



Technische Universität München

Fakultät für Chemie

Lehrstuhl für Analytische Chemie und Wasserchemie

Generierung und Charakterisierung eines monoklonalen Antikörpers für die Detektion von Retronecin-basierten Pyrrolizidinalkaloiden und seine Verwendung für die Entwicklung eines Immunoassays

Katharina Zirngibl

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Michael Groll

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

2. apl. Prof. Dr. Dietmar Knopp

Die Dissertation wurde am 13.02.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 30.03.2020 angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2016 bis Mai 2019 am Lehrstuhl für Analytische Chemie und Wasserchemie der Fakultät Chemie an der Technischen Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Reinhard Nießner erstellt. Die Arbeit wurde durch den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. - FEI (AiF Forschungsvorhaben 19010N) gefördert.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Nießner danke ich für die Überlassung des interessanten und anspruchsvollen Themas sowie die Bereitstellung seiner Laborinfrastruktur und das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Ein spezieller Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Martin Elsner für die Bereitstellung seiner Laborinfrastruktur nach Pensionierung von Herrn Prof. Dr. Reinhard Nießner.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dietmar Knopp für seine engagierte, wertvolle und intensive Betreuung sowie die Zusammenarbeit bei der Erstellung und Gestaltung dieser Arbeit. Die zahlreichen Gedanken, fachkundigen Anregungen, konstruktiven Diskussionen und das stete Vertrauen haben dazu geführt, dass die Arbeit fertiggestellt werden konnte und auch dafür bedanke ich mich ganz herzlich.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Projektpartnern Florian Kaltner, Herrn PD Dr. Christoph Gottschalk und Herrn Prof. Dr. Manfred Gareis vom Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit der Ludwig-Maximilians-Universität München bedanken. Die zahlreichen konstruktiven Gespräche und Projekttreffen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Besonderer Dank gilt dabei Florian Kaltner für seine Unterstützung bei der Erstellung und Aufarbeitung pflanzlicher Rohextrakte und der Bereitstellung von Pyrrolizidinalkaloid-Standards.

Den Mitgliedern des projektbegleitenden Ausschusses „Entwicklung und Validierung einer immunologischen Screeningmethode für die Detektion toxikologisch relevanter Pyrrolizidinalkaloide in Kräutertees und verwandten Matrices“ (AiF Forschungsvorhaben 19010N) danke ich besonders für die konstruktiven Diskussionen und das Interesse am genannten Forschungsprojekt. Die vorliegende Arbeit basiert zu einem großen Teil auf den im Projekt erzielten Ergebnissen.

Bei Frau Dr. Regina Feederle, Herrn PD Dr. Aloys Schepers sowie Herrn Andrew Flatley und Frau Claudia Brucker von der MAB *Monoclonal Antibody Core Facility* des Helmholtz Zentrums München bedanke ich mich für die Immunisierung von Versuchstieren, die Durch-

führung der Hybridomzellkultur, Produktion und Aufreinigung monoklonaler Antikörper sowie ihre jederzeit freundlichen Unterstützung, ohne die die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Dr. Glüsenkamp von der Squarix GmbH Marl danke ich für die Zusammenarbeit bei der Herstellung der Immunogene.

Weiterhin danke ich besonders Dr. Anna-Cathrine Neumann-Cip vom Max von Pettenkofer-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität München, Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, für ihre wertvolle moralische Unterstützung sowie ihre Hilfe bei der Aufnahme von MALDI-TOF-MS-Spektren.

Dr. Hyun-Seo Kang vom Lehrstuhl für Biomolekulare NMR-Spektroskopie, Technische Universität München, danke ich für seine Unterstützung bei der Durchführung von ITC-Messungen.

Ein spezieller Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Karsten Haupt sowie allen Kollegen der Arbeitsgruppe „*Biomimicry and functional materials*“ der Université de Technologie de Compiègne (UTC). Für die herzliche Aufnahme und die wertvolle wissenschaftliche Unterstützung danke ich Dr. Nadja Leibl, Dr. Valentina Montagna, Dr. Bilal Demir sowie ganz besonders Frau Dr. Luminita Duma, Herrn Dr. Carlo Gonzato und Herrn Franck Melier.

Meinen Kolleginnen und Kollegen des Lehrstuhls für Analytische Chemie und Wasserchemie danke ich an dieser Stelle ausdrücklich für die freundliche und produktive Arbeitsatmosphäre. Besonderer Dank gilt dabei Dr. Carolin Hartmann, Sandra Hess, Dr. Angelika Nistler sowie Philipp Anger und Dr. Anna-Cathrine Neumann-Cip. Des Weiteren bedanke ich mich bei Dr. Carina Wismeth, David Bauer, David Glöckler, Lisa Göpfert, Catharina Kober, Katharina Sollweck, Dr. Jonas Bemetz, Elisabeth von der Esch, Ruben Weiß, Christian Schwaferts, Dr. Alexander Rinkenburger, Jessica Beyerle und bei Dr. Rani Bakkour.

Frau Cornelia Popp und Frau Christine Beese möchte ich für die organisatorische Unterstützung danken. Auch Frau Susanne Mahler, Frau Christine Benning, Herrn Joachim Langer, Frau Birgit Apel sowie Herrn Roland Hoppe, Herrn Sebastian Wiesemann und Frau Hatice Poyraz möchte ich an dieser Stelle danken.

Meinen Studenten danke ich für ihren Beitrag zum Forschungsprojekt.

Zuletzt und von ganzem Herzen bedanke ich mich bei Mama, Papa, Jani und meinem Ehemann Sebastian, die mich in jeder Situation während zahlreichen Gesprächen geduldig unterstützen und aufgebaut haben.

„Erfahrung ist fast immer eine Parodie auf die Idee.“

Johann Wolfgang von Goethe

Abstract

Structurally diverse and ubiquitous toxicologically relevant pyrrolizidine alkaloids (PAs) have gained increasing interest due to their occurrence in several plant species contaminating food and feed. After intestinal absorption, their hepatic activation can lead to the formation of pyrrole esters which are able to form DNA and protein adducts and therefore damage liver and other organs. Although acute intoxications leading to severe hepatic veno-occlusive disease (VOD) have been reported in the past, long-term consumption of low PA amounts (subchronic and chronic exposure) is mostly relevant to European consumers owing to a possible correlation with the development of malignant diseases. In this context, the German Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) recently published potentially harmful concentrations of PAs in honey, tea, herbals, and plant-based dietary supplements and recommends to keep the consumption of PA-containing food as low as reasonably achievable. Moreover, food industry is requested to keep PA concentrations at a minimum as legal regulations are expected to be introduced prospectively. Compared to the state-of-the-art liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) based analysis method, antibody-based enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), requiring only minor-trained staff and less-expensive equipment for analyzing a high number of samples in parallel could provide a promising alternative for a cost-effective evaluation of PAs in contaminated food and feed. Therefore, in this thesis new monoclonal antibodies (mAbs) capable of binding specifically to the necine base Retronecine have been generated, intensively characterized and tested for their applicability in an ELISA for the quantification of Retronecine-based PAs. Using a well-characterized newly designed immunogen based on a nitrogen-containing spacer between Retronecine and the protein carrier for the immunization of rats and a spacer-free heterologous Retronecine-BSA-conjugate for the screening of numerous hybridoma cell culture supernatants, a mAb binding Retronecine could be identified. MAb18H4, an IgG2a subtype with a molecular weight (MW) of 147 kDa, showed an IC_{50} -value of 115.8 ± 30.3 ng/ml, a linear working range of 62.9 - 500.8 ng/ml and a limit of detection (LOD) of 29.9 ng/ml for Retronecine in an indirect competitive ELISA. Compared to previously published PA-mAbs, the analytical parameters for the basic structure Retronecine were superior. The determination of the K_d value using Isothermal Titration Calorimetry (ITC) and Surface Plasmon Resonance (SPR) Spectroscopy resulted in a value of approximately 10^{-6} - 10^{-7} M. Analyzing its cross-reactivities (CRs) with 29 different PAs and PA-N-Oxides (PANOs) revealed no CRs for PANOs but high CRs for Retronecine-based open-chain diesters and two macrocyclic PAs Seneciophylline (Sp) and Integerrimine (Ig). Different CRs were most likely caused by the contribution of the PA's and especially the

ester's conformation to the epitope structure. Moreover, mAb18H4 showed acceptable stability in organic solvents (ACN, MeOH, EtOH) and high pH-stability at pH 4.68 - pH 9.96 as well as in 1:10 diluted and neutralized raw extracts from peppermint, fennel, chamomile, and honey. However, a matrix-matched calibration for quantification by indirect competitive ELISA is indispensable. The examined cationic-exchange sorbent-based solid-phase extraction (SPE) sufficiently depleted matrix effects in honey extracts. Moreover, the quantification of PANOs after zinc-based reduction showed promising results. In summary, the application of mAb18H4 is suitable in the context of highly contaminated extracts, whereas for low contaminated samples the optimization of extraction protocols and the selective enrichment of Retronecine-based PAs for example by using molecularly imprinted polymer (MIP)-based SPE offer promising approaches.

Kurzfassung

Die strukturell vielfältigen und ubiquitär auftretenden toxikologisch relevanten Pyrrolizidinalkaloide (PA) erregen als potentielle Kontaminanten pflanzenbasierter Lebensmittel zunehmend die öffentliche Aufmerksamkeit. So können sie nach Verzehr in der Leber zu toxischen Pyrrol-Estern metabolisiert werden und infolge der Bildung von DNA- und Proteinaddukten zu akuten Leberschädigungen führen. In der Literatur sind Fälle akuter Intoxikation mit PA in Zusammenhang mit Leberversagen dokumentiert. Allerdings ist in Europa die langfristige Aufnahme geringer Mengen von größerer Bedeutung, da diese im Zusammenhang mit der Entstehung maligner Erkrankungen diskutiert wird. Das BfR veröffentlichte zuletzt zahlreiche Studien, welche von gesundheitlich bedenklichen PA-Konzentrationen in Honig, (Kräuter-)Tees, Kräutern und pflanzlichen Nahrungsergänzungsmitteln berichteten und empfiehlt daher die Aufnahme von PA auf die geringst mögliche Menge zu reduzieren. Auch die Nahrungsmittelindustrie ist angehalten, betreffende Produkte in Hinblick auf Kontaminationen zu prüfen. Die Einführung gesetzlicher Vorgaben für eine maximale Belastung von Lebensmitteln wird gegenwärtig diskutiert. Verglichen mit der derzeitigen Standard-Analysemethode basierend auf LC-MS, bieten Antikörper-basierte Enzymimmunoassays (ELISAs) wegen des kostengünstigen Equipments und dem Einsatz von weitgehend ungeschultem Personal eine vielversprechende Alternative für eine schnelle Vor-Ort-Bewertung von potentiell mit PA belasteter Roh- und Fertigware. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit neue monoklonale Antikörper (mAk) gegen den PA-Grundkörper Retronecin generiert, intensiv charakterisiert und in Hinblick auf die Verwendung in einem ELISA für die Quantifizierung von Retronecin-basierten PA untersucht. Unter Verwendung eines neuen Heteroatom-enthaltenen Linkers zwischen Retronecin und Proteinträger des Immunogens sowie eines heterologen Retronecin-BSA-Konjugats ohne Linkerstruktur für das Screening der Hybridom-Zellkulturüberstände (ZKÜ), konnte ein mAk identifiziert werden, welcher Retronecin weitgehend spezifisch detektiert. Für den mAk18H4, ein IgG2a-Subtyp mit einem Molekulargewicht (engl. *molecular weight*, MW) von 147 kDa, konnten in einem indirekt kompetitiven ELISA ein IC_{50} -Wert von $115,8 \pm 30,3$ ng/ml, ein linearer Arbeitsbereich von 62,9 - 500,8 ng/ml und eine Nachweisgrenze (LOD) von 29,9 ng/ml für Retronecin ermittelt werden. Damit weist der mAk18H4 im Vergleich zu bisher bekannten Arbeiten eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber dem PA-Grundkörper Retronecin auf. Der mittels Isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) und Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie) bestimmte K_d -Wert lag in einem Bereich von etwa 10^{-6} - 10^{-7} M. Die Untersuchung der Kreuzreaktivität (KR) gegenüber 29 verschiedenen PA und PA-N-Oxiden (PANO) ergab keine KR für PANO, jedoch hohe KR für Retronecin-basierte

offenkettige Monoester sowie für die makrozyklischen PA Seneciophyllin (Sp) und Integerrimin (Ig). Die unterschiedlichen KR lassen sich dabei durch die sterische Konformation der PA und insbesondere durch die Struktur des/der Carbonsäureester/s als Teil des Epitops erklären. Der mAk18H4 zeigte gegenüber verschiedenen organischen Lösungsmitteln (ACN, MeOH, EtOH) eine akzeptable sowie eine hohe pH-Stabilität über einen Bereich von pH 4,68 - pH 9,96. Die umfassende Testung seiner Stabilität in neutralisierten Rohextrakten aus Pfefferminze, Fenchel, Kamille und Honig ergab akzeptable Werte nach einer 1:10-Verdünnung in PBS. Allerdings ist für die quantitative Analyse eine *matrix-matched* Kalibrierung mit einer geeigneten Blank-Matrix unverzichtbar. Die getestete Kationentauscher-SPE konnte für Honig eine ausreichende Abreicherung störender Matrixbestandteile zeigen. Weiterhin war auch eine Quantifizierung reduzierter PANO im etablierten ELISA erfolgreich. Folglich ist die Anwendung des mAk18H4 für die Quantifizierung von Retronecin und Retronecin-Äquivalenten im Kontext potentiell hoch belasteter pflanzlicher Extrakte möglich. Im Zusammenhang mit geringer belasteten Proben stellen die Anpassung der Extraktionsprotokolle sowie eine selektive Anreicherung von Retronecin-basierten PA auch unter Verwendung von auf molekular geprägten Polymeren (engl. *molecularly imprinted polymers*, MIPs) basierenden Festphasen vielversprechende Ansätze dar.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung.....	1
2. Theoretischer Hintergrund.....	5
2.1. Pyrrolizidinalkaloide (PA)	5
2.1.1. Allgemeines.....	5
2.1.2. Chemie und Klassifikation von PA	5
2.1.3. Metabolisierung von PA	9
2.1.4. Toxizität und Pathogenität von PA	12
2.1.5. PA in Lebensmitteln	13
2.1.6. Gesetzgebung und Grenzwerte	15
2.2. Analytik von PA	17
2.2.1. Extraktion und Aufarbeitung von PA und PANO	17
2.2.2. Spektrophotometrie	18
2.2.3. Chromatographische Methoden	18
2.2.4. Kernspinresonanz-Spektroskopie	20
2.2.5. Immunoassays für die Detektion von PA	21
2.3. Immunoassays und Antikörper	22
2.3.1. Immunoassays	22
2.3.2. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA).....	23
2.3.3. Antikörper	27
2.3.4. Generierung polyklonaler und monoklonaler Antikörper	30
2.4. Charakterisierung monoklonaler Antikörper	33
2.4.1. Bestimmung der thermodynamischen Bindungskonstanten	36

