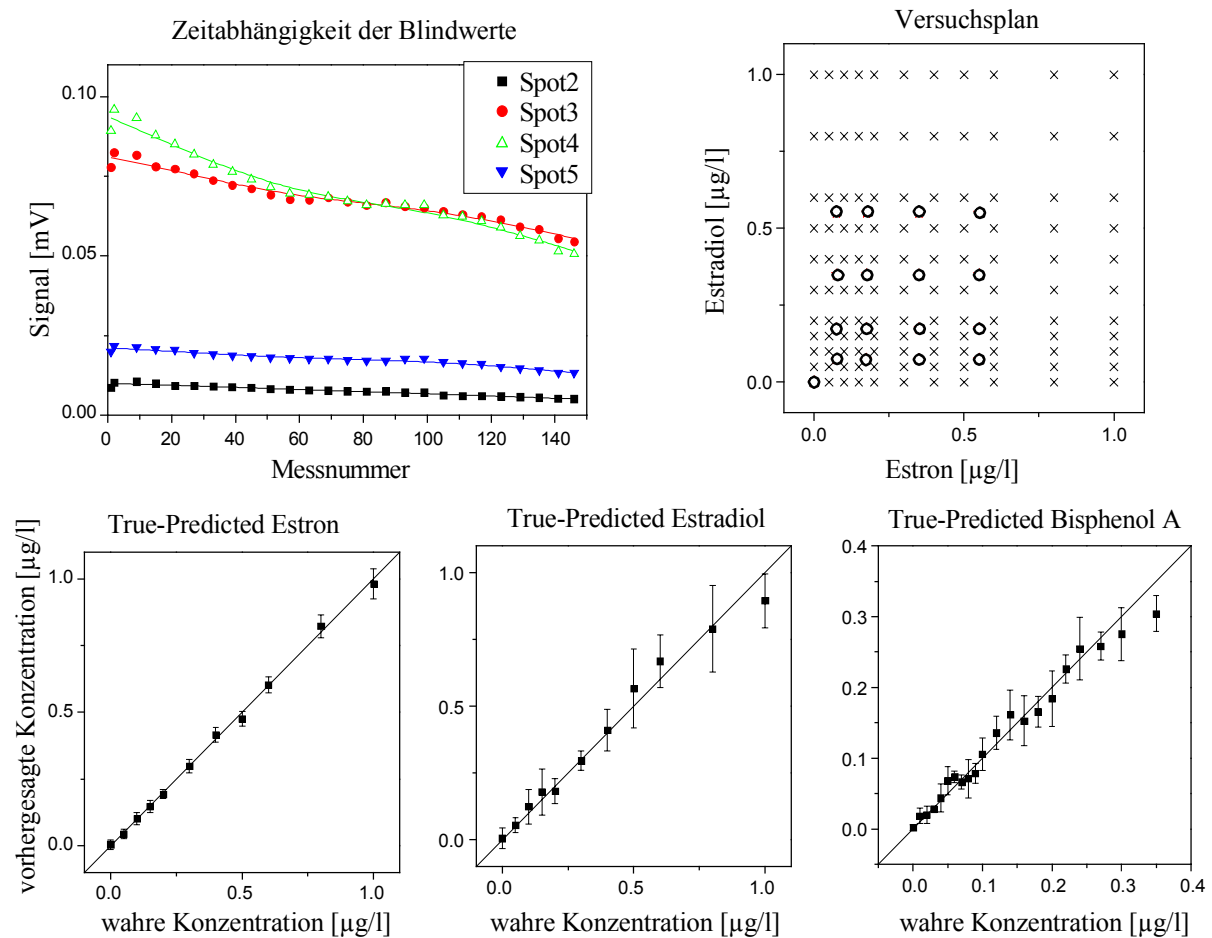


Abb. 45 Kalibrierung mit Estron, Estradiol und Bisphenol A mit Anti- $E_1$  ( $0.1 \mu\text{g/l}$ ), Anti- $E_S$  ( $0.2 \mu\text{g/l}$ ) und Anti-BPA ( $0.2 \mu\text{g/l}$ ). Vier Spots werden für die Auswertung genutzt. An Spot 2 ist  $DEE_2I$ , an Spot 3  $DE_1$ , an Spot 4  $DE_2I$  und an Spot 5  $DBPA2$  gebunden. Die Nullmessungen werden mit Spline-Funktionen mit 4 Freiheitsgeraden angepasst. Der Versuchsplan zeigt nur die Konzentrationen für Estradiol und Estron ( $\circ$  aufgestockte Realproben).

Für Estron wird eine Nachweisgrenze von  $0.1 \mu\text{g/l}$  erhalten, für Estradiol von  $0.2 \mu\text{g/l}$  und für Bisphenol A von  $0.03 \mu\text{g/l}$ . Diese Ergebnisse sind mit der Einzelanalyt-Kalibrierung vergleichbar. Interessanterweise ist das System Bisphenol A nicht vollständig abgekoppelt von den anderen Analyten zu betrachten, da die Signale jeweils von allen Analyten beeinflusst werden, s. dazu Kapitel 4.1.1 und 4.1.4. Obwohl die Rohsignale von Spot 2 und 5 extrem niedrig sind, wird hier trotzdem eine gute Kalibrierung erreicht.

Die Realproben bestehen aus vier verschiedenen Matrices. Realmatrix 1 und 4 sind Flusswasserproben aus dem Rhein, Matrix 2 und 3 sind Grundwasserproben.

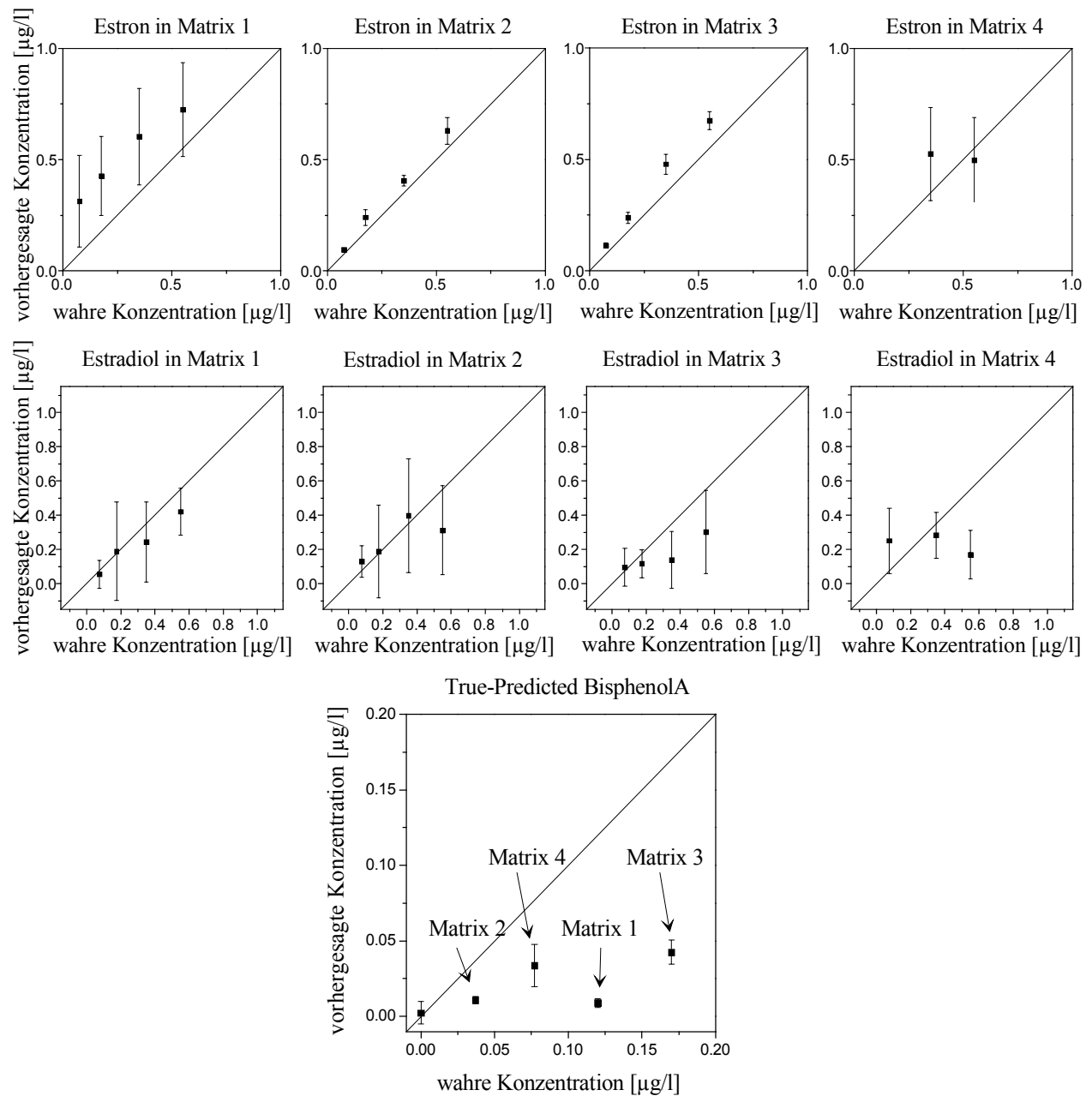


Abb. 46 True-Predicted-Auftragungen für Estron, Estradiol und Bisphenol A in verschiedenen Realmatrizes in der Mischkalibrierung  $E_1/E_2/BPA$ . Der Versuchsplan mit den aufgestockten Konzentrationen für Estron und Estradiol ist in Abb. 45 zu finden.

Die Realprobenmessungen zeigen, dass die Matrizes die Antikörperkonzentration verringern. Erkennbar wird dies in einer systematischen Abweichung der aufgestockten Estron-Proben in den True-Predicted-Auftragungen. Zusätzlich wird dies durch die zum Teil hohen Standardabweichungen in den Flusswasserproben belegt. Die Grundwasserproben zeigen trotz leichtem Bias akzeptable Übereinstimmung der vorhergesagten zur realen Konzentration. Bei den Bisphenol A-Konzentrationen bestätigt sich die Vermutung, dass durch die längere Lagerzeit

das Bisphenol A zum Teil abgebaut wurde. Es wurden sehr viel geringere Konzentrationen gefunden, als die Messungen mit der HPLC ergeben hatten. Wenn man das Ergebnis der Estrogene mit einbezieht, müsste man theoretisch sogar mehr Bisphenol A finden als tatsächlich vorhanden ist.

### Kalibrierung 2: Estron/Estradiol/Bisphenol A mit Trinkwasserproben

Bei der zweiten Kalibrierung wird noch einmal das gleiche System kalibriert, diesmal wird als Realprobe Trinkwasser, mit Estron, Estradiol und Bisphenol A versetzt, verwendet. Anti-ES wird in einer erhöhten Konzentration eingesetzt.