3.	Ergebnisse und Diskussion	41
3.1.	Generierung monoklonaler Antikörper für die Detektion des PA- Grundkörpers Retronecin	41
3.1.1.	Design, Synthese und Charakterisierung von Immunogenen	41
3.1.2.	Synthese und Charakterisierung eines heterologen Konjugats	44
3.1.3.	Immunisierung und Screening von Zellkulturüberständen	47
3.1.4.	MALDI-TOF-MS des aufgereinigten mAk18H4	49
3.2.	Affinitätsbestimmungen des murinen mAk18H4	50
3.2.1.	Affinitätsbestimmung mittels indirekt kompetitivem ELISA	50
3.2.2.	Bestimmung thermodynamischer Bindungskonstanten mittels ITC und SPR-Spektroskopie	52
3.3.	Untersuchung der Kreuzreaktivitäten gegenüber verschiedenen Retronecin-, Heliotridin- und Otonecin-basierten PA	58
3.3.1.	Untersuchung der antigenen Determinante	63
3.4.	Stabilitätsuntersuchungen des murinen mAk18H4	68
3.4.1.	Stabilität gegenüber verschiedenen organischen Lösungsmitteln und pH-Werten	68
3.4.2.	Stabilität in pflanzlichen Rohextrakten und Honig	70
3.4.3.	Stabilität in SPE-Eluaten	74
3.5.	Reduktion von PANO zu PA	79
4.	Zusammenfassung und Ausblick	83
5.	Experimenteller Teil	89
5.1.	Geräte und Materialien	89
5.1.1.	Geräte	89
5.1.2.	Software	91
5.1.3.	Antigene und Antikörper	92
5.1.4.	Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	93

5.1.5. Pufferlösungen	99
5.2. Methoden	101
5.2.1. Synthese von Retronecin-BSA-Konjugaten	101
5.2.2. Charakterisierung von Retronecin-BSA-Konjugaten	102
5.2.3. MALDI-TOF-MS	103
5.2.4. Herstellung monoklonaler anti-Retronecin-Antikörper	104
5.2.5. Screening von ZKÜ	105
5.2.6. Abschätzung der Dissoziationskonstanten aus dem IC_{50} -Wert.....	106
5.2.7. Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC).....	106
5.2.8. Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie) .	107
5.2.9. Bestimmung der Kreuzreaktivitäten	108
5.2.10. Untersuchungen zur Strukturaufklärung der antigenen Determinante mittels molekularer <i>Alignments</i>	108
5.2.11. Stabilitätsuntersuchungen in organischen Lösungsmitteln	109
5.2.12. Stabilitätsuntersuchungen bei verschiedenen pH-Werten	109
5.2.13. Herstellung von Rohextrakten	109
5.2.14. Untersuchung von Matrixeffekten in Rohextrakten	110
5.2.15. Festphasenextraktion (SPE) für eine Aufreinigung von Rohextrakten..	110
5.2.16. Untersuchung von Matrixeffekten in SPE-Eluaten	110
5.2.17. Reduktion von PANO zu PA	111
5.2.18. HPLC-ESI-MS	111
Literaturverzeichnis.....	113
A. Anhang	137

Abkürzungsverzeichnis

ABDV	2,2'-Azobis(2,4-dimethylvaleronitril)
ALARA	<i>As low as reasonably achievable</i>
APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i> oder chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BMDL	<i>Benchmark dose lower confidence limit</i>
BRD	Bundesrepublik Deutschland
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> oder Rinderserumalbumin
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
CI	<i>Chemical ionization</i> oder chemische Ionisation
CID	<i>Collision induced dissociation</i> oder kollisionsinduzierte Dissoziation
CR	<i>Cross-reactivity</i>
CYP2B/3A	Cytochrom P450, Familie 2 (3), Subfamilie A (B)
DHP	Dehydropyrrolizin, (±)-6,7-dihydro-7-hydroxy-1-hydroxymethyl-5H-pyrrolizin
DHPA	Dehydropyrrolizidinalkaloid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> oder Desoxyribonukleinsäure
DP	<i>Differential power</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> oder Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
EI	<i>Electron ionization</i> oder Elektronenstoßionisation
EIA	<i>Enzyme immunoassay</i> oder Enzymimmunoassay
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMIT	<i>Enzyme-multiplied immunoassay technique</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i> oder Elektrospray-Ionisation
EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
FA	<i>Formic acid</i> oder Ameisensäure
Fab	<i>Antigen binding fragment</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> oder Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>

Abkürzungsverzeichnis

FPIA	<i>Fluorescence polarization immunoassay</i> oder Fluoreszenz-polarisations-Immunoassay
GC	<i>Gas chromatography</i> oder Gaschromatographie
GSH	Glutathion
h	Stunde
HAT Medium	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-Medium
HBGV	<i>Health based guidance value</i>
HCCA	<i>α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid</i> oder α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure
HCl	<i>Hydrochloric acid</i> oder Salzsäure
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> oder Hochleistungsflüssigchromatographie
HRMS	<i>High resolution mass spectrometry</i> oder hochauflösende Massenspektrometrie
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> oder Meerrettichperoxidase
HSOS	<i>Hepatic sinusoidal obstruction syndrome</i> oder venösen okklusiven Leberkrankheit
HSS	Homospermidinsynthase
HTS	<i>High-throughput-screening</i> oder Hochdurchsatz-Screening
IC ₅₀	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
i.d.	Von latein. <i>intra dermis</i> , intradermal, in die Lederhaut hinein
IFA	Inkomplettes Freund-Adjuvans
IgA, G, E, M, D	Immunoglobulin A, G, E, M, D
i.m.	Von latein. <i>intra muscularis</i> , intramuskulär, in den Muskel hinein
i.p.	Von latein. <i>intra peritoneum</i> , intraperitoneal, in das Bauchfell hinein
IPCS	<i>International Programme on Chemical Safety</i>
ITC	<i>Isothermal titration calorimetry</i> oder isotherme Titrationskalorimetrie
i.v.	Von latein. <i>intra vena</i> , intravenös, in eine Vene hinein
K _a	Assoziationskonstante im Gleichgewicht
k _a	Assoziationsratenkonstante
K _d	Dissoziationskonstante im Gleichgewicht
k _d	Dissoziationsratenkonstante
kDa	Kilodalton

KLH	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i> oder Schlitzschnecken-Hämocyanin
KR	Kreuzreaktivität
l	Liter
LBA	<i>Ligand binding assay</i> oder Ligandenbindungstest
LC	<i>Liquid chromatography</i> oder Flüssigchromatographie
LD ₅₀	<i>Median lethal dose</i> oder mittlere letale Dosis
LOD	<i>Limit of detection</i> oder Nachweisgrenze
LOQ	<i>Limit of quantification</i> oder Bestimmungsgrenze
m	Anzahl technischer Replikate
mAb	<i>Monoclonal antibody</i>
mAb4B8	<i>Monoclonal antibody 4B8</i>
mAk	Monoklonaler Antikörper
mAk18H4	Monoklonaler Antikörper 18H4
MALDI-TOF-MS	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry</i>
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute
MIP	<i>Molecularly imprinted polymer</i> oder molekular geprägtes Polymer
MISPE	<i>Molecularly imprinted solid-phase extraction</i>
ml	Milliliter
MOE	<i>Margin of exposure</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i> oder Massenspektrometrie
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i> oder Tandem-Massenspektrometrie
MTP	Mikrotiterplatte
MW	<i>Molecular weight</i> oder Molekulargewicht
n	Anzahl durchgeführter Experimente bzw. gemessener MTPs
ng	Nanogramm
NH-Gruppe	Aminogruppe
NIP	<i>Non-imprinted polymer</i> oder nicht geprägtes Polymer
nm	Nanometer
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> oder Kernspinresonanz
NOAEL	<i>No observed adverse effect level</i>

Abkürzungsverzeichnis

OD	Optische Dichte
OH-Gruppe	Hydroxylgruppe
PA	Pyrrrolizidinalkaloid
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> oder Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAH	<i>Pulmonary arterial hypertension</i> oder pulmonale Hypertonie
pAk	Polyklonaler Antikörper
PANO	Pyrrrolizidinalkaloid N-Oxid
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> oder Phosphatgepufferte Salzlösung
PVDF	Polyvinylidenfluorid
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RIA	Radioimmunoassay
rpm	<i>Rounds per minute</i> oder Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RU	<i>Refractive units</i>
s	Sekunde
SA	<i>Sinapinic acid, trans-3,5-dimethoxy-4-hydroxy cinnamic acid</i> oder Sinapinsäure
s.c.	Von latein. <i>sub cutis</i> , subkutan, unter die Haut
SCK	<i>Single cycle kinetic</i>
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i>
SH-Gruppe	Sulfhydrylgruppe
SPE	<i>Solid-phase extraction</i> oder Festphasenextraktion
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i> oder Oberflächenplasmonenresonanz
T	Temperatur
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i> oder Trifluoressigsäure
TFMAA	<i>2-(Trifluoromethyl)acrylic acid</i>
TG	Thyreoglobulin
TLC	<i>Thin layer chromatography</i> oder Dünnschichtchromatographie
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TMS	Trimethylsilan
TRIM	<i>Trimethylolpropane trimethacrylate</i>
U	Umdrehungen

UHPLC	<i>Ultra-high performance liquid chromatography</i> oder HPLC mit gesteigerter Leistung
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
VOD	<i>veno-occlusive disease</i> oder venöse okklusive Leberkrankheit
WFR	Wiederfindungsrate
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZKÜ	Zellkulturüberstand

1. Einleitung

Erhöhte Konzentrationen von hepatotoxischen PA werden immer wieder von unabhängigen deutschen Verbraucherschutzorganisationen in Lebensmitteln nachgewiesen. Stiftung Warentest konnte 2017 gesundheitlich kritische Konzentrationen von PA in Kamillentee¹ nachweisen. Im selben Jahr ermittelte ZDF WISO überdurchschnittlich hohe Konzentrationen von PA in verschiedensten Schwangerschafts- und Stilltees² sowie Baby-Tees³, deren Verzehr folglich eine Gesundheitsgefahr für Schwangere und Kleinkinder darstellt. Auch das BfR und die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (engl. *European Food Safety Authority*, EFSA) berichten seit einigen Jahren von gesundheitlich bedenklichen Mengen von PA unter anderem in Tee, Nahrungsergänzungsmitteln, Kräutern, Honig sowie Salatmischungen (BfR, 2007, 2011, 2013, 2016, 2018, 2019; efsa, 2011, 2016, 2017).

Die strukturell sehr vielfältigen PA oder 1,2-Dehydro-PA und 1,2-Dehydro-PA-N-Oxide (PANO) als ihre wasserlöslichere Speicherform (Hartmann et al., 1987), sind pflanzliche Sekundärmetabolite und werden ubiquitär als Fraßgift von etwa 3-5% aller bedecktsamigen Pflanzen und damit einer großen Anzahl von Pflanzen (ca. 6000) weltweit produziert (Roeder, 2000; Smith et al., 1981; Wiedenfeld, 2013). Beim Verzehr PA-haltiger Pflanzen führt die metabolische Aktivierung der Protoxine durch Cytochrom P450 Monooxygenasen in der Leber zur Entstehung von Pyrrol-Estern, welche als hochreaktive Alkylierungsreagenzien sowohl mit Proteinen als auch DNA Addukte bilden und somit akut oder chronisch toxisch wirken können (Edgar et al., 2015). Akute Vergiftungsfälle sind sowohl für Zuchtvieh (Anjos et al., 2010; Hill et al., 1997) als auch für Menschen (Chauvin et al., 1994; Kakar et al., 2010) nach Verzehr PA-haltiger Pflanzen beschrieben. Sie manifestieren sich durch die akute venöse okklusive Leberkrankheit (engl. *veno-occlusive disease*, VOD) (Chen et al., 2010b; Zuckerman et al., 2002), welche bei schwerem Verlauf tödlich enden kann (Senzolo et al., 2007). In Europa von deutlich höherer Relevanz ist die chronisch toxische Wirkung von PA bei langfristigem Verzehr geringer Konzentrationen. Zwar existieren dazu bisher keine epidemiologischen Daten, in Tierversuchen konnte jedoch ein kausaler

¹ <https://www.test.de/Kamillentee-von-Kusmi-Extrem-mit-Schadstoffen-belastet-5126437-0/> (aufgerufen am 02.10.2019)

² <https://www.zdf.de/verbraucher/wiso/krebserregende-stoffe-in-schwangerschafts-und-stilltees-100.html> (aufgerufen am 02.10.2019)

³ <https://www.zdf.de/verbraucher/wiso/krebserregende-stoffe-in-bio-babytee-100.html> (aufgerufen am 02.10.2019)

Zusammenhang zwischen dem Verzehr von PA und der Entstehung von chronischen Erkrankungen wie Krebs hergestellt werden (Chen et al., 2010a).

Die Weltgesundheitsorganisation (engl. *World Health Organisation*, WHO) hat bereits 1988 im „*International Programme on Chemical Safety*“ (IPCS) auf die gesundheitsgefährdende Wirkung von PA hingewiesen (WHO, 1988). Basierend auf aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen zur Belastung von Lebensmitteln mit PA und Toxizitätsstudien mit Ratten unter Verwendung des PAs Riddellin, haben zuletzt die EFSA im Jahr 2017 (efsa, 2017) und darauf basierend das BfR aktualisierte Empfehlungen für die maximale orale Aufnahme von PA herausgegeben. Demnach sollen bei einem $BMDL_{10}^4$ (engl. *benchmark dose lower confidence limit*₁₀) von 237 µg/kg Körpergewicht und einem *margin of exposure* (MOE⁵) von 10.000 täglich nicht mehr als 23,7 ng/kg Körpergewicht aufgenommen werden (BfR, 2018). Gesetzliche Regelungen gibt es bisher nicht, ihre Einführung durch die Bundesrepublik Deutschland (BRD) oder die Europäische Union (EU) ist jedoch nicht auszuschließen.