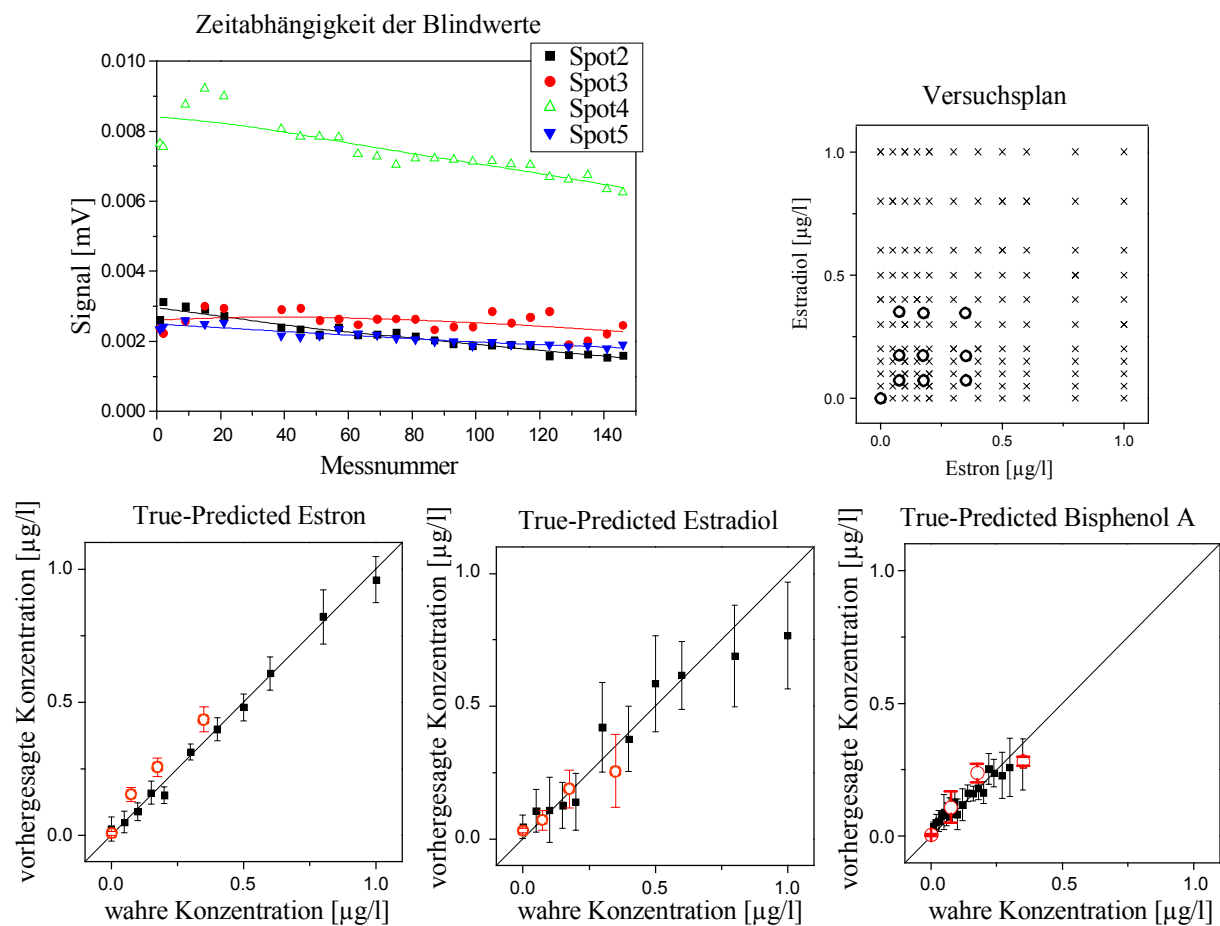


Abb. 47 Kalibrierung mit Estron, Estradiol und Bisphenol A mit Anti- $E_1$  (0.1 µg/l), Anti-ES (0.3 µg/l), Anti-BPA (0.2 µg/l) und 0.5 mg/ml Ovalbumin. Vier Spots werden für die Auswertung genutzt. An Spot 2 ist DEE<sub>2</sub>1, an Spot 3 DE<sub>1</sub>, an Spot 4 DE<sub>2</sub>1 und an Spot 5 DBPA2 immobilisiert. Die Nullmessungen werden über Spline-Funktionen mit 4 Freiheitsgeraden angepasst. (○ aufgestockte Trinkwasserproben).

Die Nachweisgrenzen liegen für Estron bei 0.2  $\mu\text{g/l}$ , für Estradiol bei 0.3  $\mu\text{g/l}$  und für Bisphenol A bei 0.12  $\mu\text{g/l}$ . Die Nachweisgrenzen sind hier etwas höher als bei der vorherigen Kalibrierung, da die Rohsignale deutlich geringer sind. Die Realproben mit Trinkwassermatrix unterscheiden sich nicht von den Puffer-Kalibrierlösungen. Das heißt, diese Matrix stellt für den Antikörper keinerlei Probleme dar.

### Kalibrierung 3: Estron/Ethinylestradiol/Bisphenol A mit Trinkwasserproben

Bei dieser Kalibrierung werden die gleichen Parameter wie bei der letzten Kalibrierung für die Analyten Estron, Ethinylestradiol und Bisphenol A eingesetzt. Die Trinkwasserproben sind mit diesen Analyten versetzt.

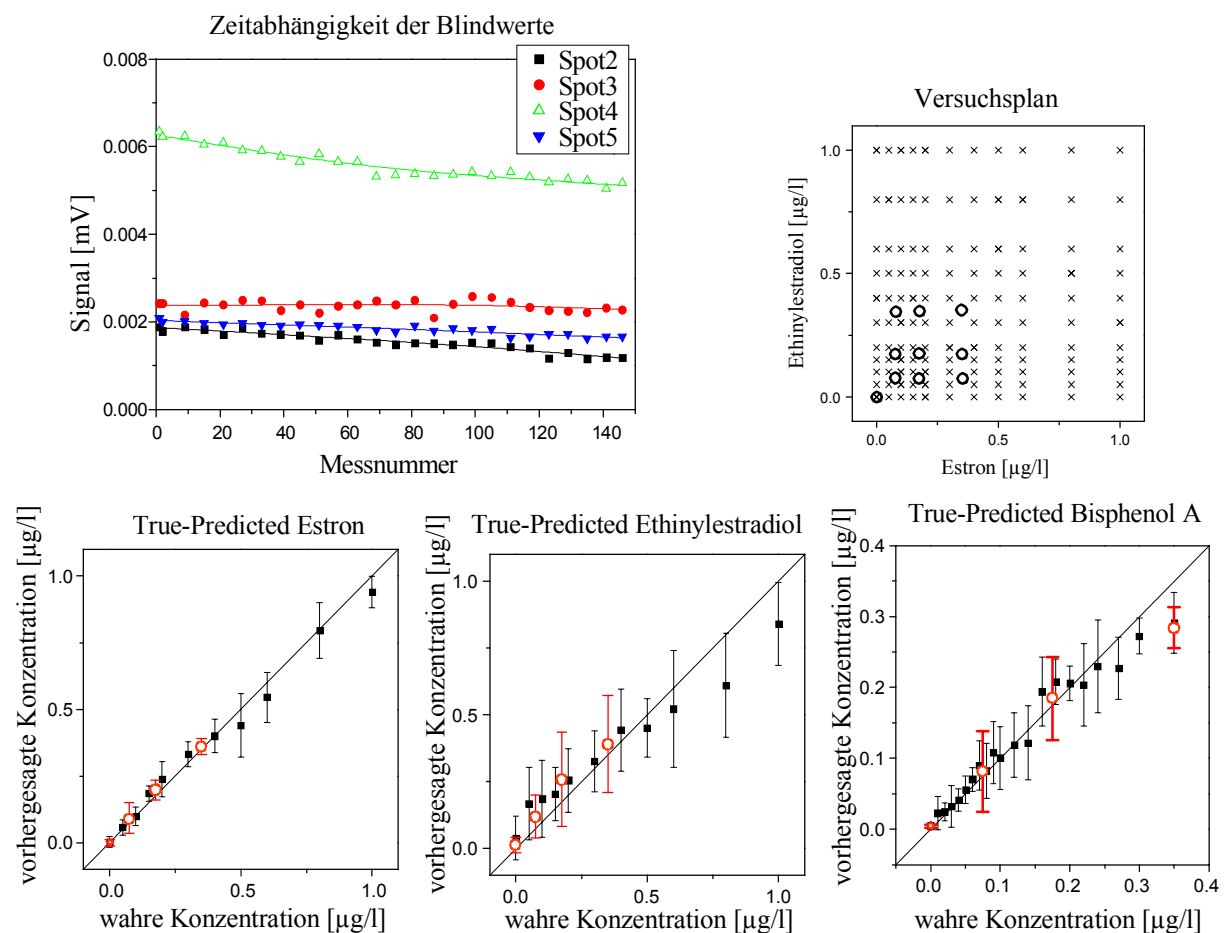


Abb. 48 Kalibrierung mit Estron, Ethinylestradiol und Bisphenol A mit Anti- $E_1$  (0.1  $\mu\text{g/l}$ ), Anti- $E_S$  (0.3  $\mu\text{g/l}$ ) und Anti-BPA (0.2  $\mu\text{g/l}$ ). Vier Spots werden für die Auswertung genutzt. An Spot 2 ist  $DEE_2$ , an Spot 3  $DE_1$ , an Spot 4  $DE_2$  und an Spot 5  $DBPA_2$  immobilisiert. Die Nullmessungen werden mit Spline-Funktionen mit 4 Freiheitsgeraden angepasst, (○ aufgestockte Trinkwasserproben).

Obwohl auch hier nur extrem niedrige Rohsignale auf dem Transducer erhalten werden, sind die Nachweisgrenzen sehr gering. Für Estron wird eine Nachweisgrenze von 0.1 µg/l, für Ethinylestradiol von 0.4 µg/l und für Bisphenol A 0.04 µg/l erhalten. Bei Bisphenol A sind die Standardabweichungen deutlich geringer als bei der letzten Kalibrierung, so dass auch die Nachweisgrenze herabgesetzt ist, vergleichbar mit der von Einzelanalyt-Messungen. Auch die Realprobenkonzentrationen können hervorragend wiedergefunden werden.

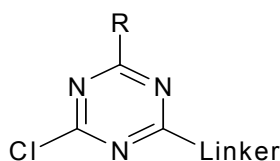
#### 4.4. Multi-Analyt-Kalibrierungen mit Triazinen

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, werden die Triazine Atrazin, Simazin und besonders Irgarol zu der Klasse der endokrinen Disruptoren gezählt. Ihre estrogene Wirkung ist jedoch vergleichsweise gering. Da diese Substanzen strukturell sehr ähnlich sind, zeigen auch die Antikörper eine hohe Kreuzreaktivität. Leider standen keine aufgereinigten Antikörper zur Verfügung, so dass auf die Irgarol-Messungen verzichtet werden musste.

Die Strategie, die für die Estrogene zur Kalibrierung von binären Analytmischungen angewendet worden ist, soll nun auf das System Atrazin/Simazin übertragen werden. Das Verhalten der beiden einzelnen Analyte ist bekannt und wird hier lediglich reproduziert (Barzen 2000, Birkert et al. 2002). Aus diesen Ergebnissen wird die Multi-Analyt-Kalibrierung mit neuronalen Netzen optimiert.

Zunächst wird eine Auswahl an Derivaten getroffen, die für die Beschichtung der TIRF-Transducer verwendet werden sollen. Dazu stehen 17 Derivate zur Verfügung, die sich in ihren Resten am Triazinring unterscheiden. Die Struktur der Linker unterliegt der Geheimhaltung. Die Derivate werden mit RfS charakterisiert, indem ein RfS-Transducer mit einem Derivat beschichtet und die Bindung von 25 µg/ml des entsprechenden Antikörpers beobachtet wird. Die Bindungskapazität der besten sechs Derivate ist in Tab. 18 aufgelistet. Interessanterweise findet sich bei allen ausgewählten Derivaten ein Chloratom als Rest.

Tab. 18 Charakterisierung verschiedener Triazinderivate hinsichtlich ihrer Bindungskapazität für Anti-Atrazin (Anti-Z) und Anti-Simazin (Anti-S). Die Derivate sind über verschiedene Linker an die Oberfläche gebunden.



Derivat	Struktur R	Bindungskapazität	
		für Anti-Z [nm]	für Anti-S [nm]
D1	NH-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	13.77	12.25
D2	NH-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	11.34	13.11
D3	NH-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	10.20	13.00
D4	NH-C <sub>5</sub> H <sub>9</sub>	9.85	9.16
D5	NH-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	8.28	8.29
D6	NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	6.22	6.26



Aus Tab. 18 ist zu erkennen, dass die Derivate jeweils eine ähnliche Bindungskapazität bezüglich beider Antikörper zeigen. Es ist daher zu befürchten, dass die Antikörper nur schlecht von einander zu unterscheiden sind.

Die Einzelanalyt-Kalibrierungen werden mit den beiden Antikörpern für Atrazin und Simazin aufgenommen. Die Kurven sind in Abb. 49 dargestellt.

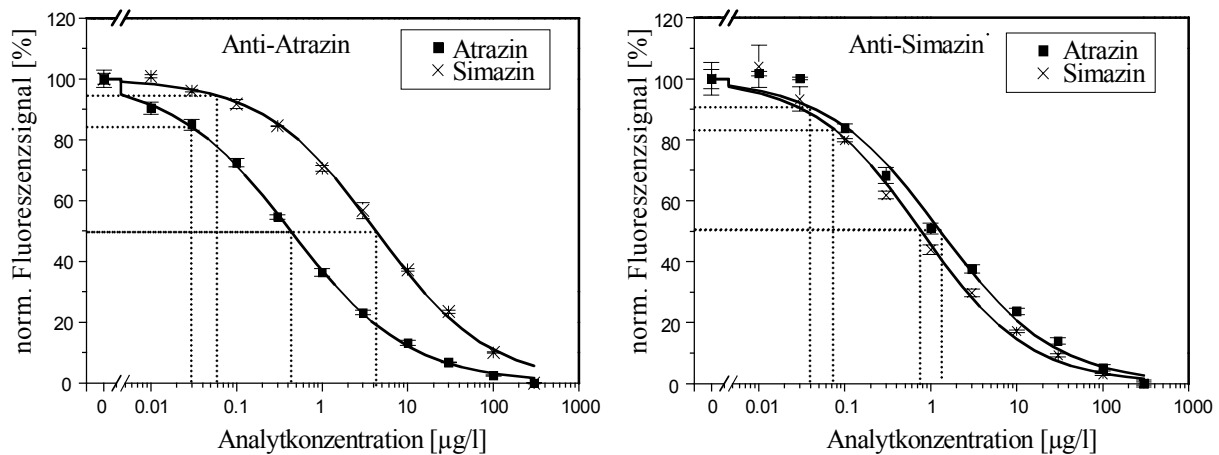


Abb. 49 Einzelanalyt-Kalibrierung von Anti-Atrazin (0.1 µg/ml) und Anti-Simazin (0.1 µg/ml) jeweils für Atrazin und Simazin mit dem immobilisierten Derivat D1.

Die erhaltenen Nachweisgrenzen (NWG), Bestimmungsgrenzen (BSG) Testmittelpunkte (TMP), Arbeitsbereiche und Präzisionen sind in Tab. 19 aufgeführt.

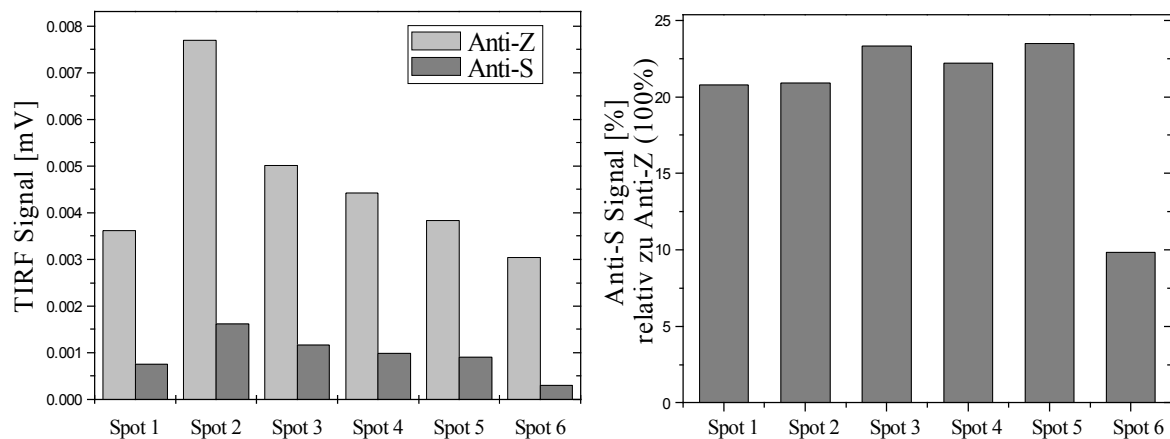
Tab. 19 Analytische Qualitätsmerkmale der Einzelanalyt-Kalibrierungen mit Anti-Atrazin und Anti-Simazin auf dem Derivat D1 mit 0.2 mg/ml Ovalbumin und der daraus berechneten Kreuzreaktivität KR und Affinitätskonstanten K. Der Arbeitsbereich und die Präzision gelten im Bereich 20 bis 80 %.

Analyt	AK	NWG [µg/l]	BSG [µg/l]	TMP [µg/l]	Arbeitsbereich [µg/l]	Präzision	KR [%]	K [l/mol]
Atrazin	Anti-Z	0.03	0.56	0.43	0.05 - 3.89	0.19	100.0	$2.31 \cdot 10^9$
Simazin	Anti-Z	0.06	0.45	4.24	0.53 - 34.21	0.20	10.1	$1.20 \cdot 10^8$
Atrazin	Anti-S	0.02	0.26	1.29	0.11 - 10.88	0.23	59.7	$5.83 \cdot 10^8$
Simazin	Anti-S	0.05	0.72	0.77	0.08 - 5.37	0.11	100.0	$1.08 \cdot 10^9$

Aus diesen Kalibrierkurven kann auch die Kreuzreaktivität und die Affinitätskonstante mit Hilfe des Testmittelpunktes abgeleitet werden. Bei der Kreuzreaktivität ist erkennbar, dass der Atrazin-Antikörper Simazin nur zu einem geringen Prozentteil erkennt, dass jedoch Anti-Simazin nicht so stark zwischen den beiden Analyten diskriminiert. Die Muster bei beiden

Antikörpern sind verschieden. Einmal wird Atrazin besser erkannt, im anderen Fall Simazin, so dass eine Separierung beider Analyte mit diesen Antikörpern möglich sein sollte.

Um möglichst viele Daten für die Multi-Analyt-Kalibrierung zu bekommen, werden alle sechs Derivate auf dem TIRF Transducer immobilisiert. Entscheidende Faktoren für die Festlegung der Reihenfolge der Derivate ist zum einen die anregende Lichtintensität an den jeweiligen Spots, die wie bereits erläutert von Spot 1 zu Spot 6 abnimmt, und zum anderen die Flussrichtung, da die Antikörperkonzentration jedes Mal leicht vermindert wird, wenn ein Teil der Antikörper an einem Spot bindet. Um keinen doppelten Abfall des Signals von Spot 1 zu Spot 6 zu erhalten, wird der Fluss umgedreht, so dass die Probe von Spot 6 zu Spot 1 fließt. Die Reihenfolge D1-D5-D6-D3-D4-D2 wird als erstes angewendet und die Signale für Anti-Atrazin (1  $\mu\text{g/ml}$ ) und für Anti-Simazin (1  $\mu\text{g/ml}$ ) beobachtet. Daraus wird das relative Anti-Simazin-Signal berechnet, das den Unterschied zwischen Anti-Atrazin und Anti-Simazin darstellt, s. Abb. 50.



*Abb. 50 Der TIRF-Transducer ist mit sechs verschiedenen Derivaten modifiziert (D1-D5-D6-D3-D4-D2). Jeweils die Bindung von Anti-Atrazin (1  $\mu\text{g/ml}$ ) und Anti-Simazin (1  $\mu\text{g/ml}$ ) wird verglichen. Rechts sind die relativen Unterschiede zwischen Anti-Atrazin und Anti-Simazin für jeden Spot aufgezeigt.*

Aus Abb. 50 geht hervor, dass an allen Spots Anti-Atrazin stärker bindet als Anti-Simazin. Die relativen Unterschiede sind außerdem bis auf Spot 6 sehr ähnlich. Trotzdem wird versucht, eine Multi-Analyt-Kalibrierung durchzuführen.

Die erste Kalibrierung wird mit einem vollfaktoriellen Versuchsplan mit Konzentrationsstufen zwischen 0 und 2 µg/l erstellt, wobei jede Mischung nur einmal vermessen wird. Das Raster dieser Konzentrationsstufen ist jedoch sehr klein. Die Auswertung mit neuronalen Netzen und das „bootstrapping“ wird wie bei den ternären Estrogengemischen Kapitel 4.3.2 durchgeführt.