Eine Intoxikation über Lebensmittel erfolgt in Europa hauptsächlich durch den Verzehr von mit PA-haltigen Pflanzen kontaminierten (Kräuter-)Tees, Kräuter-haltigen Nahrungsergänzungsmitteln oder Honig (Mulder et al., 2018). So kann Tee durch Miternte von PA-haltigen Pflanzen kontaminiert werden (Bodi et al., 2014), Nahrungsergänzungsmittel hingegen werden teilweise direkt aus PA-produzierenden Pflanzen gewonnen (Chen et al., 2017). In Honig kann PA-haltiger Pollen und Nektar durch Bienen eingetragen werden (Boppré et al., 2005; Lucchetti et al., 2016). Aus diesem Grund appellieren EFSA und BfR besonders an die Nahrungsmittelindustrie, durch entsprechende analytische Methoden eine Bewertung ihrer Rohware vorzunehmen und hoch belastete Chargen nicht für den Verkauf freizugeben.

Derzeit werden für die qualitative und quantitative Bestimmung von PA und PANO in verschiedensten Matrices überwiegend mit Massenspektrometrie (engl. *mass spectrometry*, MS) gekoppelte Flüssig- und Gaschromatographie (engl. *liquid chromatography*, LC und engl. *gas chromatography*, GC) eingesetzt (Crews, 2013). Diese zeichnen sich zwar durch eine hohe Sensitivität und Selektivität aus, setzen jedoch in vielen Fällen eine aufwendige

⁴ $BMDL_{10}$: Unteres Konfidenzlevel der Dosis, welche in Tierversuchen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe einen Anstieg der Tumorentstehung bei 10% der Tiere bewirkt (BfR, 2019)

⁵ MOE: Quotient aus ermitteltem Referenzpunkt $BMDL_{10}$ und der Gesamtexposition gegenüber der Substanz beim Menschen (BfR, 2019); Werte dienen der Priorisierung für Maßnahmen des Risikomanagements (BfR, 2018)

Probenvorbereitung, Verfügbarkeit von kostenintensiver Messtechnik und hoch ausgebildetes Personal für die Durchführung und Auswertung der Messungen voraus. Eine vielversprechende Alternative stellen Antikörper-basierte Nachweisverfahren, beispielsweise in Form eines ELISAs, dar. Sie bieten im Vergleich zu LC-MS-basierten Methoden zahlreiche Vorteile. So kann auf eine aufwendige Probenvorbereitung in vielen Fällen verzichtet werden. Weiterhin ist die benötigte instrumentelle Messtechnik weniger kostenintensiv und Messungen können von ungeschultem Personal durchgeführt und ausgewertet werden. Auch ist die parallele Analyse einer Vielzahl von Proben, vergleichbar mit einem Hochdurchsatz-Screening (engl. *high-throughput-screening*, HTS), möglich. Voraussetzung für die Etablierung und Entwicklung eines sensitiven ELISAs ist die Verfügbarkeit von hoch affinen und selektiven mAk.

In der Vergangenheit gab es bereits Ansätze zur Generierung von Antikörpern gegen PA und ihre Verwendung für die Etablierung von Immunoassays. In fast allen Arbeiten wurden jedoch polyklonale Seren für die Entwicklung der Bestimmungsmethode verwendet (Bober et al., 1989; Langer et al., 1996; Lee et al., 2001; Oplatowska et al., 2014; Roeder et al., 1995; Roseman et al., 1996; Roseman et al., 1992; Than et al., 2005). Diese Antikörpergemische gegen verschiedenste Epitope eines Antigens eignen sich wegen fehlender Reproduzierbarkeit der Antikörpergewinnung nicht für den breiten Einsatz in einer sensitiven Messmethode, welche die Verfügbarkeit eines charakterisierten mAk mit definierten Bindungseigenschaften voraussetzt. Die Generierung von mAk gegen einzelne PA ist bisher nur in zwei Arbeiten beschrieben worden (Sakamoto et al., 2017; Zündorf et al., 1997). In den Arbeiten wurde das makrozyklische PA Retrorsin sowie der PA-Grundkörper Retronecin für die Immunisierung verwendet, die KR jedoch nur sehr eingeschränkt untersucht.

Da in der Familie der toxischen 1,2-Dehydro-PA die strukturell auf der Necinbase Retronecin-basierenden PA des Senecionin-, Lycopsamin-, Triangularin- und Monocrotalin-Typs (Hartmann et al., 1995) aufgrund ihrer Häufigkeit von besonderer Relevanz sind, ist die Generierung eines mAk für die Detektion dieses Grundkörpers und seine Verwendung bei der Entwicklung eines ELISAs im Sinne der quantitativen Bestimmung von Retronecin-Äquivalenten in Lebensmitteln von besonderem Interesse. Im Erfolgsfall könnte der Lebensmittelindustrie eine einfache und schnelle Analysemethode für die Bewertung ihrer Rohware zur Verfügung gestellt werden.

Aus diesem Grund wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch die Immunisierung mit speziellen Retronecin-basierten Immunogenen mAks gegen den PA-Grundkörper Re-

Einleitung

tronecin generiert, ausführlich charakterisiert und damit ihre Eignung in Hinblick auf die Entwicklung einer mAk-basierten quantitativen Bestimmungsmethode von Retronecin-Äquivalenten in pflanzlichen Rohextrakten geprüft.

2. Theoretischer Hintergrund

2.1. Pyrrolizidinalkaloide (PA)

2.1.1. Allgemeines

PA sind natürlich vorkommende, konstitutiv als Abwehrmechanismus gegen Herbivoren gebildete pflanzliche Sekundärmetabolite (Hartmann, 1999). Bedingt durch ihre hohe strukturelle Vielfalt sind bis dato etwa 660 verschiedene PA bekannt (Roeder, 2000). Es wird angenommen, dass etwa 3-5% aller Bedecktsamer PA produzieren (Smith et al., 1981; Wiedenfeld, 2013). Besonders Pflanzen aus den Familien der Korbblütler (*Asteraceae*), Raublatt- oder Borretschgewächse (*Boraginaceae*), Hundsgiftgewächse (*Apocynaceae*), Orchideen (*Orchidaceae*) und Hülsenfrüchtler (*Fabaceae*) gelten als Produzenten von PA (Hartmann et al., 1995). Dabei ist der PA-Gehalt in den Pflanzen abhängig von verschiedenen Faktoren (bspw. Spezies, Teil der Pflanze, Ernte, Lagerung und Extraktionsmethode) und kann zwischen Spurenmengen bis hin zu 19% des Trockengewichts variieren (Johnson et al., 1985). Primäre Speicherform der PA in Pflanzen sind die oxidierten und damit polaren und wasserlöslicheren N-oxide (PANO) (Ehmke et al., 1988; Hartmann et al., 1987). Im Zusammenhang mit PA sind akut hepatotoxische, aber auch genotoxische und kanzerogene Wirkungen, in aktuellen Studien für einigen Strukturen auch eine pharmakologisch wertvolle Wirkung, beschrieben (Robertson et al., 2017).

2.1.2. Chemie und Klassifikation von PA

PA gehören zur Stoffklasse der Alkaloide und sind damit stickstoffhaltige organische Verbindungen unterschiedlichen Ursprungs mit einem mehr oder weniger ausgeprägten basischen Charakter (Hesse, 2000). Einige bekannte Vertreter der Alkaloide sind beispielsweise Nikotin, Koffein, Theobromin und Kokain.

PA setzen sich aus einer Necinbase sowie einer oder mehrerer Necinsäuren zusammen. Die Kombination einer Vielzahl von unterschiedlichen Necinbasen und -säuren sowie verschiedene mögliche reversible und irreversible Modifikationen wie N-Oxidation, Hydroxylierung oder Acetylierung, bedingen die große strukturelle Vielfalt der PA (Schramm et al., 2019). Strukturelle Grundlage der Necinbasen bildet das Pyrrolizidin, ein bicyklisches tertiäres Amin (Molyneux et al., 2011) (s. Abbildung 1a). Ihre Biosynthese wurde mittels ¹⁴C-Radiocarbonatierung hauptsächlich anhand von PA des Senecionin-Typs untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ihre Synthese aus der nichtproteinogenen α -Aminosäure Ornithin erfolgt (Wiedenfeld, 2013). Diese wird über die proteinogene α -Aminosäure Arginin und weitere Zwischenstufen zu dem Diamin Putrescin verstoffwechselt. Durch die NAD⁺-

abhängige Homospermidinsynthese (HSS) katalysiert, erfolgt anschließend die Bildung von Homospermidin über die Kondensation zweier Putrescinmoleküle (Böttcher et al., 1993) oder eines Putrescin- und eines Spermidinmoleküls (Roeder, 2000). Das symmetrische Intermediat wird anschließend zunächst zum entsprechenden Iminiumion zyklisiert und bildet nach Reduktion und einer finalen Zyklisierung 1-Hydroxymethylpyrrolizidin (s. Abbildung 1b) als strukturelle Grundlage der Necinbasen (Roeder, 1995).

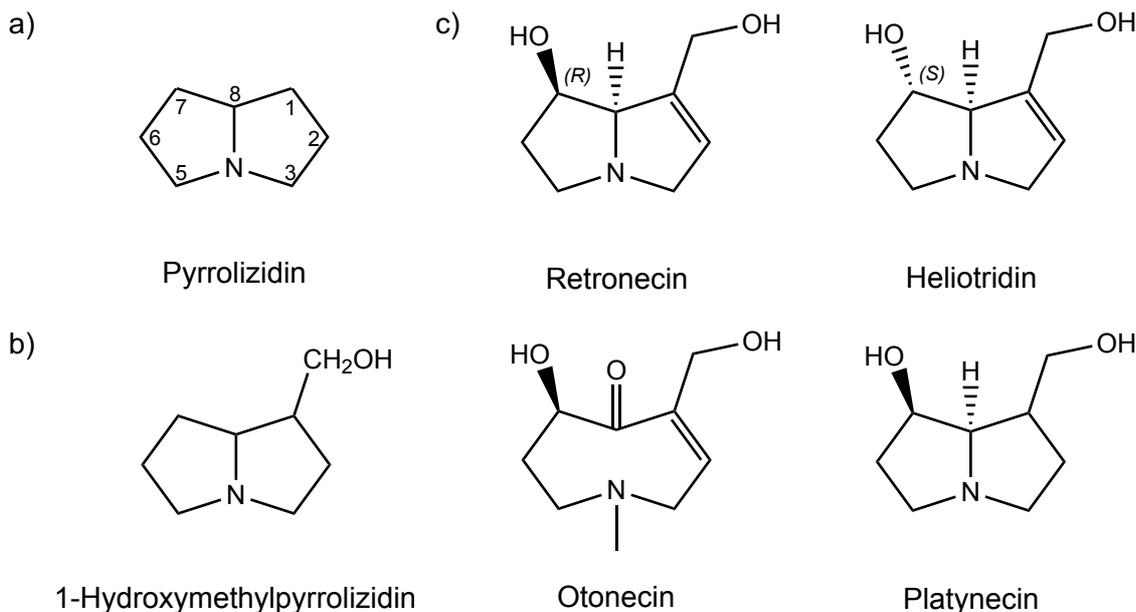


Abbildung 1: Pyrrolizidin als strukturelle Grundlage der PA (a), 1-Hydroxymethylpyrrolizidin (b) und verschiedene, häufig vorkommende Necinbasen und PA-Grundkörper (c).

Die bekanntesten und am häufigsten vorkommenden Necinbasen lassen sich abhängig von ihrer Struktur in vier Gruppen einteilen (s. Abbildung 1c): Retronecin, sein Diastereomer Heliotridin (Retronecin in *(R)*-Konfiguration⁶, Heliotridin in *(S)*-Konfiguration an Position C7), Otonecin und Platynecin (Gottschalk et al., 2015). Alle weisen eine Hydroxymethylgruppe am C1 und eine Hydroxylgruppe am C7 auf. Platynecin ist im Gegensatz zu den übrigen Aminoalkoholen nicht 1,2-ungesättigt und gilt damit, wie alle gesättigten PA, als toxikologisch nicht relevant (Roeder et al., 2009). Nur 1,2-Dehydropyrrolizidine können in der Leber zu toxischen Intermediaten verstoffwechselt werden (Edgar et al., 2015). Otonecin unterscheidet sich zusätzlich durch eine Oxidation der Position C8, die Methylierung des Heteroatoms und folglich durch ein monocyclisches Ringsystems von den übrigen Necinbasen.

⁶ Cahn-Ingold-Prelog Konvention

In der Natur kommen PA selten in Form ihrer Necinbasen vor, sondern sind über die Hydroxylgruppen an Position C7 und C9 mit aliphatischen Mono- oder Dicarbonsäuren, den sogenannten Necinsäuren, zu offenkettigen oder makrozyklischen Strukturen verestert (s. Abbildung 2) (Moreira et al., 2018). Diese Veresterung trägt maßgeblich zur großen strukturellen Vielfalt der PA bei. Die Biosynthese der Necinsäuren erfolgt hauptsächlich aus den proteinogenen verzweigt-kettigen aliphatischen α -Aminosäuren L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin sowie der polaren α -Aminosäure L-Threonin (Roeder, 1995).

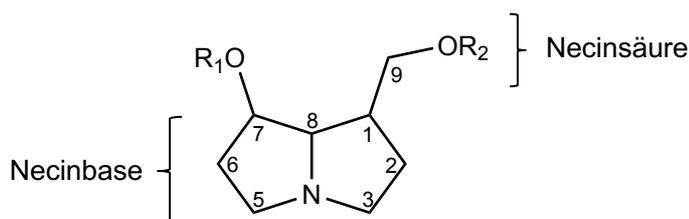


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines PA - Veresterung eines PA-Grundkörpers und einer Necinbase mit verschiedenen (R_1 und R_2) aliphatischen Mono- und Dicarbonsäuren (Necinsäuren).