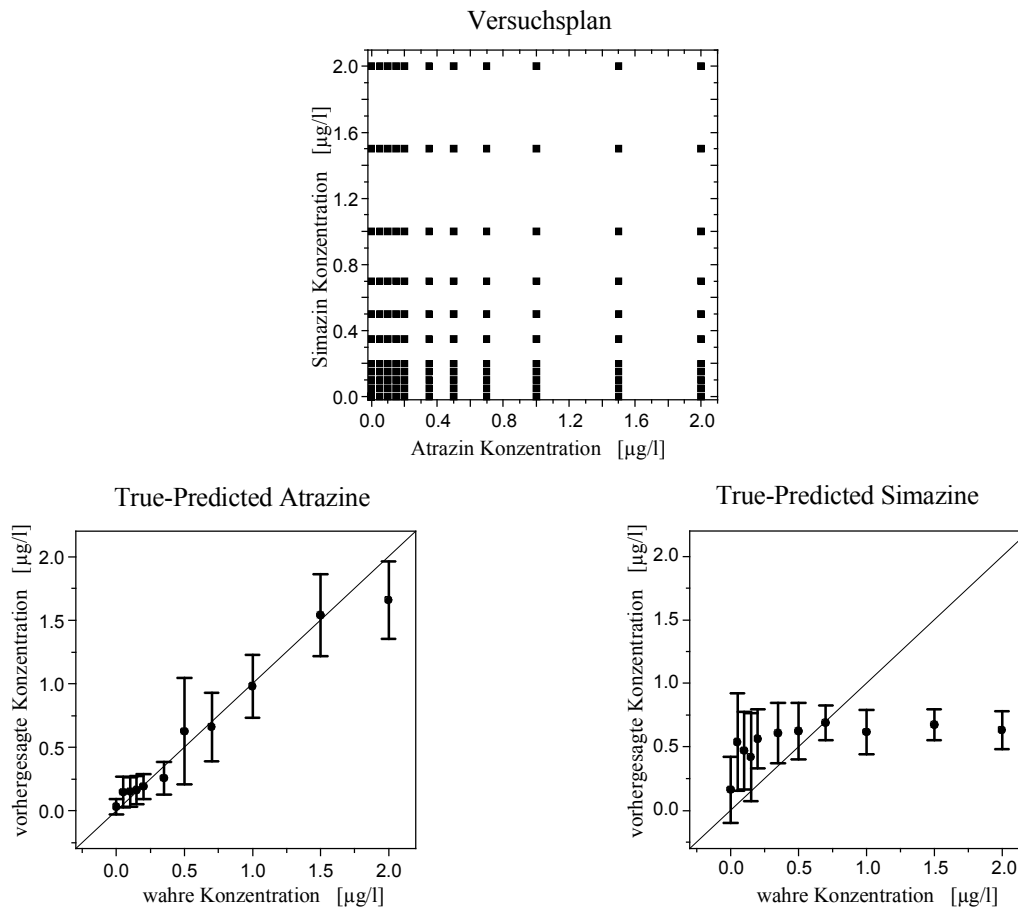


Abb. 51 Erste Atrazin/Simazin-Kalibrierung auf Transducer (D1-D5-D6-D3-D4-D2), Testdaten nach dem bootstrapping-Verfahren ausgewählt und mit den trainierten Netzen vorhergesagt.

In Abb. 51 ist deutlich zu erkennen, dass die Kalibrierung nicht erfolgreich war. Die Voraussage von Atrazin ist ungenügend und die Vorhersage der Simazin-Konzentrationen zeigt keine Korrelation zu den wahren Werten. Nachdem verschiedene Spots aus dem Training entfernt worden sind, und keine deutliche Verbesserung eingetreten ist, wird nun eine neue Kalibrierung versucht, bei der die Antikörper nicht über die immobilisierten Derivate getrennt werden, sondern die beiden Antikörper einzeln in den Analytmischungen gemessen werden. Denn wie bereits vermutet zeigen die Derivate ein zu ähnliches Muster für beide Antikörper, so dass auch neuronale Netze keine Unterscheidungen vornehmen können. Durch diese Maßnahme verdoppelt sich der Zeitaufwand für eine vollständige Bestimmung von Atrazin

und Simazin, jedoch ist der Zeitbedarf für eine Messung (12 bis 15 min in Abhängigkeit von der genutzten Fluidik) sehr gering. Außerdem wird der Versuchsplan weiter eingengt und reicht jetzt von 0  $\mu\text{g/l}$  bis 1  $\mu\text{g/l}$ , s. Abb. 52.

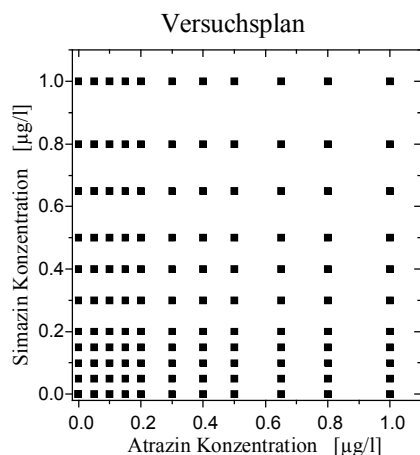


Abb. 52 *Eingengter Versuchsplan für die Atrazin/Simazin Kalibrierung.*

Da bei dieser Kalibrierung nur noch ein Spot benötigt, wird der Transducer nur mit dem Derivat D1 beschichtet.

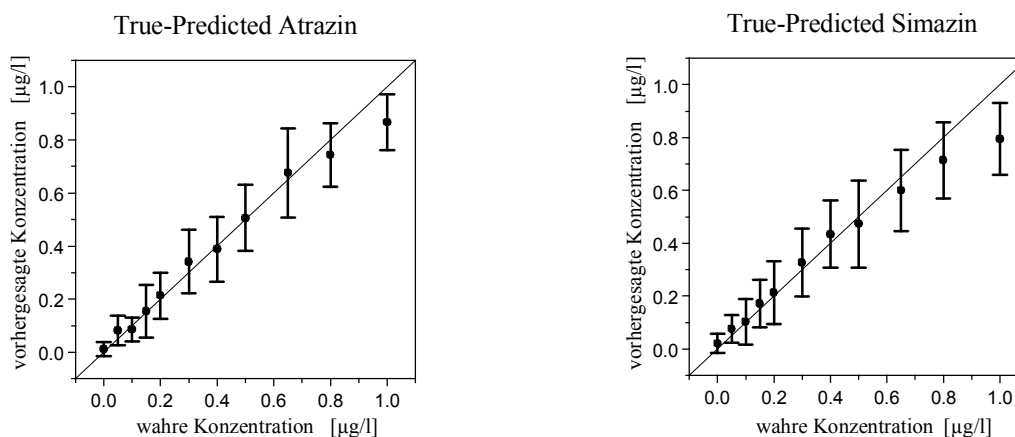


Abb. 53 *Multi-Analyt-Kalibrierung von Atrazin und Simazin mit Anti-Atrazin und Anti-Simazin, die separat gemessen werden.*

In Abb. 53 ist zu erkennen, dass diese Multi-Analyt-Kalibrierung von Atrazin und Simazin erfolgreich war. Die Nachweisgrenze von Atrazin liegt bei 0.2  $\mu\text{g/l}$  und von Simazin bei 0.3  $\mu\text{g/l}$ .

Die Strategie des separaten Messens von Anti-Atrazin und Anti-Simazin ist ausreichend, um die Analyte simultan zu bestimmen. Bei zwei Analyten ist dieses auch zeitlich gesehen akzeptabel. Bei einer Aufweitung der Kalibrierung auf drei oder mehr Analyte muss jedoch eine Auswahl von Antikörpern und Analyten getroffen werden, die die Zahl der Einzelmessungen für eine quantitative Bestimmung aller Analyte nicht weiter erhöht. Wenn nicht noch weitere Kreuzreaktivitäten zu erwarten sind, ist dieses Szenario durchaus realisierbar.

#### ***4.5. Exkurs: Microcystin***

Mit dem ELISA, der in Kapitel 2.3 vorgestellt wurde, lassen sich geringe Nachweisgrenzen erzielen, jedoch ist damit keine vollständige Automatisierung für den Feldeinsatz möglich. In der vorliegenden Arbeit sollte ein TIRF-Assay mit dem gleichen Antikörper (MC10E7) etabliert werden

Im Vordergrund steht die vollständige Automatisierung des RIANA Geräts, das sich für ein Frühwarnsystem vor Ort hervorragend eignet. Da es für eine Messung nur 15 min benötigt, können umgehend Ergebnisse über den Gehalt an Microcystin geliefert werden. Somit kann eine Warnmeldung erfolgen, ob z.B. für das Baden im See oder die Entnahme von Trinkwasser eine Gefahr besteht. Die kurze Zeitdauer ist Voraussetzung für ein Warnsystem, da während einer großen Algenblüte innerhalb kürzester Zeit hohe Konzentrationen erreicht werden, allerdings nur für einen begrenzten Zeitraum. Die Halbwertszeit von Microcystin beträgt im Wasser ca. 4 Tage, wobei die Algenblüte selbst länger andauern kann. Sie tritt meistens während der warmen Tage im Jahr auf. Durch eine vollständige Automatisierung kann eine Messstelle über lange Zeit ohne personellen Aufwand beobachtet und bei einem positiven Ergebnis eine Gefahrenmeldung via Internet oder Modem ausgegeben werden.

##### *Aufbau des Microcystin-Assays auf einem Biosensor*

Als erstes muss ein Derivat von Microcystin-LR hergestellt werden, das eine funktionelle Gruppe zur Anbindung an die Oberfläche besitzt. Über einen Thioether wird eine Aminofunktion in das Microcystin eingeführt. Danach wird ein RfS-Transducer mit dem Microcystin-NH<sub>2</sub> modifiziert. Zunächst wird Aminodextran zum Beschichten ausgewählt. Dieses muss erst umfunktionalisiert werden, damit es Carboxy-Gruppen zur Anbindung an die Aminogruppen des Derivats trägt (Stemmler 1999). Für die Charakterisierung dieser Oberfläche mit RfS wird unmarkierter MC10E7-Antikörper und fluoreszenzmarkierter Antikörper verwendet.

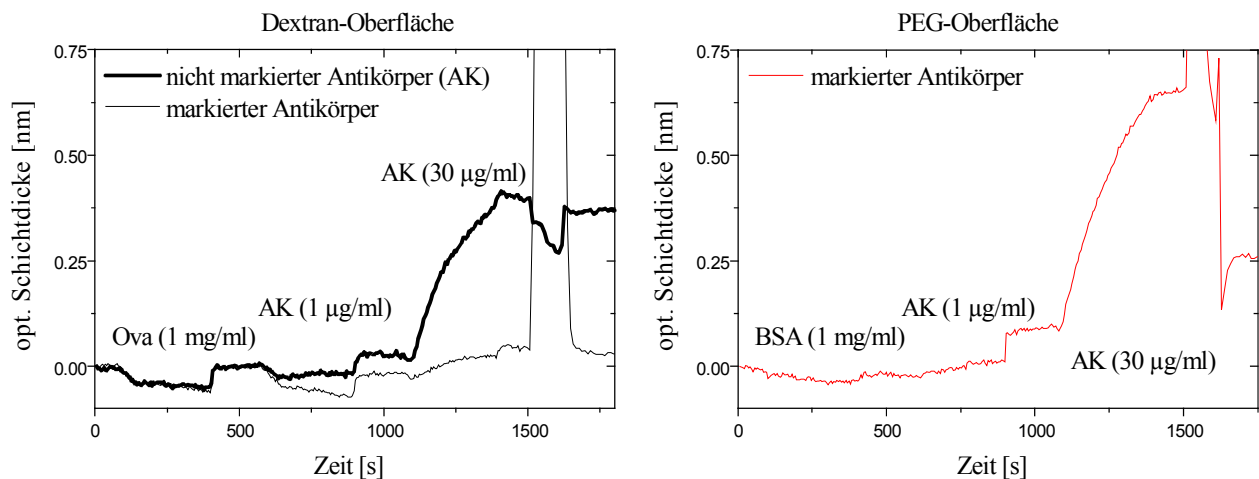


Abb. 54 Charakterisierung einer Dextranschicht und einer PEG-Schicht jeweils mit Microcystin-NH<sub>2</sub> modifiziert mit MC10E7 Antikörper, mit und ohne Fluoreszenzlabel.

Wie aus Abb. 54 ersichtlich, ist die Bindungskapazität der Dextran-Oberfläche sehr gering. Normalerweise würde man mehrere Nanometer an Schichtdickenzunahme bei 30 µg/ml Antikörper erwarten, statt der erreichten 0.5 nm. Außerdem sind starke Brechungsindexsprünge bei Injektion von Ovalbumin und kleiner Antikörperkonzentration zu erkennen. Der markierte Antikörper bindet noch weniger an die Oberfläche, allerdings nicht auf Grund des Labels, sondern wegen der negativen Auswirkungen während der Markierungsprozedur. Durch langwierige Zentrifugation ist ein großer Teil der Antikörper inaktiv. Das liegt bei diesem speziellen Antikörper an dem Stabilisierungszusatz Glycerin, der zunächst entfernt werden muss. Eine schonendere Alternative stellt die Dialyse dar.

Auf Grund dieser Schwierigkeiten wird auf eine Carboxy-PEG-Oberfläche verwendet, an die direkt das aminomodifizierte Microcystin gekoppelt werden kann. In Abb. 54 rechts ist die Charakterisierung mit dem markierten Antikörper dargestellt, die eine deutlich höhere Bindungskapazität als die Dextranoberfläche zeigt. Daraus ist zu schließen, dass die Oberflächenchemie auf Dicarboxy-PEG funktioniert und im weiteren verwendet wird. Mit PEG ist naturgemäß die maximale Bindungskapazität der Oberfläche geringer als bei Dextran, da die Oberfläche theoretisch weniger Bindungsstellen zur Verfügung stellt. Allerdings ist bei der Carboxy-PEG-Oberfläche zu erkennen, dass man mit 30 µg/ml Antikörper noch weit von der Sättigung der Oberfläche entfernt ist. Daraus ist zu schließen, dass die aktive Konzentration bei dem markierten Antikörper extrem gering ist, wie bereits angedeutet wurde. Um überhaupt Signale für eine Kalibrierung des Analyten Microcystin zu erhalten, muss die Antikörperkonzentration sehr viel höher gewählt werden, als bei den anderen, bisher eingesetzten Antikörpern wie z.B. für die Estrogene.

Ein TIRF-Assay wird aufgebaut, um den Analyten Microcystin zu kalibrieren. Dazu wird 5 µg/ml Antikörper eingesetzt, um eine hohe Dynamik zu erhalten.

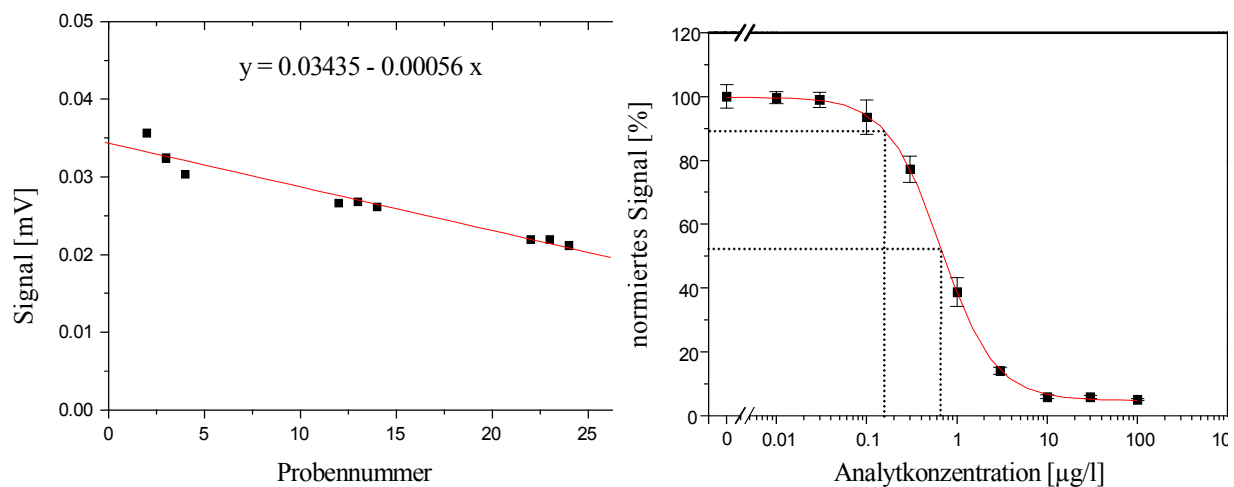


Abb. 55 *Stabilitätsmessung und Kalibrierung von Microcystin mit MC10E7 (5 µg/ml) und 0.2 mg/ml BSA auf einem TIRF Transducer, modifiziert mit Dicarboxy-PEG und gespottetem Microcystin-NH<sub>2</sub>.*

Da Microcystin eine relativ kurze Halbwertszeit von ca. 3-4 Tagen besitzt, ist zu erwarten, dass es sich bei dem verwendeten Microcystinderivat ähnlich verhält. In der linken Grafik von Abb. 55 ist der Signalabfall der Blindmessungen dargestellt. Erkennbar ist ein linearer Abfall, bei dem das Signal nach 6 Messungen um ca. 10 % abnimmt. Das zeigt deutlich, dass die Oberflächenkapazität schnell abnimmt, wahrscheinlich durch das starke Regenerationsmittel SDS 0.5 % mit pH 1.9. Dieses denaturiert nicht nur den Antikörper, sondern greift vermutlich auch das Heptapeptid an der Oberfläche an.

Nach Korrektur der Signale ist eine sehr gute Kalibrierung möglich. Der Testmittelpunkt liegt bei 0.67 µg/l und die Nachweisgrenze ist 0.16 µg/l. Damit kann der Grenzwert von 1 µg/l, den die WHO vorschlägt, deutlich unterschritten werden.

Durch die Probleme der mangelhaften Oberflächenstabilität ist ein unüberwachtes Warnsystem, das mehrere Wochen unbetreut an einer Messstelle steht, nicht zu realisieren. Die Lösung stellt eine andere Oberflächenchemie dar, bei der für jede Messung die Oberfläche erneuert wird. Dieses Prinzip der flexiblen Oberflächenchemie ist bei (Kröger et al. 2002) beschrieben und im Detail in (Kröger 2003) erklärt. Es soll nur kurz erwähnt werden, dass auf der Oberfläche eine spezielle Sequenz einer PNA immobilisiert ist. Vor jeder Messung wird eine komplementäre Sequenz einer DNA, gekoppelt mit dem Derivat, auf der Oberfläche hybridisiert. Die DNA bindet spezifisch und sehr schnell an der PNA, so dass die Ortsauflösung immer noch gegeben ist. Die PNA-Oberfläche ist über Monate haltbar und die

Derivat-DNA-Kopplungsprodukte können gekühlt im Autosampler gelagert werden. Das Besondere dieser Oberflächenchemie ist, dass bei verschiedenen Messungen unterschiedliche Derivate verwendet werden können. Die Derivate sind jeweils an die gleiche DNA-Sequenz gekoppelt und hybridisieren am gleichen Spot auf der Oberfläche. Zusätzlich können verschiedene PNA-Sequenzen auf verschiedenen Spots immobilisiert werden, so dass von einer Messung zur nächsten das gesamte Analytpanel ausgetauscht werden kann.



## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Assay entwickelt werden, der es ermöglicht, mehrere estrogenen Substanzen im Wasser simultan und in minimalen Konzentrationen mit einem Fluoreszenzbiosensor zu detektieren. Hierzu sollten kreuzreaktive Antikörper und neuronale Netze für die Auswertung der Daten verwendet werden. Die Automatisierung des Sensorsystems und die Feldtauglichkeit standen bei der Optimierung des Assays im Vordergrund.

Als erstes wurden die polyklonalen Antikörper für endokrine Substanzen charakterisiert. Dazu gehört die chemische Modifizierung der Transduceroberflächen mit den Estrogenderivaten sowie die Charakterisierung der Bindungskapazität der Oberflächen. Hierbei wurden unter anderem verschiedene Methoden zur Immobilisierung des Derivats auf der Oberfläche untersucht, da entscheidende Unterschiede zwischen der Vollmodifizierung des Transducers und der orts aufgelösten Oberflächenchemie auftreten. Als zweites wurde die kinetische Bindung der verschiedenen Antikörper an die modifizierte Oberfläche analysiert. Darauf folgend wurde die Bindung des Antikörpers und eines Analyten in Lösung beobachtet und daraus die Affinitätskonstante und die Kreuzreaktivität nach der allgemein anerkannten Abraham-Methode berechnet. Außerdem wurde an dieser Stelle der Logistik-Fit (Vier-Parameter-Log-Logistik-Fit) im Hinblick auf die Konstanz der Parameter für einen Fit untersucht. Als Beispiel dienten die Kalibrierkurven eines polyklonalen Antikörpers mit verschiedenen Analyten. Das Ergebnis hat gezeigt, dass eine Referenzierung auf 100 % keine Probleme bereitet, da für die Referenzierung der Blindwert herangezogen wird, der von der Art des Analyten unabhängig ist. Die Referenzierung auf 0 % ist nur dann sinnvoll, wenn der „richtige“ Analyt für die Referenzierung bekannt ist. Dies ist in vielen Fällen nicht der relevante Analyt, sondern das Hapten, mit dem der Antikörper hergestellt wurde. Die Konstanz des Steigungsparameters  $p$  ist nicht gegeben, was bisher nur für einen polyklonalen Antikörper belegt wurde. Der experimentelle Nachweis für monoklonale Antikörper steht noch aus.