Eine Veresterung mit Monocarbonsäuren führt zur Ausbildung offenkettiger Strukturen. Beispiele für mit Necinbasen veresterte einfache Monocarbonsäuren sind die Essigsäure als C_2 -Carbonsäure in einfachen PA wie 7-Acetylretronecin (El-Shazly et al., 2003) oder 7-Acetyllycopsamin (El-Shazly et al., 1998) aus Pflanzen der Familie der Raublattgewächse. Seltener zu finden ist die Milchsäure als C_3 -Carbonsäure in 9-Lactylheliotridin, ebenfalls in Pflanzen aus der Familie der Raublattgewächse (Ravi et al., 2008). Häufiger findet man hingegen verzweigt-kettige Carbonsäuren wie Sarracinsäure als C_5 -Carbonsäure in Triangularinen aus Pflanzen der Familie der Korbblütler und Raublattgewächse (Langel et al., 2011) oder die Echimidinsäure als C_7 -Carbonsäure in Echimidin (Culvenor et al., 1981), ebenfalls in Pflanzen aus der Familie der Raublattgewächse. Selten findet man auch aromatische Monocarbonsäuren, wie beispielsweise Benzoessäure in PA aus der Familie der Orchideen (Frölich et al., 2006; Huang et al., 2013; Lüning et al., 1966). Eine Veresterung mit Dicarbonsäuren führt hingegen zur Bildung von makrozyklischen Strukturen. Beispiele für mit Necinbasen veresterte Dicarbonsäuren sind die Monocrotalin- und Trichodesminsäure in den elfgliedrigen makrozyklischen PA Monocrotalin und Trichodesmin in Pflanzen aus der Familie der Korbblütler (Langel et al., 2011) und die Seneciophyllin- oder die Jacolinensäure in den zwölfgliedrigen makrozyklischen PA Seneciophyllin und Jacolin, ebenfalls aus Pflanzen der Familie der Korbblütler (Wiedenfeld et al., 2006).

Basierend auf der Art der Kombination von Necinbasen und Necinsäuren sowie dem daraus resultierenden Muster der Veresterung werden PA in fünf verschiedene Klassen eingeteilt.

So unterscheidet man zwischen Senecionin-, Triangularin-, Lycopsamin-, Monocrotalin und Phalaenopsin- oder auch Ipangulin-Typ PA (s. Abbildung 3).

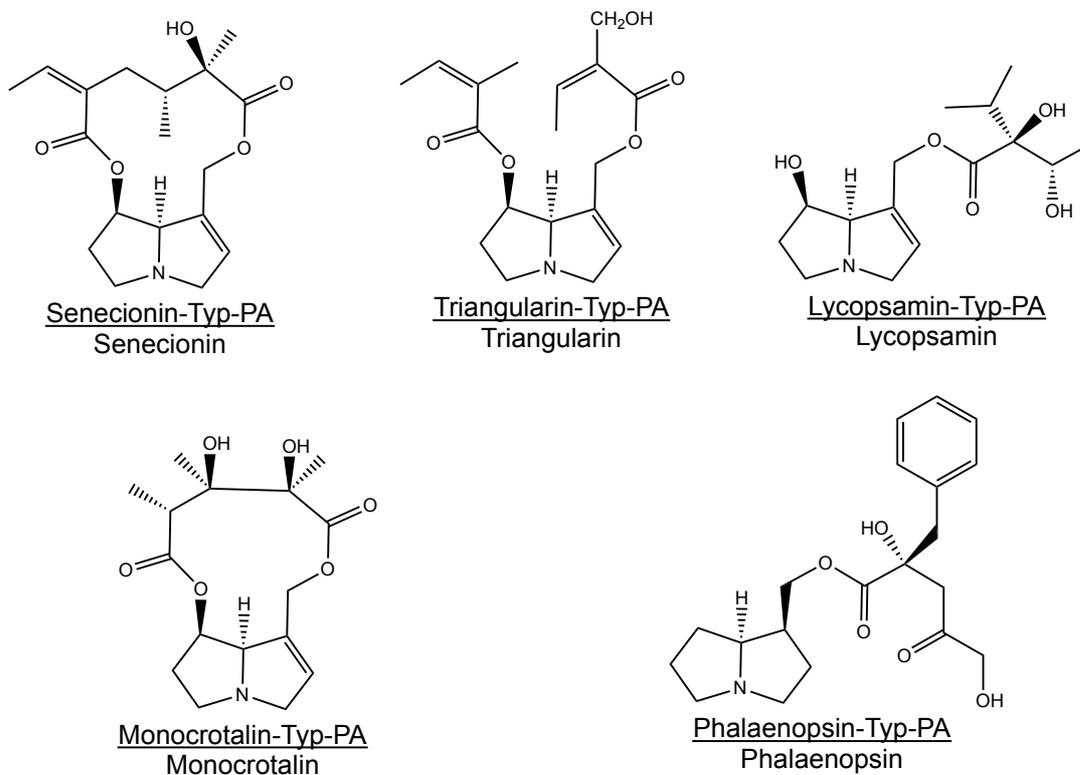


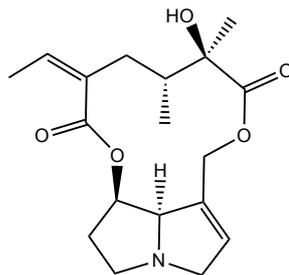
Abbildung 3: Klassifizierung von PA.

Senecionin-Typ-PA repräsentieren die größte Gruppe der PA. Sie gehören zu den zwölfgliedrigen makrozyklischen Diestern und bestehen aus einer Necinbase (z.B. Retronecin, Platynecin oder Otonecin) und einer aus zwei Molekülen L-Isoleucin oder L-Isoleucin und L-Leucin bestehenden verzweigt-kettigen C₁₀-Dicarbonsäure (Hartmann et al., 1995). Man findet sie hauptsächlich in Pflanzen des Tribus *Senecioneae* aus der Familie der Korbblütler sowie in Pflanzen aus der Familie der Hülsenfrüchtler. Triangularin-Typ-PA gehören zu den offenkettigen Mono- oder Diestern. Verestert sind die Necinbasen häufig mit zwei C₅-Monocarbonsäuren oder ihren hydroxylierten Derivaten. Auch sie treten besonders häufig in Pflanzen des Tribus *Senecioneae* aus der Familie der Korbblütler sowie in Pflanzen aus der Familie der Raublatt- oder Borretschgewächse auf. Bei den Lycopsamin-Typ-PA handelt es sich ebenfalls um offenkettige Mono- oder Diester, welche aus einer Necinbase und häufig der verzweigt-kettigen hydroxylierten C₇-Monocarbonsäure 2-Isopropylbuttersäure gebildet werden. Sie treten vermehrt in Pflanzen aus der Familie der Raublatt- und Borretschgewächse sowie in Pflanzen des Tribus *Eupatoriaea* aus der Familie der Korbblütler auf. Die Monocrotalin-Typ-PA bilden eine weitere, jedoch kleinere Gruppe makrozyklischer PA. Im Gegensatz zu Senecionin-Typ-PA bilden sie einen nur elfgliedrigen Diester und sind besonders häufig in Pflanzen aus der Familie der Korbblütler zu finden. Die letzte größere

Klasse der PA bilden die Phalaenopsin- oder auch Ipangulin-Typ-PA. Sie bestehen aus einer 1,2-gesättigten Necinbase sowie häufig aromatischen Necinsäuren und werden vermehrt in Pflanzen aus der Familie der Orchideen nachgewiesen. Zusätzlich existiert noch eine sechste Klasse, welche Strukturen beinhaltet, die sich entweder nicht zu den fünf genannten Klassen zuordnen lassen oder die von besonders einfacher Struktur (Necinbase und Necinsäure Essigsäure) sind. (Hartmann et al., 1995; Langel et al., 2011)

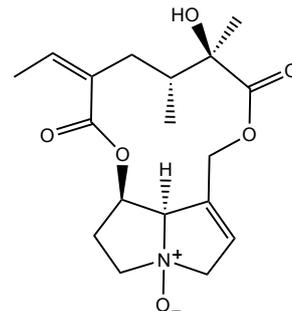
Zusätzlich können PA unterschiedlich reversibel und irreversibel modifiziert sein. Die am häufigsten auftretende reversible Modifikation der nicht Otonecin-basierten PA ist die N-Oxidation (s. Abbildung 4). Durch die Oxidation des schwach lipophilen tertiären Amins zu einem geladenen polaren Molekül wird die Wasserlöslichkeit der PA gesteigert. Die PANO stellen somit die Speicherform der PA in Pflanzen dar (Ehmke et al., 1988; Hartmann et al., 1987).

a)



Senecionin

b)



Senecionin-N-oxid

Abbildung 4: Senecionin - Tertiäres Amin (a) und N-Oxid (b).

2.1.3. Metabolisierung von PA

1,2- ungesättigte PA sind sogenannte Protoxine und werden erst durch die Verstoffwechslung in der Leber zu potenten und aktiv gewebeschädigenden Toxinen (Edgar et al., 2015). Mechanistische Hypothesen ihrer Metabolisierung sind in diversen *in vitro* und *in vivo* Versuchsstudien, beispielsweise in Ratten, Mäusen und Meerschweinchen, untersucht und überprüft worden. Die Grundlagen der Verstoffwechslung von PA sind im Folgenden beschrieben.

Nach Verzehr von mit PA und PANO kontaminierten Lebensmitteln, werden die Alkaloide im gastrointestinalen Trakt resorbiert (Fu et al., 2004). PANO werden durch die intestinale Flora zu PA reduziert (Mattocks, 1971; Wang et al., 2005), welche anschließend über die Blutgefäße zum zentralen Organ des Stoffwechsels transportiert werden. Die Leber ist neben der Lunge und den Nieren (Prakash et al., 1999) Hauptzielorgan der PA. Dort findet im

Allgemeinen die metabolische Aktivierung und damit die Biotransformation von Xenobiotika statt, was einerseits eine Exkretion von etwa 80% der verzehrten PA über Urin, Kot oder Milch, andererseits jedoch auch eine toxische Wirkung ermöglicht (Moreira et al., 2018).

Die Metabolisierung der PA (s. Abbildung 5) erfolgt hauptsächlich über Cytochrom P450 Monooxygenasen der Isotypen *CYP3A* und *CYP2B*, aber auch über Flavin-enthaltende Monooxygenasen und mikrosomale Carboxylesterasen (Fu, 2017). Dabei werden drei verschiedene Möglichkeiten der Metabolisierung unterschieden. So existieren zwei Wege der Detoxifikation, welche eine Exkretion der PA ermöglichen (s. Abbildung 5). Zum einen können PA durch Cytochrom P450 sowie Flavin-enthaltende Monooxygenasen oxidiert und in N-Oxide umgewandelt werden (Edgar et al., 2015). Diese sind durch ihre höhere Polarität besser wasserlöslich (Mattocks, 1971) und können folglich besser ausgeschieden werden. Da dieser Prozess jedoch reversibel ist, werden PANO umgekehrt auch zu PA reduziert und damit ebenfalls zu hepatotoxischen Metaboliten (Tamariz et al., 2018). Zum anderen können die Alkaloide durch die hepatische mikrosomale Carboxylesterase hydrolysiert und folglich in ihre Necinbasen und -säuren gespalten werden. Anschließend werden beide Hydrolyseprodukte ausgeschieden (Fu et al., 2004).

Die Bildung hepatotoxischer Metabolite erfolgt über Cytochrom P450-Monooxygenasen (Fu et al., 2004). PA werden dabei zu Dehydropyrrolizidinalkaloiden (DHPA) oxidiert. Diese Pyrrolester stellen die primären toxischen Metabolite und chemisch sowie biologisch hochreaktive Alkylierungsreagenzien dar und können mit nukleophilen Gruppen wie Sulfhydryl (SH)-, Amino (NH)- oder Hydroxyl (OH) -gruppen in der DNA (Zhao et al., 2012), zellulären Proteinen (Ma et al., 2018) oder dem antioxidativ wirkenden ubiquitären zellulären und nukleophilen Tripeptid Glutathion (γ -L- Glutamyl-L-cysteinylglycin, GSH) (Chen et al., 2016b; Meister et al., 1983; Muluneh et al., 2018) reagieren und eine Mischung aus C7 und C9 mono- oder di- (*cross-linked*, vernetzt) Konjugaten⁷ und -Addukten⁸ bilden.

Außerdem ist die spontane Hydrolyse der DHPA zu sekundären toxischen Metaboliten, den weniger reaktiven, jedoch stabileren Dehydronecinen (Dehydroretronecin oder Dehydroheiotridin, (\pm)-6,7-dihydro-7-hydroxy-1-hydroxymethyl-5H-pyrrolizin, DHP) möglich. Diese Di-ole sind wasserlöslicher als DHPA, was ihre Exkretion begünstigt. Jedoch können auch DHP Addukte und Konjugate mit der DNA und zellulären Proteinen bilden. (Mattocks, 1986)

⁷ Eine molekulare Spezies, welche in einem Organismus aus zwei Molekülen unterschiedlichen Ursprungs gebildet wird (z.B. Xenobiotikum und GSH) und z.B. die Wasserlöslichkeit des Xenobiotikums steigert (aus dem Englischen, (De Bolster, 1997)).

⁸ Eine neue chemische Spezies, welche aus der direkten 1:1-Kombination zweier Moleküle entsteht und ohne den Verlust von Atomen erfolgt (aus dem Englischen, (Muller, 1994)).

Ihre Bildung beschränkt sich dabei nicht nur auf die Leber. Studien konnten verschiedene Addukte und DHP in diversen Organen, wie beispielsweise Lunge, Niere (Candrian et al., 1985) und Blut (Mattocks et al., 1990), nachweisen.