Außerdem wurde ein Modell untersucht, das es ermöglicht, Mischungen aus zwei Analyten darzustellen, die mit einem Antikörper kalibriert wurden. Dieses mathematische Modell basiert auf der Logistik-Funktion für die reinen Analyte und einem elliptischen Zusammenhang der Mischungen. Die RMSE-Werte zeigen eine adäquate Übereinstimmung des Modells mit den experimentellen Daten für zwei polyklonale Antikörper. Mit diesem Modell lässt sich auch eine Aussage über den Einfluss, den ein Kreuzreagenz auf die Kalibrierung eines Analyten ausübt, und den daraus resultierenden Fehler treffen.

Um das optimale Regenerationsmittel für die TIRF-Messungen zu finden, wurde eine RfS-TIRF-Kopplung aufgebaut. Diese wurde notwendig, da die TIRF-Messungen gezeigt haben, dass die Regenerationslösungen, die mit RfS-Flusszellen erfolgreich waren, bei TIRF-Flusszellen versagen. Bei diesem TIRF-Aufbau war jedoch das Photobleaching der Farbstoffe so stark, dass eine zeitaufgelöste Messung zur Beobachtung der Regeneration nicht möglich war. Um trotzdem eine Regeneration in der TIRF-Zelle zu beobachten, wurde eine Faser für einen Spot durch den Lichtleiter des RfS-Geräts ausgetauscht. Mit dieser Methode wurde dann das optimale Regenerationsmittel, eine salzsaure 0.5 %-SDS-Lösung mit pH 1.9, ermittelt.

Nachdem die Bindungseigenschaften der Antikörper charakterisiert waren, wurde die Stabilität der Antikörper und der modifizierten Oberflächen für die Langzeitanwendung untersucht. Das Ergebnis hat gezeigt, dass Antikörper im lyophilisierten Zustand und bei 8°C gelagert selbst nach 6 Wochen noch keinen Signalabfall aufweisen. Selbst auf den Oberflächen, die durch aggressive Regenerationsmittel, wie z.B. saure Lösungen, angegriffen werden, sind mehr als 300 Messungen möglich.

Entsprechend der Ergebnisse, die während der Charakterisierung erzielt wurden, wurden die Einzelanalyt-Assays aufgebaut. Für jeden Analyten (Estron, Estradiol, Ethinylestradiol und Bisphenol A) konnte mit dem passenden Antikörper eine Nachweisgrenze von 0.07 µg/l und weniger erreicht werden. Es wurden verschiedene Realproben mit einzelnen Analyten versetzt oder direkt vermessen und mit Daten aus HPLC-Messungen verglichen. Dazu wurden die RIANA-Geräte unter anderem umfassend kalibriert nach Karlsruhe transportiert, und dort Messungen vor Ort durchgeführt. Außerdem wurden Proben mit synthetischem Abwasser als Matrix untersucht. Estrogene, die dieser Matrix zugesetzt wurden, erreichten Wiederfindungsraten von 70 – 112 %. Diese Werte bewegen sich in dem nach der AOAC erlaubten Bereich. Bei den Bisphenol A-Messungen entstanden durch höhere Standardabweichungen der Kalibrierproben und der Realproben geringfügig höhere Wiederfindungsraten.

Nach diesen Vorarbeiten und gesammelten Erfahrungen wurde ein Multi-Analyt-Assay aufgebaut. Zunächst wurden binäre Gemische von Estron/Estradiol, Estron/Ethinylestradiol und Estradiol/Ethinylestradiol untersucht. Für die Auswertung kamen neuronale Netze zum Einsatz. Nach Optimierung der Kalibrierungen im Hinblick auf Anzahl der Gesamtproben, Kalibrierplan, Netzdesign und Referenzierung konnten für das Paar  $E_1/E_2$  Nachweisgrenzen von 0.15 µg/l und 0.25 µg/l, für das Paar  $E_1/EE_2$  Nachweisgrenzen von 0.1 µg/l und 0.1 µg/l und für das Paar  $E_2/EE_2$  Nachweisgrenzen von 0.35 µg/l und 0.5 µg/l erreicht werden. Das letzte Paar war mit den vorhandenen Antikörpern nur sehr schlecht zu diskriminieren.

Für die ternären Mischungen wurde als dritter Antikörper Anti-Bisphenol A hinzugenommen und die Mischungen  $E_1/E_2/BPA$  und  $E_1/EE_2/BPA$  untersucht. Die Erfahrungen, die mit den binären Mischungen gesammelt wurden, konnten hier eingesetzt werden. Als Nachweisgrenzen wurden mit den optimierten Kalibrierungen für die erste Mischung  $0.1 \mu\text{g/l}$ ,  $0.2 \mu\text{g/l}$  und  $0.03 \mu\text{g/l}$  für die zweite Mischung  $0.1 \mu\text{g/l}$ ,  $0.4 \mu\text{g/l}$  und  $0.04 \mu\text{g/l}$  erhalten. Als Realmatrizes wurden Flusswasser, Grundwasser und Trinkwasser eingesetzt. Die ersten zwei waren bereits ein paar Wochen alt, so dass mit dem Flusswasser keine guten Ergebnisse erzielt wurden. Mit dem Grundwasser ließen sich hingegen deutlich bessere und mit dem Trinkwasser hervorragende Vorhersagen über die Konzentrationen mit den trainierten neuronalen Netzen treffen.

Nach dem erfolgreichen Aufbau des Multi-Analyt-Assays für Estrogene und Bisphenol A wurde das Assaysystem auf die Analyte Atrazin und Simazin mit zwei kreuzreaktiven Antikörpern angewendet. Hier zeigte sich, dass die Derivate die beiden Antikörper nicht genügend separieren konnten, so dass die Analyt-Mischungen mit jedem Antikörper getrennt gemessen werden mussten. Eine Messung dauert 15 Minuten, so dass durch die Doppelbestimmung, einmal mit Anti-Atrazin und einmal mit Anti-Simazin, eine Probe innerhalb von 30 Minuten gemessen werden konnte. Die Nachweisgrenzen lagen für Atrazin bei  $0.2 \mu\text{g/l}$  und für Simazin bei  $0.3 \mu\text{g/l}$ . Für diese Messungen wurde noch die alte Fluidik verwendet, mit der ein schlechteres Flussprofil und relativ hohe Standardabweichungen auftraten. Durch Verwendung eines neuen Autosamplers, der alle Mischschritte eigenständig durchführt und die Probe über eine eigene Probenschleife dem Sensor zuführt, werden deutlich bessere Flussprofile erzeugt. Die Standardabweichung von Replika-Messungen ist wesentlich geringer. Außerdem dauert eine Messung nur noch 12 Minuten, und es besteht die zusätzliche Möglichkeit, den Probenteller oder die Reagenzlösungen zu kühlen. Mit dieser Neuerung sollen sämtliche Nachweisgrenzen noch weiter verringert werden können.

Als letztes wurde noch ein anderes System mit der neuen Fluidik gemessen, das besonders interessant für die Online-Überwachung ist und als Frühwarnsystem eingesetzt werden kann. Mit einem monoklonalen Antikörper wurde das Blaualgentoxin Microcystin auf der TIRF-Plattform detektiert. Die Schwierigkeit bei diesem Assay bestand darin, dass das Microcystin-Derivat ein Peptid ist, welches leicht zerstört werden kann, insbesondere durch aggressive Medien, wie die verwendete Regenerationslösung. Um diesem Problem zu begegnen, soll zukünftig ein Assay aufgebaut werden, bei dem das Derivat bei jeder Messung ausgetauscht wird. Dazu wird die Oberfläche lediglich lokal mit PNA-Einzelsträngen modifiziert, an welche die mit der jeweils komplementären DNA-Sequenz konjugierten Derivate spezifisch hybridisieren können. Dieses Hilfssystem ist im Detail bei (Kröger, 2003) beschrieben.

Die Zukunft dieses RIANA-Sensors liegt in der Nutzung als Frühwarnsystem. In dem EU-Projekt AWACSS (Automated Water Analyser Computer Supported System, Fkz: EVK1-CT-2000-00045) wird das Gerät auf 32 Spots erweitert. Statt eines bulkoptischen Transducers wird ein integriert-optischer Wellenleiter verwendet. Der große Vorteil des neuen Geräts besteht darin, dass der Laser nicht mehr justiert werden muss. Der vollautomatische Autosampler entnimmt selbstständig die Proben, mischt den Antikörper hinzu und injiziert die Mischung in die Probenschleife des neuen AWACSS-Systems. Über eine telefonische Anbindung an einen zentralen Server sind mehrere Messstationen miteinander verbunden. Sie werden von dem Server überwacht bzw. liefern Messdaten an eine Datenbank auf dem Server. Mit diesem System kann ein intelligentes Frühwarnsystem aufgebaut werden, das bei Bedarf eine Warnung über etwaige Kontamination von Trink- oder Flusswasser ausgibt.

Die Multi-Analyt-Messung mit kreuzreaktiven Antikörpern kann dann mit Messungen mit nicht kreuzreaktiven Antikörpern verbunden werden. Für die Auswertung mit neuronalen Netzen wird eine eigene „Black-Box“ programmiert, die selbstständig die Auswertung der Kalibrierung übernimmt. Mit der Logistik-Funktion werden die restlichen Analyte ausgewertet.