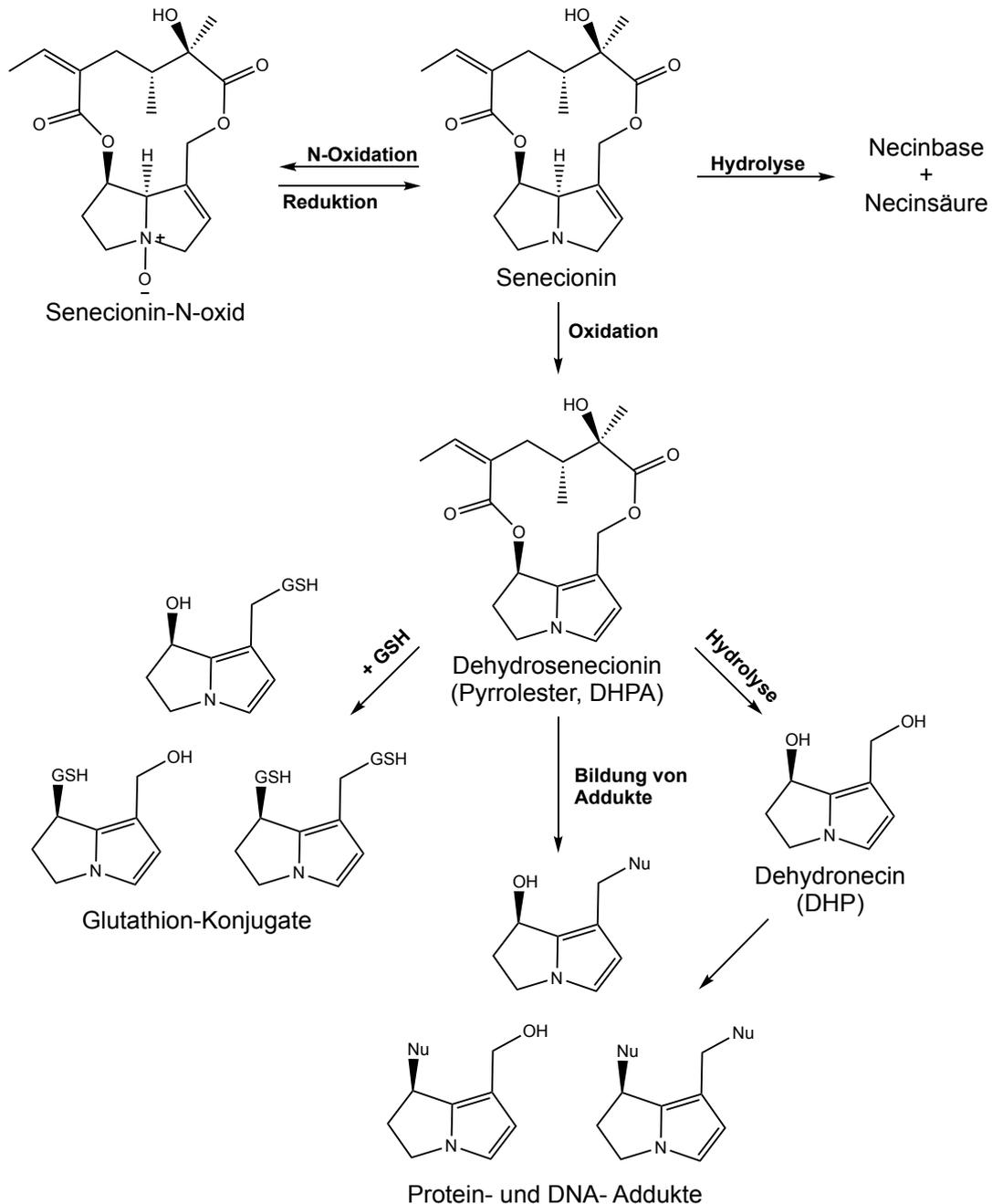


Abbildung 5: Schematische Darstellung (in Anlehnung an (Moreira et al., 2018)) der Metabolisierung von PA am Beispiel von Senecionin.

Dies ist vermutlich darin begründet, dass DHP oder auch DHP-Addukte aus der Leber heraus über den Blutkreislauf andere Organe erreichen. So können auch außerhalb der Leber

Addukte und Konjugate mit nukleophilen Strukturen gebildet und die Dauer der schädigenden Wirkung von PA durch die Reversibilität der Interaktion zwischen DHP und Proteinen oder DNA verlängert werden. (Edgar et al., 2015)

2.1.4. Toxizität und Pathogenität von PA

Die Toxizität und Pathogenität von PA hängt von verschiedenen Faktoren ab. So beeinflussen die Konzentration sowie die Dauer der oralen Aufnahme ihre akute, subakute oder chronisch toxische Wirkung. Weiterhin ist die toxische Wirkung stark von der metabolischen Aktivität der bei der Bioaktivierung und Detoxifikation beteiligten Enzyme abhängig. So sind Spezies-spezifische Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber PA-induzierten toxischen Effekten beschrieben. Ratten, Rinder, Pferde und Hühner sind dabei deutlich empfindlicher als Schafe, Kaninchen und Hamster (Cheeke, 1998), was sich mit der unterschiedlichen Aktivität der an der Metabolisierung der PA beteiligten mikrosomalen Enzyme erklären lässt (Huan et al., 1998). In Versuchen mit Affen konnte außerdem gezeigt werden, dass das Alter eine Rolle bei der Empfindlichkeit gegenüber einer toxischen Wirkung von PA spielt. Jungaffen zeigten ein anderes Krankheitsbild als ausgewachsene Affen, was durch eine unterschiedliche Aktivität der Cytochrom P450 Monooxygenasen begründet werden kann (Allen et al., 1972). Weiterhin spielt die chemische Struktur der PA eine Rolle. So zeigen nicht alle PA im selben Maße toxische Wirkungen. Studien mit *Drosophila melanogaster* (Frei et al., 1992) und humanen Hepatozyten (Luckert et al., 2015) konnten nachweisen, dass makrozyklische Diester toxischer sind als offenkettige Diester und diese wiederum toxischer als Monoester. In Versuchen mit männlichen Ratten konnten für strukturell unterschiedliche PA und PANO mittlere letale Dosen (engl. *median lethal dose*, LD₅₀) zwischen 50 - 2000 mg/kg Körpergewicht ermittelt werden, wobei sich für makrozyklische Diester die niedrigsten und für N-Oxide die höchsten LD₅₀-Werte ergaben (Stegelmeier et al., 2016). Allgemein werden PA mit hepatotoxischen, genotoxischen, zytotoxischen, kanzerogenen und neurotoxischen Wirkungen in Verbindung gebracht (Tamariz et al., 2018).

Der Toxizität zugrundeliegende physiologische Mechanismen sind anhand von zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien untersucht worden. Die Leber ist als Ort der Bioaktivierung der PA das Hauptzielorgan ihrer akuten und subakuten sowie chronisch toxischen Wirkung. So konnte gezeigt werden, dass die bei oraler Aufnahme von hohen PA-Konzentrationen (mg/kg Körpergewicht) akut auftretende hepatische VOD (auch *hepatic sinusoidal obstruction syndrome*, HSOS) (Altaee, 1998; Chauvin et al., 1994) möglicherweise durch die PA-abhängige Depletion von GSH in sinusoidalen Endothelzellen (DeLeve et al., 1996) bedingt ist. Dies führt durch die Steigerung von oxidativem Stress sowie der Oxidation von Lipiden (Segall et al., 1985) zu morphologischen Veränderungen der Zellen (DeLeve et al., 1999)

und einer daraus resultierenden Verstopfung der Sinusoide und damit mangelhaften Durchblutung der Leber. Die VOD, welche sich durch Symptome wie Übelkeit, vergrößerter Leber und blutigem Durchfall kennzeichnet, kann bei schwerem Krankheitsverlauf tödlich enden (Senzolo et al., 2007). Bei schwangeren Frauen sind bedingt durch die Plazentagängigkeit von PA Fälle von embryonaler VOD dokumentiert (Rasenack et al., 2003).

Auch eine kanzerogene und damit chronische Wirkung von PA konnte in Tier- und Zellkulturversuchen mit humanen Zelllinien gezeigt werden. So induziert die Fütterung von Versuchstieren wie Ratten mit PA (z.B. Riddellin) Tumore unter anderem in Leber, Lunge, Niere und Darm (Chen et al., 2010a). Erklärt wird dies durch die genotoxische Wirkung der PA. So kann die Bildung von DNA-Addukten mit DHP zu Genmutationen führen. Beschrieben sind beispielsweise die Induktion von Punktmutationen im Proto-Onkogen *K-ras* sowie dem Tumorsuppressorgen *p53* (Hong et al., 2003). Weiterhin sind DNA-*Cross-linking*, Brechen von DNA-Strängen oder chromosomale Unregelmäßigkeiten beschrieben (Chen et al., 2010a). Dass PA auch für Tumorerkrankungen beim Menschen verantwortlich sind, konnte bisher nicht zweifelsfrei gezeigt werden, epidemiologische Studien existieren nicht. Jedoch können Fälle von primären Lebertumoren in Zentral- und Südafrika mit der Einnahme von PA-haltigen Pflanzen aus der traditionellen Medizin (Pavlica et al., 1970; Schoental, 1968) in Zusammenhang gebracht werden. Außerdem wird diskutiert, ob eine länger andauernde Exposition und dadurch bedingte Anhäufung von PA-Addukten langfristig zur Entstehung von Tumorerkrankungen beitragen kann (Schoental, 1968).

Zusätzlich wird im Zusammenhang mit PA auch die subakute Entstehung der pulmonalarteriellen Hypertonie (engl. *pulmonary arterial hypertension*, PAH) beschrieben (Huxtable, 1990). Sie wird durch morphologische Veränderungen und daraus resultierenden Gefäßverstopfungen und Erhöhung des Blutdrucks in der Lunge hervorgerufen. In Ratten konnten außerdem embryonale kongenitale Anomalien und damit eine teratogene Wirkung der PA gezeigt werden (Peterson et al., 1980).

Pharmakologisch wertvolle Wirkungen wie eine anti-inflammatorische, anti-mikrobielle, anti-kanzerogene oder anti-retrovirale Wirkung, sowie eine inhibitorische Wirkung auf die Acetylcholinesterase, welche eine besondere Rolle bei der Entstehung neurologischer Erkrankungen spielt, sind für PA ebenfalls beschrieben (Moreira et al., 2018), sollen aber an dieser Stelle nicht weiter thematisiert werden.

2.1.5. PA in Lebensmitteln

PA sind ausschließlich pflanzlichen Ursprungs und können auf verschiedenen Wegen unbeabsichtigt in die Nahrungskette gelangen und folglich zu einer Gesundheitsgefahr für den

Menschen werden. So ist es möglich, dass PA-produzierende Kräuter direkt als Tee, Phytopharmaka oder in Form von Nahrungsergänzungsmitteln verzehrt werden (Mulder et al., 2018). Weiterhin können Lebensmittel entweder direkt, beispielsweise über eine unbeabsichtigte Miternte, mit PA-produzierenden Pflanzen kontaminiert sein oder auch indirekt, über die Sekretion und den Transfer von PA in tierische Produkte wie Milch (Hoogenboom et al., 2011), Eier (Edgar et al., 1999) oder Honig (Beales et al., 2007; Boppré et al., 2005). Im Allgemeinen sind Fälle akuter Toxizität in Folge der oralen Aufnahme einer großen Menge PA (mg Mengen/kg Körpergewicht) selten, oft regional und vornehmlich in Entwicklungs- und Schwellenländern gehäuft dokumentiert. So werden beispielsweise bestimmte PA-produzierende Kräuter in der traditionellen Medizin eingesetzt (Pavlica et al., 1970; Roeder et al., 2011; Steenkamp et al., 2000) oder im Nahen Osten PA-haltige Unkräuter wie Kreuzkräuter (Altaee, 1998; Azadbakht et al., 2010) und Raublattgewächse (Kakar et al., 2010) bei der Weizenernte mitgeerntet. In den Industrienationen, in welchen die Lebensmittelproduktion stark kontrolliert ist, ist der langfristige Verzehr geringer Mengen und damit die Gefahr einer potentiell kanzerogenen Wirkung der PA von besonderer Relevanz.

Studien des BfR und der EFSA konnten PA in verschiedensten alltäglichen Lebensmitteln nachweisen. In allen Studien wurde dabei jeweils ein eingeschränktes Spektrum von 17 bis 28 in Lebensmitteln relevanten 1,2-ungesättigten PA und PANO in die Analyse aufgenommen. So konnte 2007 das PA-produzierende Gemeine Greiskraut (*Senecio vulgaris*) in Saladmischungen nachgewiesen werden (BfR, 2007). Auch in Honig konnten in einer Studie aus dem Jahr 2011 verschiedene PA nachgewiesen werden (BfR, 2011). Für Rohhonig ergab sich dabei über vier Jahre ein Wert von 54,5 µg PA Summengehalt/kg Rohhonig, mit teilweise großen regionalen Unterschieden, für Fertigware hingegen über drei Jahre ein Wert von 21,4 µg PA Summengehalt/kg. Auch getrocknete oder tiefgefrorene Kräuter können hoch mit PA belastet sein. Eine Studie des BfR aus dem Jahr 2019 (BfR, 2019) konnte besonders hohe Summengehalte von PA in Borretsch (*Borago officinalis*, > 50.000 µg/kg), welcher als PA-Produzent gilt, Liebstöckelkraut (*Levisticum officinale*, 1781 µg/kg), Origan (*Origanum vulgare*) und Majoran (*Origanum majorana*) (4038 µg/kg) nachweisen.

Ganz besonders belastet können außerdem Phytopharmaka, Kräutertees und -aufgüsse sowie verschiedene weitere Teesorten wie beispielsweise Schwarz-, Rooibos-, Kamillen-, Fenchel- oder Pfefferminztee sein. Für die Herstellung von Phytopharmaka und Kräuter-aufgüssen werden dabei oft Pflanzen wie Borretsch, Echter Beinwell (*Symphytum officinale*) und Gewöhnlicher Wasserdost (*Eupatorium cannabinum*) verwendet, welche selbst als Produzenten von PA gelten. Folglich können Phytopharmaka besonders stark mit PA belastet sein und hohe Konzentrationen (> 10.000 µg PA-Summengehalt/kg Trocken-

masse) nachgewiesen werden (efsa, 2016). Die Belastung von Schwarz-, Rooibos-, Kamillen-, Fenchel- oder Pfefferminztees ist hingegen auf eine Miternte von PA-produzierenden Unkräutern zurückzuführen, da diese Pflanzen selber keine PA bilden. Die ermittelte Kontamination hängt dabei stark davon ab, in welcher Region der Tee angebaut und geerntet wird und welche PA-produzierenden Unkräuter lokal wachsen. Verschiedene Studien des BfR konnten PA in verschiedenen Teesorten mit teilweise großen Schwankungen zwischen den einzelnen Proben ermitteln (BfR, 2013). Geringe durchschnittliche Werte konnten für Fencheltees (181 µg/kg) und grünen Tees (197 µg/kg) ermittelt werden. Kamillen- und Melissentees hingegen wiesen deutlich höhere Gehalte auf (554 und 763 µg/kg). Eine Studie der EFSA konnte besonders in Rooibos- und Schwarztees hohe Summengenhalte (598,5 und 571,6 µg/kg) und niedrigere Gehalte in Kamillentees (273,8 µg/kg) nachweisen (Mulder et al., 2015).

Auch ZDF WISO berichtete im Jahr 2017 über eine hohe Belastung von Bio-Tees für Kinder⁹. In fünf der insgesamt 17 getesteten Tees wurden PA (12-313 µg/kg Tee) nachgewiesen, einer überstieg den durch die EFSA und das BfR empfohlenen Richtwert, der für Erwachsene langfristig nicht überschritten werden sollte. Außerdem wurden Schwangerschafts- und Stilltees getestet¹⁰. Auch hier wiesen die unabhängigen Labore in zwölf von 28 getesteten (Bio-)Tees PA (13-205 µg/kg Tee) nach. Die Stiftung Warentest berichtete im Jahr 2018 außerdem von hohen PA-Gehalten (73,2 mg/kg Tee) im Kamillentees der Marke KUSMI und warnte vor dem Verzehr des Tees¹¹.

2.1.6. Gesetzgebung und Grenzwerte

Gesetzlich festgelegte Grenzwerte für die Belastung von Lebensmitteln mit PA existieren bisher weder in Deutschland noch in der EU. Eine zukünftige Einführung ist allerdings nicht auszuschließen. Aufgrund der bereits 1988 von der WHO proklamierten Toxizität von PA sowie ihrem Vorkommen in Lebensmitteln und der damit verbundenen potentiellen akuten nichtneoplastischen sowie chronischen genotoxischen und kanzerogenen Wirkung, haben das BfR sowie die EFSA Empfehlungen für den Verzehr von mit 1,2-ungesättigten PA kontaminierten Lebensmittel herausgegeben. Die Bewertung des gesundheitlichen Risikos für

⁹ <https://www.zdf.de/verbraucher/wiso/krebserregende-stoffe-in-bio-babytee-100.html> (aufgerufen am 02.10.2019)

¹⁰ <https://www.zdf.de/verbraucher/wiso/krebserregende-stoffe-in-schwangerschafts-und-stilltees-100.html> (aufgerufen am 02.10.2019)

¹¹ <https://www.test.de/Kamillentees-von-Kusmi-Extrem-mit-Schadstoffen-belastet-5126437-0/> (aufgerufen am 02.10.2019)

den Verbraucher wurde zuletzt durch die EFSA im Jahr 2017 (efsa, 2017) und darauf basierend durch das BfR im Jahr 2018 (BfR, 2018) aktualisiert. So werden akute toxische Effekte bei einem kurzfristigen Verzehr beispielsweise von PA-kontaminierte Nahrungsergänzungsmitteln von 1-3 mg/kg Körpergewicht erwartet. Für die Bewertung langfristiger nichtneoplastischer Wirkungen wird häufig der *Health based guidance value* (HBGV¹²) bestimmt. Dieser wurde durch die EFSA und das BfR auf Grundlage der Entstehung von Leberschädigungen in Fütterungsversuchen mit Ratten und dem PA Riddellin sowie unter Berücksichtigung eines Sicherheitsfaktors von 100 für 1,2-ungesättigte PA bestimmt und liegt bei einem Wert von täglich 0,1 µg/kg Körpergewicht. Eine Differenzierung zwischen verschiedenen 1,2-ungesättigten PA erfolgt dabei nicht. Für die Bewertung des langfristigen Risikos chronischer Erkrankungen wird üblicherweise das BMDL₁₀ verwendet. Dieses wurde auf Grundlage der Daten aus einer Tierversuchsstudie mit Ratten und dem PA Riddellin bei täglicher Aufnahme auf einen Wert von 237 µg/kg Körpergewicht festgelegt und für die Berechnung des MOE-Werts verwendet. Ein MOE-Wert von ≥ 10.000 wird allgemein als gesundheitlich unbedenklich angesehen und benötigt keine Maßnahmen zur Expositionsreduktion. Der Quotient aus BMDL₁₀ und MOE ergibt dabei die tägliche Dosis, welche in Bezug auf das kanzerogene Risiko noch als unbedenklich gilt. Sie liegt bei täglicher Aufnahme aktuell bei einem Wert von 23,7 ng/kg Körpergewicht. Die EFSA und das BfR kommen zu dem Schluss, dass eine Exposition mit einem MOE-Wert von < 10.000 und folglich eine potentielle gesundheitliche Gefahr für den Verbraucher unter bestimmten Voraussetzungen gegeben ist. So besteht die Möglichkeit, dass der Verzehr geringer Mengen von PA über einen längeren Zeitraum erfolgt. Kinder sind aufgrund ihres geringen Körpergewichts in diesem Zusammenhang besonders gefährdet. Hier kann beispielsweise der Verzehr großer Mengen kontaminierten Honigs eine potentielle Gesundheitsgefahr darstellen. Gleiches gilt aufgrund der Plazenta- und Milchgängigkeit von PA für Schwangere und Stillende, die regelmäßig größere Mengen von kontaminierten (Kräuter-)Tees trinken. Zusätzlich können verschiedene PA-kontaminierte Lebensmittel gleichzeitig verzehrt werden. Es wird daher derzeit empfohlen, den Verzehr kontaminierter Lebensmittel durch geeignete Maßnahmen auf ein erreichbares und sinnvolles Minimum zu reduzieren (ALARA-Prinzip: *as low as reasonably achievable*). Auf den Verzehr von pflanzlichen Lebensmitteln, welche durch die Eigenproduktion von PA entsprechend hoch belastet sind, sollte entweder, wie für Nahrungsergänzungsmittel (mit Ausnahme von Öl-basierten Nahrungsergänzungsmitteln)

¹² HBGV berechnet sich aus dem *Non observed adverse effect level* (NOAEL) aus Tierversuchsstudien und einem festgelegten Extrapolationsfaktor (BfR, 2019).

empfohlen, vollständig verzichtet oder die Verzehrmenge, wie beispielsweise für PA-haltige Kräuter, auf ein Minimum reduziert werden.

Auch die Lebensmittelindustrie ist angehalten durch entsprechende Maßnahmen bei der Produktion von potentiell PA-haltigen Lebensmitteln sowie einer Überwachung ihrer Waren mit einer geeigneten Analytik für eine Reduktion der PA-Kontaminationen Sorge zu tragen.

2.2. Analytik von PA

Voraussetzung für eine genaue Überwachung und Untersuchung von Lebensmitteln in Hinblick auf eine potentielle Kontamination mit PA sind geeignete chemische oder physikochemische Analysemethoden. Im Folgenden sind bereits etablierte Methoden in der PA- und PANO-Analytik in Anlehnung an einen Review-Artikel von Colin Crews (Crews, 2013) und einen Bericht der EFSA (efsa, 2011) zusammenfassend vorgestellt.

2.2.1. Extraktion und Aufarbeitung von PA und PANO

Grundlegende Voraussetzung für die instrumentelle qualitative und quantitative Analytik von PA und PANO ist ihre Extraktion sowie Aufarbeitung und Aufreinigung aus pflanzlichem Material und Bienenprodukten. Vor einer Extraktion müssen die Proben durch Vermischung und Mahlen homogenisiert werden. Im Kontext pflanzlicher Proben setzt die quantitative Analyse der PA außerdem eine vorherige Trocknung bei Raumtemperatur (RT), unter Vakuum, durch Gefriertrocknung oder Erhitzen voraus. Bei letzterer Methode ist jedoch bisher unklar, ob der PA-Gehalt und die Zusammensetzung durch die Behandlung der Probe mit Hitze beeinflusst werden. (Crews et al., 2010)

Aufgrund ihrer unterschiedlichen polaren Eigenschaften werden in Abhängigkeit vom eingesetzten Extraktionsmittel PA oder/und PANO extrahiert. Die Extraktion von PA ist besonders häufig durch den Einsatz von semipolaren bis polaren organischen Lösungsmitteln, wie MeOH (Mroczek et al., 2006), Chloroform (Gray et al., 2004) und MeOH/Chloroform (Jorgelina C. A. Wuilloud, 2004) oder angesäuerten wässrigen Lösungsmitteln (Lebada et al., 2000), beschrieben. PANO hingegen lassen sich mit Hilfe von polaren organischen Lösungsmitteln und verdünnten wässrigen Säuren, wie Schwefelsäure (Bodi et al., 2014; Kaltner et al., 2018; Witte et al., 1992a), oder mit angesäuerten Mischungen aus Wasser und MeOH (Altamirano et al., 2005) extrahieren.

Wurde das pflanzliche Material nicht bereits vor der eigentlichen Extraktion über unpolare Extraktionsmittel von störenden unpolaren Verbindungen wie Fetten, Wachsen oder Terpenen aufgereinigt, erfolgt nach der Extraktion häufig eine Festphasenextraktion (engl. *solid-phase extraction*, SPE) und damit eine Aufreinigung von koextrahierten Substanzen. Hierfür

kommen häufig gängige C18- (Chung et al., 2018; Schulz et al., 2015), Ergosil- (Gray et al., 2004) oder anionische (engl. *strong cation exchange*, SCX) (Gottschalk et al., 2018; Kaltner et al., 2018) SPE-Kartuschen zum Einsatz. Letztere erlauben die simultane Aufreinigung von PA und PANO aus pflanzlichen Rohextrakten. Bei Verwendung von C18-SPE-Kartuschen ist für eine analytische Erfassung der PANO eine vorgeschaltete Reduktion der PANO zu PA mit Hilfe von Zinkstaub notwendig (Mathon et al., 2014; Oplatowska et al., 2014).

2.2.2. Spektrophotometrie

Der rein spektrophotometrische Nachweis von PA erfolgt in Lösung. Dabei wird die Summe aller 1,2-ungesättigten PA und PANO in einer Probe ermittelt. Die Differenzierung verschiedener PA und PANO ist nicht möglich. Eine Quantifizierung kann über eine externe Kalibrierung mit PA-Standards erfolgen.

Für die spezifische Detektion von PA und PANO (keine Otonecin-basierten PA) auch in pflanzlichen Matrices ist das sogenannte Ehrlich-Reagenz beschrieben (Mattocks, 1968; Mattocks et al., 1987). Es besteht aus 4-(N,N-Dimethylamino)benzaldehyd in 20%iger Salzsäure-Lösung. Das tertiäre Amin wird dabei zunächst zum N-Oxid oxidiert und zum Pyrrol dehydriert. Das Pyrrol reagiert anschließend mit dem Dimethylaminobenzaldehyd zu einem magentafarbigem und bei 563 nm absorbierendem Molekül. Die Sensitivität des Assays liegt durchschnittlich bei etwa 1-25 µg/ml. Weiterhin ist ein relativ unspezifischer Nachweis von PA mit dem Azofarbstoff Methylorange beschrieben. Nach einer stöchiometrischen Reaktion protonierter PA mit dem Farbstoff in organischem Lösungsmittel, wird dieser durch Ansäuerung der Lösung aus dem Komplex entlassen und kann bei 525 nm photometrisch bestimmt werden. Die Sensitivität des semiquantitativen Assays liegt im Bereich von 2-15 µg/ml und damit ähnlich, wie bei der Verwendung des Ehrlich-Reagenz. (Birecka et al., 1981)

2.2.3. Chromatographische Methoden

Im Vergleich zum spektrophotometrischen Nachweis von PA in Lösung wird bei der Dünnschichtchromatographie (engl. *thin layer chromatography*, TLC) ein Gemisch aus PA und PANO zunächst vertikal aufgetrennt und schließlich durch Anfärbung visualisiert. Dabei ist die Verwendung von Kieselgel als stationäre Phase und die chromatographische Auftrennung mittels basischen oder sauren mobilen Phasen aus Chloroform und Alkoholen (Hovermale et al., 2002; Mattocks, 1967) beschrieben.

Die Visualisierung der 1,2-ungesättigten PA und PANO (keine Otonecin-basierten PA) kann mit Hilfe des bereits vorgestellten Ehrlich-Reagenz erfolgen. Eine weitere deutlich unspezifischere allgemeine Färbemethode für Alkaloide und tertiäre Amine ist die Verwendung des

Dragendorff-Reagenz (Hovermale et al., 2002). Das Reagenz bildet einen Kalium-Tetraiodobismutat-Komplex und nach Protonierung der aliphatischen basischen Amine ein nicht lösliches orangerotes Ionenpaar aus $[\text{BiI}_4]^-$ und $[\text{HNR}_3]^+$ (Madea et al., 2003). Durch Messung einer Kalibrierung mit einem Referenzstandard kann eine Quantifizierung erfolgen und ermöglicht so eine schnelle Detektion von etwa 1 μg PA (Crews, 2013).

Hochsensitive Methoden, welche PA und PANO im Spurenbereich nachweisen können, basieren aktuell auf Gas- oder Flüssigchromatographie (GC, engl. *gas chromatography*, LC, engl. *liquid chromatography*, HPLC, engl. *high performance liquid chromatography*). Sie werden derzeit als Standardmethoden für die PA-Analytik in diversen Matrices eingesetzt. Da PA und PANO nur unspezifisch UV-aktiv sind (Absorptionsmaximum λ_{max} für PA etwa 215 nm (Sangster et al., 1965)), werden GC, LC oder HPLC häufig mit massenspektrometrischen Detektoren (GC-MS oder LC- beziehungsweise HPLC-MS(/MS)) gekoppelt. Die GC-gestützte Analyse ermöglicht dabei keine direkte Analyse der nicht flüchtigen PANO (Crews, 2013) und erfordert für die Einzelanalytmethode eine prächromatographische Reduktion der PANO zur tertiären Base unter Verwendung von Zinkstaub. Die Summenmethode setzt die Lithiumaluminiumhydrid (LiAlH_4)-basierte Reduktion zu den entsprechenden PA-Grundkörper-Äquivalenten und deren Derivatisierung, beispielsweise mit Trimethylsilan (TMS), voraus (Kempf et al., 2008). Für eine anschließende chromatographische Auftrennung der PA kommen vielfältige unpolare (Kowalczyk et al., 2018; Witte et al., 1992b) stationäre Phasen zum Einsatz. Für die MS-basierte Detektion werden häufig die Elektronenstoßionisation (engl. *electron ionization*, EI) oder auch die chemische Ionisation (engl. *chemical ionization*, CI) eingesetzt. EI-MS ermöglicht die Analyse von PA aufgrund ihrer Fragmentierungsmuster und damit der Massen ihrer Tochterionen. Als sanftere Ionisierungsmethode ermöglicht die CI-MS die Massenanalyse des Mutterions (Crews, 2013). Für die GC-MS-basierte Analytik von PA ist für Heliotridin- und Retronecinäquivalente ein LOD von 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ verschiedener Lebensmittel (Kempf et al., 2011) oder auch für Lycopsamin-Typ-PA ein LOD von 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Borretschöl (Wretensjö et al., 2003) veröffentlicht.