Der Anwendungsbereich dieses Sensorsystems ist nicht nur auf die Umweltanalytik beschränkt, auch in der Lebensmittelchemie sind interessante Aufgabenstellungen zu finden, die über einen Immunoassay mit Hilfe des sehr kostengünstigen TIRF-Geräts in kürzester Zeit durchführbar sind.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abel AP, Weller MG, Duveneck GL, Ehrat M, Widmer HM, (1996) Fiber-optic evanescent wave biosensor for the detection of oligonucleotides. *Anal. Chem.* 68: 2905-2912.
- Abraham GE, (1969) Solid-Phase Radioimmunoassay of Estradiol-17 $\beta$ . *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 29: 866-870.
- Ahmad A, Ramakrishnan A, McLean MA, Li D, Rock MT, Karim A, Breau AP, (2002) Use of optical biosensor technology to study immunological cross-reactivity between different sulfonamid drugs. *Anal. Biochem.* 300: 177-184.
- Bachmann TT, Leca B, Vilatte F, Marty JL, Fournier D, Schmid RD, (2000) Improved multi-analyte detection of organophosphates and carbamates with disposable multielectrode biosensor using recombinant mutants of *Drosophila* acetylcholine esterase and artificial neural networks. *Biosens. Bioelectron.* 15: 193-201.
- Bachmann TT, Schmid RD, (1999) A disposable multielectrode biosensor for rapid simultaneous detection of the insecticides paraoxon and carbofuran at high resolution. *Anal. Chim. Acta.* 401: 95-103.
- Barceló D, Hennion MC, (1997) Trace determination of pesticides and their degradation products in water. Elsevier, Amsterdam.
- Barzen C, (2000) Optimierung eines Fluoreszenz-Immunosensors für den flexiblen Multi-analyt-Nachweis. *Dissertation.* Universität Tübingen.
- Barzen C, Brecht A, Gauglitz G, (2002) Optical multiple-analyte immunosensor for water pollution control. *Biosens. Bioelectron.* 17: 289-295.
- Bier FF, Stöcklein W, Böcher M, Bilitewski U, Schmid RD, (1992) Use of a fibre optic immunosensor for the detection of pesticides. *Sens. Act. B 7* : 509-512.
- Biles JE, McNeal TP, Begley TH, Hollifield HC, (1997) Determination of Bisphenol-A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food-simulating liquids. *J. Agr. Food Chem.* 45: 3541-3544.
- Birkert O, Tünnemann R, Jung G, Gauglitz G, (2002) Label-free parallel screening of combinatorial triazine libraries using reflectometric interference spectroscopy. *Anal. Chem.* 74(4): 834-840.
- Bitman J, Cecil HC, (1970) Estrogenic activity of DDT analogs and polychlorinated biphenyls. *J. Agr. Food Chem.* 18 (6): 1108-1112.
- Bjarnason B, Bousios N, Eremin S, Johansson G, (1997) Flow injection enzyme immunoassay of atrazine herbicides in water. *Anal. Chim. Acta.* 347: 111-120.

- Brecht A, Klotz A, Barzen C, Gauglitz G, Harris RD, Quigley GR, Wilkenson JS, Sztajn bok P, Abuknesha R, Gascón J, Oubina A, Barceló D, (1998) Optical immunoprobe development for multiresidue monitoring in water. *Anal. Chim. Acta.* 362: 69-79.
- Brolley C, (1952) The plight of American bald eagle. *Audubon Magazine* 60: 162-163.
- Bucher S, (1999) Spectroscopie d'interférence réflectométrique, Sokrates Austausch. Universität Tübingen.
- Carlsen E, Giwerzman A, Keiding N, Skakkebaek (1992) Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br. Med. J.* 305: 609-613.
- Cheung PYK, Kauvar M, Engqvist-Goldstein AW, Ambler SM, Karu AE, Ramos LS, (1993) Harnessing immunochemical cross-reactivity: Use of pattern recognition to classify molecular analogs. *Anal. Chim. Acta.* 282: 181-192.
- Currie LA, (1997) Detection: International update, and some emerging di-lemmas involving calibration, the blank, and multiple detection decisions. *Chemometr. Intell. Lab.* 37: 151-181.
- Despaigne F, Massart DL, (1998) Neural networks in multivariate calibration. *Analyst.* 123: 157R-178R.
- Dieterle F, (2003) Integration of Artificial Neural Networks, Genetic Algorithms and Chemometrics for the Data Analysis of Sensors. Dissertation, Universität Tübingen.
- Dudley RA, Edwards P, Ekins RP, Finney DJ, McKenzie IGM, Raab GM, Rodbard D, Rodgers RPC, (1985) Guidelines for Immunassay Data Processing. *Clin. Chem.* 31/8: 1264-1271.
- European Community Council Directive 80/778/EEC, (1980).
- European Community Council Directive 98/83/EEC, (1998).
- Faber K, Kowalski BR, (1997) Improved estimation of the limit of detection in multivariate calibration. *Fresen. J. Anal. Chem.* 357: 789-795.
- Falconer I, Buckley TH, (1989) Tumor promotion by *Microcystis* sp., a blue-green algae occurring in water supplies. *Med. J. Aus.* 150: 351-352.
- Fare TL, Itak JA, Lawruk TS, Rubio FM, Herzog DP, (1996) Cross-reactivity analysis using a four-parameter model applied to environmental immunoassays. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57: 367-374.
- Fry D, Toone C, Speich S, Peard R, (1987): Sex ration skew and breeding patterns of gulls: Demographic and toxicological considerations. *Studies in Advanced Biology* 10: 26-43.

- Fukazawa H, Watanabe M, Shiraishi F, Shiraishi H, Shiozawa T, Matsushita H, Terao Y, (2002) Formation of chlorinated derivatives of Bisphenol A in waste paper recycling plants and their estrogenic activities. *J. Health Sci.* 48 (3): 242-249.
- Gauglitz G, Brecht A, Kraus G, Nahm W, (1993) Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-) layers. *Sens. Act. B* 11: 21-27.
- Gavaler JS, (1998) Alcoholic beverages as source of estrogens. *Alcohol Health Res. World.* 22 (3): 220-227.
- Geiß S, Einax JW, (2001) Comparison of detection limits in environmental analysis - is it possible? An approach on quality assurance in the lower working range by verification. *Fresen. J. Anal. Chem.* 370: 673-678.
- Gilbertson M, Kubiak T, Ludwig J, Fox G, (1991) Great Lakes embryo mortality, edema, and deformities syndrome (GLEMEDS) in colonial fish-eating birds: similarity to chick-edema disease. *J. Toxicol. Environ. Health.* 33: 455-520.
- Gimeno S, Gerritsen A, Bowmer T, Komen H, (1996) Feminization of male carp. *Nature* 384: 221-222.
- Göpel W, Ziegler C, (1994) Struktur der Materie: Grundlagen, Mikroskopie und Spektroskopie. Teubner, Stuttgart, Leipzig.
- Guillette LJ, (1994) Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentration in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ. Health Perspect.* 102: 680-688.
- Hayes TB, Collins A, Lee M, Mendoza M, Noriega N, Stuart AA, Vonk A, (2002) Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *PNAS* 99 (8): 5476-5480.
- Hock B, Niessner R, Eds (1995) Immunochemical Assay of Environmental Pollutants Using Pesticides as an Example. Immunochemical Detection of Pesticides and their Metabolites in the Water Cycle. VCH, Heidelberg, pp 3-24.
- Hunt G, Hunt M, (1977) Female-female pairing in western gulls (*Larus occidentalis*) in southern California. *Science* 196: 1466-1467.
- Jones G, Wortberg M, Kreissig SB, Bunch DS, Gee SJ, Hammock BD, Rocke DM, (1994) Extension of the four-parameter logistic model for ELISA to multianalyte analysis. *J. Immunol. Methods* 177: 1-7.
- Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T, Tilson HA, (1996) Research needs for the risk assessment of health and environmental

- effects of endocrine disruptors: A report of the U.S. EPA Workshop. *Environ. Health Persp.* 104: 715-740.
- Kaykin S, (1999) Neural networks a comprehensive foundation. Prentice Hall Inc. Upper Saddle River.
- Klotz A, Brecht A, Barzen C, Gauglitz G, Harris RD, Quigley GR, Wilkenson JS, Abuknesha RA, (1998) Immunofluorescence sensor for water analysis. *Sens. Act. B* 51: 181-187.
- Korach KS, MacLachan JA, (1995) Techniques for detection of estrogenicity. *Environ. Health Persp.* 103 (7): 5-8.
- Körner W, Hanf V, Schuller W, Bartsch H, Zwirner M, Hagenmaier H, (1998) Validation and application of a rapid in vitro assay for assessing the estrogenic potency of halogenated phenolic chemicals. *Chemosphere* 37: 2395-2407.
- Kröger K, Jung A, Reder S, Gauglitz G, (2002) Versatile biosensor surface based on peptide nucleic acid with label free and total internal reflection fluorescence detection for quantification of endocrine disruptors. *Anal. Chim. Acta.* 469: 37-48.
- Kröger K, (2003) Entwicklung von Assaysystemen für die parallele Detektion biomolekularer Interaktionen an peptidfunktionalisierten Sensoroberflächen. *Dissertation*, Universität Tübingen.
- Larsson DGJ, Adolfsson-Erici M, Parkkonen J, Pettersson M, Berg AH, Olsson P-E, Förlin L, (1999) Ethinylestradiol – an undesired fish contraceptive? *Aqua. Toxicol.* 45: 91-97.
- Lauzon S, de Cittanova N, Desfosses B, Jayle MF, (1967) A new approach for quantitative evaluation of cross-reactivity of steroids with an antiserum by radioimmunoassay: Application to a highly specific antiestriol. *Steroids* 22 : 747-761.
- MacKintosh C, Beattie KA, Klumpp S, Cohen P, Codd GA, (1990) Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2a from both mammals and higher plants. *FEBS Letters* 264: 187-192.
- Mason C, Frod T, Last N, (1986) Organochlorine residues in British otters. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 36: 651-656.
- Meulenbergh EP, de Vree LG, Dogterom J, (1999) Investigation of indicative methods in the Netherlands: validation of several commercial ELISAs for pesticides. *Anal. Chim. Acta.* 399: 143-149.
- Miller JC, Miller JN, (1988) Basic statistical methods for analytical chemistry. Part1. Statistics of repeated measurements – A review. *Analyst.* 113: 1351-1356.
- Moller MF, (1993) A scaled conjugate gradient algorithm for fast supervised learning. *Neural Networks* 6: 525-533.



- O'Shannessy DJ, Winzor DJ, (1996) Interpretation of deviations from pseudo-first-order kinetic behavior in the characterization of ligand binding by biosensor technology. *Anal. Biochem.* 236: 275-283.
- Otto M, (1997) Chemometrie: Statistik und Computereinsatz in der Analytik, VCH, Weinheim.
- Oubina A, Gascón J, Barceló D, (1996) Determination of the cross-reactivities of immunoassays: Effect of common cross-reactants for chlorpyrifos-ethyl in water matrices using magnetic particle-based ELISA. *Environ. Sci. Technol.* 30 (2): 513-516.
- Oubina A, Gascón J, Barceló D, (1997) Multianalyte effect in the determination of cross-reactivities of pesticide immunoassays in water matrices. *Anal. Chim. Acta.* 347: 121-130.
- Parker GA, (1991) Validation of methods used in the Florida Department of Agriculture and Consumer Services Chemical Residue Laboratory. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74 (5): 868-871.
- Patterson D, (1996) Artificial neural networks, theory and applications. Prentice Hall Inc. Upper Saddle River.
- Peter C, Meusel M, Grawe F, Katerkamp A, Cammann K, Borchers T, (2001) Optical DNA-sensor chip for real-time detection of hybridization events. *Fres. Jour. Anal. Chem.* 371: 120-127.
- Petrovic M, Eljarrat E, Lopez de Alda MJ, Barcelo D, (2002) Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples. *J. Chromatogr. A* 974: 23-51.
- Piehler J, (1997) Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern. *Dissertation*, Universität Tübingen.
- Piehler J, Brecht A, Geckeler KE, Gauglitz G, (1996) Surface modification for direct immunoprobes. *Biosens. Bioelectron.* 11 (6/7): 579-590.
- Piehler J, Brecht A, Giersch T, Hock B, Gauglitz G, (1997) Assessment of affinity constants by rapid solid phase detection of equilibrium binding in a flow system. *J. Immunol. Methods* 201: 189-206.
- Plowman TE, Durstchi JD, Wang HK, Christensen DA, Herron JN, Reichert WM, (1999) Multiple-analyte fluoroimmunoassay using an integrated optical waveguide sensor. *Anal. Chem.* 71: 4344-4352.