Die LC-gestützte Analyse ermöglicht die zeitgleiche Detektion von PA und PANO ohne vorherige Reduktion von PANO zur korrespondierenden tertiären Base. Somit ist die Probenvorbereitung von geringerer Komplexität. Für die HPLC und die eine deutlich höhere Auflösung beziehungsweise Trennleistung bietende UHPLC (engl. *ultra high performance liquid chromatography*) werden hauptsächlich unpolare stationäre Phasen wie C18-basierte Materialien (Kaltner et al., 2018; Zhou et al., 2010) verwendet. Die Ionisierung für die hochsensitive Massenanalyse erfolgt überwiegend mit Elektrosprayionisierung (engl. *electrospray ionization*, ESI), seltener durch eine chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck (engl.

atmospheric pressure chemical ionization, APCI) (Crews, 2013). Da es sich bei vielen PA und PANO um Stereoisomere mit identischen Massen und Strukturformeln handelt, ist im Kontext der PA-Analytik vor allem die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) unter Verwendung der CID (engl. *collision-induced dissociation*) von Bedeutung. Sie erzeugt für die PA- und PANO-Grundkörper Retronecin und Heliotridin (m/z 94, 120, 138 und 94, 118, 136) sowie Otonecin (m/z 122, 150, 168) charakteristische Fragmentierungsmuster und ermöglicht ihre hochsensitive qualitative und quantitative Analyse (efsa, 2011). Veröffentlichte LC-MS(/MS)-Methoden weisen mit LOD-Werten im unteren einstelligen $\mu\text{g}/\text{kg}$ -Bereich eine im Vergleich zur GC-MS-basierten Analytik höhere Sensitivität auf. So ist für zwölf PA eine auf einer hochsensitiven Massenspektrometrie (engl. *high resolution mass spectrometry*, HRMS) basierende Methode mit einem LOD von 0,2 - 0,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Wang et al., 2019) und für weitere sechs PA eine Methode mit einem LOD von 0,1 - 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Honig veröffentlicht (Valese et al., 2016).

Probleme sowohl für die GC- als auch LC-MS(/MS) gestützte Analytik und im Speziellen die Spurenanalytik, stellen die teilweise geringe Verfügbarkeit und der hohe Preis von PA- oder PANO-Referenzstandards sowie von isotopenmarkierten Standards (efsa, 2011) dar. Diese sind für eine externe oder interne Kalibrierung jedoch zwingend erforderlich. Folglich ist bisher nicht für alle PA und PANO eine hochsensitive quantitative Analyse möglich.

2.2.4. Kernspinresonanz-Spektroskopie

Kernspinresonanz (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR) wird im Kontext der Analyse von zuvor aufgereinigten PA hauptsächlich für ihre Strukturaufklärung sowie ihren qualitativen Nachweis verwendet. Es existieren sowohl Datenbanken mit ^1H -NMR-Spektren (Logie et al., 1994; Segall et al., 1983; Villanueva-Cañongo et al., 2014) als auch ^{13}C -NMR-Spektren (Jones et al., 1982; Molyneux et al., 1982; Roeder, 1990) für viele PA und einige wenige PANO. Die ^1H -NMR-Spektroskopie bietet dabei aufgrund der höheren Isotopenhäufigkeit (natürliche Häufigkeiten: ^1H 99,98%, ^{13}C 1,11%, (Wächter, 2012)) gegenüber der ^{13}C -NMR-Spektroskopie einige Vorteile: So ist die Messdauer bei ^1H -NMR deutlich kürzer und auch die benötigte Probenmenge ist im Vergleich zur ^{13}C -NMR geringer. Die ^{13}C -NMR liefert im Gegensatz dazu mehr strukturelle Informationen. (Crews, 2013)

Ansätze für einen ^1H -NMR-basierten quantitativen Nachweis von 1,2-ungesättigten PA in pflanzlichen Extrakten mit jedoch geringer Sensitivität (Proben enthielten einige Milligramm PA) sind ebenfalls beschrieben (Molyneux et al., 1979; Pieters et al., 1985). Der Einsatz von NMR für den hochsensitiven qualitativen und quantitativen Nachweis von PA in komplexen pflanzlichen Extrakten setzt zukünftig die Verfügbarkeit verbesserter Hochfeld-NMR-Technologie voraus (efsa, 2011).

2.2.5. Immunoassays für die Detektion von PA

Antikörper-basierte Immunoassays bieten im Vergleich zu gängigen analytischen Methoden verschiedene Vorteile. So zeichnen sie sich durch eine schnelle, selektive und sensitive Detektion verschiedener Analyten in komplexen Matrices aus. Außerdem können große Probenanzahlen parallel analysiert werden. Eine aufwändige Probenaufbereitung ist in den meisten Fällen nicht nötig.

Die Generierung von Antikörpern gegen verschiedene PA und die anschließende Verwendung für die Entwicklung von Detektions- oder Anreicherungsmethoden in diversen Matrices (beispielsweise Honig, Grassilage, Heu, Weizen, Luzerne, Sojabohnen, PA-produzierende Pflanzen, Tierfutter oder Blut) ist bisher nur in einigen wenigen Arbeiten beschrieben. Dabei lassen sich zwei grundsätzliche Ansätze unterscheiden: die Generierung polyklonaler Seren oder polyklonaler Antikörper (pAk) und damit die Verwendung eines Antikörpergemisches für die Detektion des Zielanalyten sowie die Generierung von mAk (Köhler et al., 1975) und folglich die Verwendung eines einzelnen, gegen ein bestimmtes Epitop gerichteten Antikörpers.

Verwendung polyklonaler Seren

Die Mehrzahl der Veröffentlichungen beschreibt die Verwendung polyklonaler Seren für die Immunoassay-basierte Detektion von PA. Dabei wurden zunächst geeignete Immunogene synthetisiert und für die Immunisierung von Versuchstieren (bspw. Kaninchen, Schafe oder Mäuse) verwendet. Die gewonnenen Seren wurden anschließend ohne weitere Selektion der PA-spezifischen Antikörper (teilweise nach Isolation der Immunglobulin G-Fraktion) in erforderlicher Verdünnung für die Entwicklung der Immunoassays eingesetzt. Dabei kamen verschiedenste Immunogene zum Einsatz.

So sind einige Arbeiten publiziert, die über den Einsatz von Retronecin-basierten Protein-konjugaten für die Immunisierung von Versuchstieren berichten (Bober et al., 1989; Roseman et al., 1996; Roseman et al., 1992). Weiterhin wurden Protein-Konjugate verwendet, welche einfach oder zweifach veresterte, auch makrozyklische, Retronecin- und Heliotridin-basierte PA wie Retrorsin (Langer et al., 1996; Oplatowska et al., 2014; Roeder et al., 1995; Roseman et al., 1996), Heliotrin (Oplatowska et al., 2014; Than et al., 2005), Riddelliin und dessen N-Oxid (Lee et al., 2001), Monocrotalin (Roseman et al., 1996), Senecionin und Integerrimin (Oplatowska et al., 2014) sowie Echimidin und Anacrotin (Than et al., 2005) auf ihrer Oberfläche präsentierten. Die mit Hilfe der Seren etablierten Immunoassays zeigten teilweise hohe Sensitivitäten gegenüber dem bei der Immunisierung verwendeten PA. So konnten IC_{50} -Werte von < 1 ng/ml PA erreicht werden (Oplatowska et al., 2014). Alle

Seren zeigten zudem auch KR mit verschiedenen strukturell verwandten PA. Jedoch erfolgte keine umfassende und systematische Charakterisierung der Selektivitäten der Antikörper.

Verwendung monoklonaler Antikörper

Die Generierung von mAk für die Detektion von PA ist nur in zwei Arbeiten beschrieben. So berichten Zündorf et al. über die Immunisierung von Mäusen unter Verwendung eines Retrorsin-BSA-Konjugats und ein anschließendes Screening von ZKÜ nach geeigneten Zellklonen für die Produktion von mAk. Für Retrorsin ergab sich dabei im etablierten Immunoassay ein IC_{50} -Wert von 210 ng/ml. Weiterhin wurden KR für verschiedene veresterte PA ermittelt. Für den Grundkörper Retronecin konnte keine KR bestimmt werden (Zündorf et al., 1997).

Sakamoto et al. hingegen verwendeten den Grundkörper Retronecin für die Immunogen-synthese und generierten einen für das makrozyklische Retronecin-basierte PA Monocrotalin spezifischen mAk (LOD 48,8 pg/ml) (Sakamoto et al., 2017). Im Vergleich dazu zeigte der mAk4B8 nur eine 0,11%ige KR gegenüber dem für die Immunisierung verwendeten Grundkörper Retronecin.

2.3. Immunoassays und Antikörper

2.3.1. Immunoassays

Unter dem Begriff Immunoassays werden verschiedene bioanalytische Methoden zusammengefasst, deren Messprinzip auf der spezifischen Interaktion des Paratops eines Antikörpers mit dem Epitop eines Antigens und somit auf der Entstehung eines Immunkomplexes beruht. Die Bildung des Immunkomplexes kann hierbei direkt durch Messung von Trübung oder Lichtstreuung quantifiziert werden. Eine weitere Möglichkeit ist die indirekte Quantifizierung durch eine zusätzliche Markierung mit radioaktiven, fluoreszierenden und lumineszierenden Substanzen oder auch Chromogen-umsetzenden Enzymen und folglich die Messung einer radioaktiven Strahlung oder Lichtstrahlung. (Gressner et al., 2019)

Grundsätzlich wird zwischen homogenen und heterogenen Immunoassays unterschieden. Die homogenen Immunoassays finden in einer homogenen flüssigen Phase statt und erfordern keine physikalische Trennung der gebundenen und ungebundenen Antikörper oder Analyten. Beispiele für homogene Immunoassays sind die *Enzyme-multiplied Immunoassay Technique* (EMIT) (Rubenstein et al., 1972) oder der Fluoreszenzpolarisations-Immunoassay (FPIA). Der deutlich sensitivere und daher häufiger eingesetzte heterogene Immunoassay hingegen findet an einer Festphase, häufig einer Mikrotiterplatte (MTP) (Clark et

al., 1977) aus Polystyrol, statt und ermöglicht so die Abtrennung ungebundener Analyten und Antikörper anhand der Durchführung von Waschschriffen. Ein Beispiel für einen heterogenen Immunoassay ist der bereits 1960 veröffentlichte hochsensitive Radioimmunoassay (RIA) (Yalow et al., 1960), dessen Messprinzip auf der Detektion eines radioaktiv markierten Analyten beruht. Aufgrund der radioaktiven Strahlenbelastung und aufwendigen Handhabung kommen heutzutage jedoch überwiegend der ebenfalls heterogene Enzymimmunoassay (engl. *enzyme immunoassay*, EIA) (Van Weemen et al., 1971) und der ELISA (Engvall et al., 1971) zum Einsatz. Diese Assays unterscheiden sich gegenüber ihren Vorgängern durch das Detektionsprinzip der Interaktion zwischen Antikörper und Antigen. Hierfür wird ein immunologisches Konjugat bestehend aus einem sekundären Antikörper und einem Enzym verwendet, um die Bildung des Immunkomplexes durch eine Enzym-Substrat-Reaktion zu detektieren (Gressner et al., 2019).

2.3.2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Speziell der ELISA hat in der Analytik einen besonderen Stellenwert und wird aufgrund seiner hohen Spezifität und Sensitivität für die qualitative und quantitative Detektion verschiedenster Analyten (Makromoleküle und Haptene, s. Abschnitt 2.3.4), auch in komplexen Matrices, eingesetzt. Angewendet wird er vor allem in medizinischen Laboren und in der pharmazeutischen Industrie für die Entwicklung diagnostischer Produkte sowie in Aufsichtsbehörden für die Qualitätsüberprüfungen (Lequin, 2005). Bei Verfügbarkeit hochspezifischer Antikörper oder Antikörperfragmente stellt er eine hochsensitive (unterer pg/ml-Bereich) (Engelberts et al., 1991; Helle et al., 1991; Kim et al., 2000; Sakamoto et al., 2017), kostengünstige und einfache Alternative zu gängigen Methoden wie der LC-MS dar (Findlay et al., 2000).

Für die Herstellung immunologischer Konjugate häufig verwendete Enzyme sind die alkalische Phosphatase (Engvall et al., 1972; Nilson et al., 1988), die Glukoseoxidase (Arakawa et al., 1985; Gyss et al., 1987; Yoshitake et al., 1979) und besonders häufig die Meerrettichperoxidase (HRP, engl. *horseradish peroxidase*) (Imagawa et al., 1983; Porstmann et al., 1981; Van Weemen et al., 1971). Die Häm-enthaltende Peroxidase katalysiert die Oxidation des Substrats 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) (Josephy et al., 1982). Dabei wird das chromogene Molekül in Anwesenheit von H₂O₂ zu einem instabilen blauen *Charge-Transfer* Komplex mit einem Absorptionsmaximum von 650 nm oxidiert. Nach Zugabe einer verdünnten Schwefelsäurelösung erfolgt eine finale Oxidation zu einem stabilen gelben Diimin mit einem Absorptionsmaximum von 450 nm. Die Entstehung dieses gelben Reaktionsprodukts kann mit Hilfe eines Spektralphotometers detektiert werden.

Der funktionelle Aufbau eines ELISAs lässt sich anhand verschiedener Kriterien variieren. So lassen sich ELISAs in direkte und indirekte Assays unterteilen. Bei einem direkten ELISA ist der spezifische Antikörper oder auch das Antigen selbst mit einem Enzym markiert. Sie sind in der Durchführung schneller, setzen aber die zeitlich und finanziell aufwendige Modifikation des Primärantikörpers voraus. Bei einem indirekten ELISA hingegen wird für die Detektion der Interaktion zwischen dem Antikörper und seinem Antigen ein Enzym-markierter sekundärer Spezies-spezifischer Antikörper eingesetzt, der beispielsweise gegen den Fc-Teil (engl. *fragment crystallizable*, s. Abschnitt 2.3.3) des sogenannten Detektions- oder Primärantikörpers gerichtet ist. Durch mehrfache Markierung des sekundären Antikörpers kann eine Signalverstärkung erreicht werden.

Zusätzlich kann zwischen Antigen- und Antikörper-*capture* Formaten unterschieden werden. Bei einem Antigen-*capture* ELISA ist der Antikörper, bei einem Antikörper-*capture* ELISA hingegen das Antigen beziehungsweise das an einen Proteinträger kovalent gebundene Hapten als *coating*-Antigen auf der Oberfläche der MTP immobilisiert. Beispiel für einen Antigen-*capture* ELISA ist der *Sandwich*-ELISA, welcher einen „Fänger-Antikörper“ (engl. *capture antibody*) für die Immobilisierung des Antigens auf der MTP verwendet. Ein zweiter Antikörper mit gegenüber dem Antigen unterschiedlicher Epitopspezifität, auch Detektionsantikörper (engl. *detection antibody*) genannt, wird entweder direkt mit einem Enzym konjugiert eingesetzt oder die Bindung des Detektionsantikörpers an das immobilisierte Antigen über einen zusätzlichen markierten sekundären Antikörper messbar gemacht. Dabei nimmt die gemessene Intensität der Farbentwicklung mit zunehmender Antigenkonzentration in der Probe zu. Der *Sandwich*-ELISA wird häufig für die Quantifizierung von Antigenen verwendet, welche nur in geringen Konzentrationen in sehr komplexen Proben enthalten sind, da über die spezifische Interaktion zwischen Fänger-Antikörper und Antigen eine Konzentration des Antigens an der Oberfläche der MTP erfolgt. Weiterhin findet er häufig bei großen Analyten welche mehrere Epitope aufweisen Anwendung und ist für die Detektion von Haptene ungeeignet.