- Pochi Y, (1988) *Optical Waves in Layered Media*, John Wiley & Sons New York.
- Pouria S, se Andrade A, Barbosa J, Cavalcanti RL, Barreto VTS, Ward CJ, Preiser W, Poon GK, Neild GH, Codd GA, (1998) Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru. *Brazil. Lancet* 352: 21-26.
- Pratt JJ, Woldring MG, Boonman R, Kittikool J, (1979) Specificity of Immunoassays. *Eur. J. Nucl. Med.* 4: 159-170.
- Price CP, Newman DJ, Eds (1997) *Principles and Practice of Immunoassay*. Second Edition, Stockton Press, New York.
- Principe J, Euliano N, Lefebvre W, (2000) *Neural and adaptive systems: Fundamentals through simulations*. John Wiley & Sons Inc. New York.
- Rapala J, Erkoma K, Kukkonen, Sivonen K, Lahti K, (2002) Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay – Comparison of methods. *Anal. Chim. Acta.* 466: 213-231.
- Rapp FR, (1996) Kalibrierung und Validierung von Sensorarrays unter Einsatz Neuronaler Netze und genetischer Algorithmen. *Diplomarbeit*. Universität Tübingen.
- Rinehart KL, Namikoshi M, Choi BW, (1994) Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *J. Appl. Phycol.* 6: 159-176.
- Rivasseau C, Racaud P, Deguin A, Hennion M-C, (1999) Development of a bioanalytical phosphatase inhibition test for the monitoring of microcystins in environmental water samples. *Anal. Chim. Acta* 394: 243-257.
- Rowe CA, Tender LM, Felstein MJ, Golden JP, Scruggs SB, MacCraith BD, Cras JJ, Ligler FS, (1999) Array biosensor for simultaneous identification of bacterial, viral, and protein analytes. *Anal. Chem.* 71: 3846-3852.
- Rowe-Taitt CA, Golden JP, Feldstein MJ, Cras JJ, Hoffman KE, Ligler FS, (2000) Array biosensor for detection of biohazards. *Biosens. Bioelectron.* 14: 785-794.
- Sachs L, (1969) *Statistische Auswertemethoden*. Zweite Auflage. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York. pp 312-314.
- Samsonova JV, Rubtsova MY, Kiseleva AV, Ezhov AA, Egorov AM, (1999) Chemiluminescent multiassay of pesticides with horseradish peroxidase as a label. *Biosens. Bioelectron.* 14: 273-281.
- Sarle WS, (1995) Stopped Training and Other Remedies for Overfitting. In: Sarle W.S. (Ed.), *Proceedings of the 27th symposium on the Interface of Computing Science and Statistics*. SAS Institute Inc. Cary. pp. 352-360.

- Schmitt H-M, Brecht A, Piehler J, Gauglitz G, (1997) An integrated system for optical biomolecular interaction analysis. *Biosens. Bioelectron.* 12 (8): 809-816.
- Schobel U, Barzen C, Gauglitz G, (2000) Immunoanalytical techniques for pesticide monitoring based on fluorescence detection. *Fresen. J. Anal. Chem.* 366: 646-658.
- Schuderer J, Akkoyun A, Brandenburg A, Bilitewski U, Wagner E, (2000) Development of a multichannel fluorescence affinity sensor system. *Anal. Chem.* 72: 3942-3948.
- Schult K, Katerkamp A, Trau D, Grawe F, Cammann K, Meusel M, (1999) Disposable optical sensor chip for medical diagnostics: new ways in bioanalysis. *Anal. Chem.* 71: 5430-5435.
- Seifert M, Haindl S, Hock B, (1999) Development of an enzyme linked receptor assay (ELRA) for estrogens and xenoestrogens. *Anal. Chim. Acta.* 386: 191-199.
- Shore LS, Gurevitz M, Shemesh M, (1993) Estrogen as an environmental pollutant. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 51: 361-366.
- Sonnenschein C, Soto AM, (1998) An updated review of environmental estrogens and androgen mimics and antagonists. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 65(1-6): 143-150.
- Stemmler I, (1999) Miniaturisierte Affinitätsanalytik – Ortsaufgelöste Oberflächenmodifikation, Assays und Detektion. *Dissertation*, Universität Tübingen.
- Toppari N, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette JrL, Jégou B, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Leffers H, McLachan JA, Meyer O, Müller J, Rajpert-De Meyts E, Scheike T, Sharpe R, Sumpter J, Skakkebaek NE, (1996) Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ. Health Perspect.* 104 (4): 741-803.
- Van Emon JM, Lopez-Avila V, (1992) Immunochemical methods for environmental analysis. *Anal. Chem.* 64: 285-292.
- Wedler G, (1982) Lehrbuch der Physikalischen Chemie. Verlag Chemie, Weinheim.
- Weetall HH, (1999) Chemical sensors and biosensors, update, what, where when and how. *Biosens. Bioelectron.* 14: 273-242.
- Weigend A, (1994) On overfitting and the effective number of hidden units. In: Mozer, M., Somlensky, P., Touretzky, D., Elman, J., Weigend, A. (Eds.), Proceedings of the 1993 Connectionist Models Summer School. Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale, pp. 335-342.
- WHO, Genf (1998) Guidelines for drinking Water Quality: Recommendations, 2<sup>nd</sup> Edition, Addendum to Vol.1, 36 pp.

- WHO, Genf (1998), Guidelines for Safe Recreational-water environments Vol. 1: Coastal and Fresh-waters, EOS/Draft/ 98.14.
- Winklmaier M, Weller MG, Mangler J, Schlosshauer B, Niessner R, (1997) Development of a high sensitive enzyme-immunoassay for the determination of triazine herbicides. *Fresen. J. Anal. Chem.* 358: 614-622.
- Woodward A, Percival H, Jennings M, Moore C, (1993) Low clutch viability of American alligators on Lake Apopka. *Florida Science* 56: 52-63.
- Wortberg M, Jones G, Kreissig SB, Rocke DM, Gee SJ, Hammock BD, (1996) An approach to the construction of an immunoarray for differentiating and quantitating cross reacting analytes. *Anal. Chim. Acta.* 319: 291-303.
- Wortberg M, Kreissig SB, Jones G, Rocke DM, Hammock BD, (1995) An immunoarray for the simultaneous determination of multiple triazine herbicides. *Anal. Chim Acta.* 304: 339-352.
- Zeck A, Eikenberg A, Weller MG, Niessner R, (2001) Highly sensitive immunoassay based on a monoclonal antibody specific for [4-arginine]microcystins. *Anal. Chim. Acta.* 441: 1-13.
- Zell A, (2002) SNNS Stuttgart Neural Network Simulator. <http://www-ra.informatik.uni-tuebingen.de/SNNS/>.
- Zupan J, Gasteiger J, (1999) Neural networks in chemistry and drug design. 2nd ed. Wiley-VCH, Weinheim.

## 7. Anhang

### 7.1. Publikationen

- Coille I, Reder S, Bucher S, Gauglitz G, (2002) Comparison of two fluorescence immunoassay methods for the detection of endocrine disrupting chemicals in water *Biomolecular Engineering* 18(6): 273-280.
- Kröger K, Jung A, Reder S, Gauglitz G, (2002) Versatile biosensor surface based on peptide nucleic acid with label free and total internal reflection fluorescence detection for quantification of endocrine disruptors. *Anal. Chim. Acta.* 469: 37-48.
- Reder S, Dieterle F, Jansen H, Alcock S, Gauglitz G, Multi-analyte assay for triazines using cross-reactive antibodies and neural networks, *Biosens. Bioelectron.* (eingereicht)
- Willard D, Proll G, Reder S, Gauglitz G, New and versatile optical-immunoassay instrumentation for water monitoring. *Environ. Sci. Poll. Res.* (eingereicht)
- Reder S, Dieterle F, Gauglitz G, Multivariate data analysis performed by neural networks in the field of immunoassays. (in Vorbereitung)
- Buch zum Sandrine-Projekt: EDCs in waste water, surface water, and sludge. Springer Verlag (in Vorbereitung)

## ***7.2. Akademische Lehrer***

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Albert, E. Bayer<sup>†</sup>, D. Christen, H. Eckstein, G. Gauglitz, W. Göpel<sup>†</sup>, P. Grathwohl, G. Häfelinger, H. P. Hagenmaier, M. Hanak, V. Hoffmann, G. Jung, S. Kemmler-Sack<sup>†</sup>, B. Koppenhöfer, K.-A. Kovar, D. Krug, N. Kuhn, E. Lindner, M. E. Maier, H. A. Mayer, H.-J. Meyer, U. Nagel, W. Nakel, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, H. Pommer, V. Schurig, E. Schweda, F. F. Seelig, B. Speiser, H. Stegmann, J. Strähle, W. Voelter, K.-P. Zeller, C. Ziegler

### **7.3. Lebenslauf**

Name: Sabine Hannah Reder

Geburtsdatum: 03. Oktober 1974

Geburtsort: Wolfenbüttel

Familienstand: verheiratet

Schulbildung: 1981 – 1985 Grund- und Hauptschule Cranachstraße, Wolfenbüttel  
1985 – 1987 Orientierungsstufe Cranachstrasse, Wolfenbüttel  
1987 – 1994 Gymnasium im Schloss, Wolfenbüttel  
1994 Abitur

Studium: WS 1994 – Januar 2000 Studium der Chemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Diplomprüfung: Mai 1999

Diplomarbeit: Juli 1999 – Januar 2000 bei Prof. Dr. Günter Gauglitz, Institut für Physikalische Chemie, Universität Tübingen  
Titel: „Etablierung eines Immunoassays mit TIRF zur simultanen Bestimmung des Gehalts mehrerer endokriner Disruptoren im Abwasser“

Promotion: Februar 2000 – Januar 2003 unter Anleitung von Prof. Dr. Günter Gauglitz, Institut für Physikalische Chemie, Universität Tübingen  
Titel: „Multi-Analyt-Bestimmung von endokrinen Disruptoren im Wasser mit Hilfe eines Fluoreszenz-Immunoassays unter Verwendung von neuronalen Netzen“