ELISAs können außerdem in einem kompetitiven und nicht kompetitiven Format durchgeführt werden. Bei einem kompetitiven ELISA konkurrieren gelöstes und immobilisiertes Antigen gleichermaßen um die Bindungsplätze der in einer bestimmten Konzentration eingesetzten spezifischen gelösten Antikörper oder gelöste, in bestimmter Konzentration eingesetzte markierte und nicht markierte Antigene, um Bindungsplätze der immobilisierten Antikörper. Das gemessene Signal beziehungsweise die Farbintensität verhält sich dabei invers zur Antigenkonzentration. Umgekehrt verhält es sich bei einem nicht kompetitiven ELISA, der im Allgemeinen eine höhere Sensitivität aufweist.

Für einige Problemstellungen haben sich bestimmte Konzeptionen des ELISAs als besonders geeignet erwiesen. So wird der indirekt nicht kompetitive ELISA (s. Abbildung 6) häufig für die Quantifizierung von Antikörpern, der sogenannten Titerbestimmung, oder auch für die Charakterisierung der Antigen- und Epitopspezifität eines Antikörpers eingesetzt. Der spezifische Antikörper bindet dabei an das als *coating*-Antigen auf einer MTP immobilisierte Antigen oder kovalent an einen Proteinträger gebundene Hapten. Das Bindungsereignis wird über einen Enzym-markierten sekundären Antikörper, welcher eine chromogene Substratumsetzung katalysiert, detektiert. Die messbare Farbintensität nimmt dabei mit zunehmender Antikörperkonzentration in der Probenlösung zu.

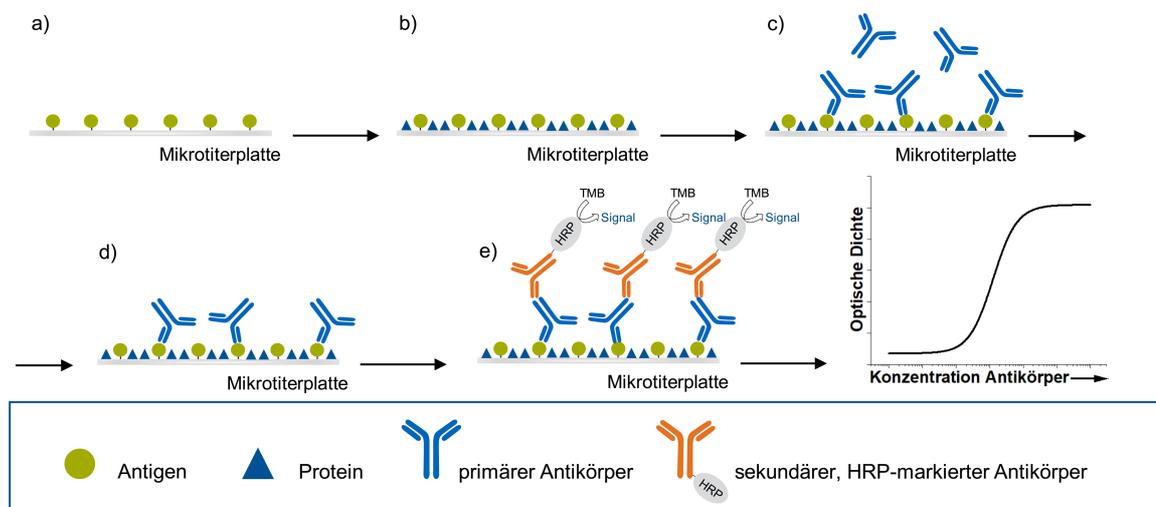


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines indirekt nicht kompetitiven ELISAs - Immobilisierung eines Antigens auf einer MTP (a); nach einem Waschschrift erfolgt die Absättigung unbesetzter Bindungsstellen der MTP mit einem globulären Protein (z.B. BSA oder Casein) (b); nach einem weiteren Waschschrift wird mit der Antikörper-enthaltenden Probe inkubiert, die Antikörper binden spezifisch an die immobilisierten Antigene (c); es folgt ein weiterer Waschschrift, welcher alle ungebundenen Antikörper entfernt (d) und schließlich die Signalentwicklung durch Inkubation mit einem HRP-markierten sekundären Antikörper und weiterhin die Zugabe des Enzym-spezifischen Substrats (z.B. TMB/H₂O₂) (e); das gemessene Signal steigt in Abhängigkeit der Antikörperkonzentration an.

Der indirekt kompetitive ELISA (s. Abbildung 7) hingegen wird häufig für die Quantifizierung von kleinen und nur aus einem Epitop bestehenden Antigenen sowie zur Untersuchung von KR eingesetzt. Dabei wird zunächst das Antigen oder das an Proteinträger gekoppelte Hapten als *coating*-Antigen auf der MTP immobilisiert. Nach Zugabe der Probenlösung, welche ebenfalls das gelöste und zu quantifizierende Antigen/Hapten enthält, wird die Antikörperlösung zugegeben. Immobilisiertes und gelöstes Antigen/Hapten stehen folglich in Konkurrenz um die limitierte Paratopanzahl der gelösten Antigen- oder Hapten-spezifischen Antikörper. Die Detektion des Bindungsereignisses erfolgt ebenfalls über einen Enzym-markierten sekundären Antikörper. Die messbare Farbintensität sinkt dabei mit zunehmender Antigen- oder Haptenkonzentration in der Probenlösung.

Theoretischer Hintergrund

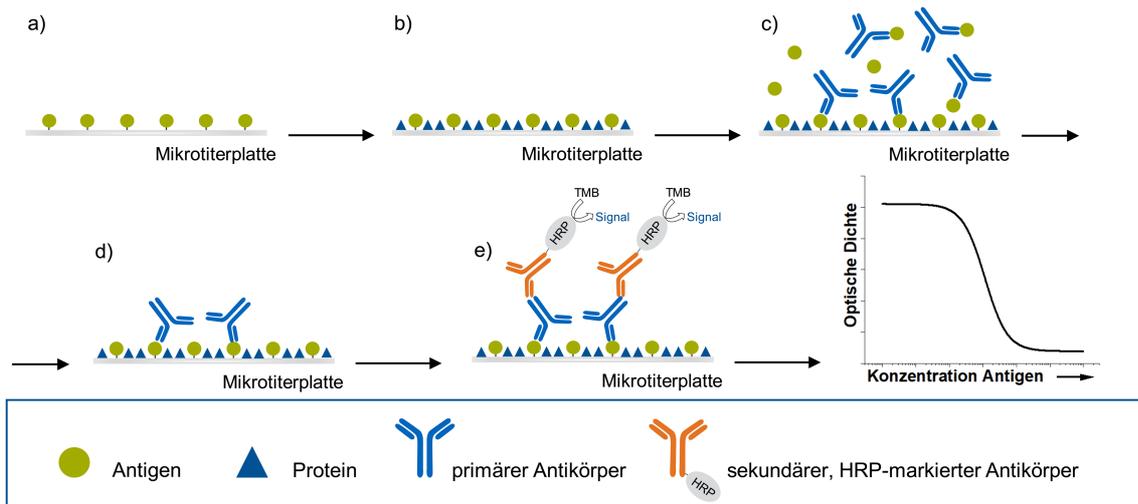


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines indirekt kompetitiven ELISAs - Immobilisierung eines Antigenes auf einer MTP (a); nach einem Waschschriff erfolgt die Absättigung unbesetzter Bindungsstellen der MTP mit einem globulären Protein (z.B. BSA oder Casein) (b); nach einem weiteren Waschschriff wird mit einer Antikörperlösung sowie der Antigen-enthaltenen Probe inkubiert, die Antikörper binden spezifisch und konzentrationsabhängig an die immobilisierten oder sich in Lösung befindlichen Antigene (c); es folgt ein weiterer Waschschriff, der alle ungebundenen Antikörper sowie Antigene entfernt (d) und schließlich die Signalentwicklung durch Inkubation mit einem HRP-markierten sekundären Antikörper und weiterhin der Zugabe des Enzym-spezifischen Substrats (z.B. TMB/H₂O₂) (e); das gemessene Signal sinkt in Abhängigkeit der steigenden Antigenkonzentration in der Probe.

Auswertung von Immunoassays

Immunoassays gehören zu den sogenannten Ligandenbindungstests (engl. *ligand binding assay*, LBA), welche sich durch einen nicht linearen sigmoidalen Zusammenhang zwischen Analytkonzentration und gemessenem Signal beziehungsweise gemessener Absorption auszeichnen (Findlay et al., 2007). Durch halblogarithmische Darstellung der Analytkonzentration und Interpolation der Daten mit Hilfe des vierparametrischen logistischen Modells (engl. *4-parameter logistic model*) (Berkson, 1944), lässt sich abhängig vom Aufbau des Assays der direkte oder inverse Zusammenhang zwischen gemessenem Signal und der Konzentration des Analyten darstellen. Für die Quantifizierung einer unbekannt Probe muss die Messung verschiedener Konzentrationen und die Erstellung einer Kalibrierkurve erfolgen. Diese lässt sich mit Formel 1 beschreiben.

Der Testmittelpunkt X_0 wird auch als IC₅₀-Wert (engl. *inhibitory concentration*) bezeichnet und repräsentiert abhängig vom Aufbau des Assays die Analytkonzentration entweder bei halbmaximalem gemessenem Signal (nicht kompetitives Format) oder bei einer Reduktion des Signals um 50% (kompetitives Format) (Findlay et al., 2000).

$$Y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{X}{X_0}\right)^p} \quad (1)$$

A_1 = maximale Absorption (obere Asymptote) A_2 = minimale Absorption (untere Asymptote)

X = Analytkonzentration

X_0 = Konzentration des Analyten am Testmittelpunkt

Y = Absorption

p = Steigung am Testmittelpunkt

Erfolgt die Auflösung der Gleichung nach X , ist die Bestimmung der Analytkonzentration möglich.

$$X = \left(\sqrt[p]{\frac{A_1 - A_2}{Y - A_2}} - 1 \right) \cdot X_0 \quad (2)$$

Eine Quantifizierung erfolgt ausschließlich über den linearen Bereich der sigmoidalen Kurve. Dieser lineare Arbeitsbereich wird im Kontext von Immunoassays häufig als Analytkonzentration zwischen IC_{20} und IC_{80} definiert (Fojtiková et al., 2017; Hübner et al., 2015; Vial et al., 2017). Das Detektionslimit oder die Nachweisgrenze (LOD) und das Quantifizierungslimit oder die Bestimmungsgrenze (engl. *limit of quantification*, LOQ) (MacDougall et al., 1980) definieren sich bei üblicher Dreifachbestimmung ($m=3$) wie folgt:

$$LOD = \bar{x}_0 - 3 \cdot s_0 \quad (3)$$

$$LOQ = \bar{x}_0 - 10 \cdot s_0 \quad (4)$$

\bar{x}_0 = Blindwert

s_0 = Standardabweichung

2.3.3. Antikörper

Für den Einsatz von Immunoassays oder ELISAs in der quantitativen Analytik ist die Verfügbarkeit von hoch spezifischen Antikörpern zwingende Voraussetzung.

Antikörper, auch Immunglobuline genannt, sind lösliche Glykoproteine und werden in Vertebraten als Teil der humoralen Immunantwort und adaptiven Immunreaktion nach Kontakt mit einer dem Organismus fremden Struktur, dem Immunogen, von B-Lymphozyten gebildet und sekretiert. Ihre Aufgabe besteht darin, Antigene zu binden und sie schließlich über Rekrutierung von Effektormolekülen und -zellen des Immunsystems und folglich Aktivierung der Neutralisierung, Opsonierung oder der Komplementkaskade zu eliminieren. In Säuge-

tieren unterscheidet man fünf verschiedene Immunglobulinklassen (s. Tabelle 1), auch Isotypen genannt, welche sich durch ihr Molekulargewicht und damit ihren Aufbau, ihre Effektorfunktion und auch Konzentration im Blutplasma unterscheiden: Immunglobulin G (IgG), A (IgA), M (IgM), D (IgD) und E (IgE).

Tabelle 1: Übersicht Eigenschaften Immunglobulin-Isotypen (Lottspeich et al., 2012).

Isotyp	Molekulargewicht [kDa]	Anteil am Gesamt-Immunglobulin im Plasma [%]
IgG	150 Monomer	75
IgA	160 Monomer, 390 Dimer	15
IgM	970 Pentamer	7
IgD	180 Monomer	0,5
IgE	190 Monomer	0,002

Alle Isotypen sind aus schweren und leichten Polypeptidketten aufgebaut. Man unterscheidet zwei Typen leichter Ketten, die κ - und λ -Ketten. Sie kommen immer paarweise in allen Isotypen gleichermaßen vor. Weiterhin existieren fünf verschiedene Typen schwerer Ketten, welche die Klasse und Effektorfunktion eines Immunglobulins bestimmen: die γ -Kette in IgG, die α -Kette in IgA, die μ -Kette in IgM, die δ -Kette in IgD und die ε -Kette in IgE.

Der detaillierte Aufbau eines Immunglobulins wird im Folgenden am Beispiel des IgGs (s. Abbildung 8) beschrieben und erläutert.

Das IgG-Molekül weist ein durchschnittliches Molekulargewicht von 150 kDa auf. Seine Form entspricht einem Ypsilon (s. Abbildung 8). Es besteht aus je zwei leichten (ca. 25 kDa), auch als L (engl. *light*)-Ketten bezeichneten, und zwei schweren (ca. 50 kDa), auch als H (engl. *heavy*)-Ketten bezeichneten, Polypeptiden. Die leichten Ketten bestehen aus je einer variablen (V_L) und einer konstanten Domäne (C_L), die schweren Ketten aus je einer variablen (V_H) und drei konstanten Domänen (C_{H1} - C_{H3}). Alle Domänen bestehen aus je 110 Aminosäuren. C_{H2} kann zusätzlich posttranslational durch Kohlenhydrate modifiziert sein. Kovalent verbunden sind die beiden schweren Ketten, sowie je eine leichte und eine schwere Kette über Disulfidbrücken.

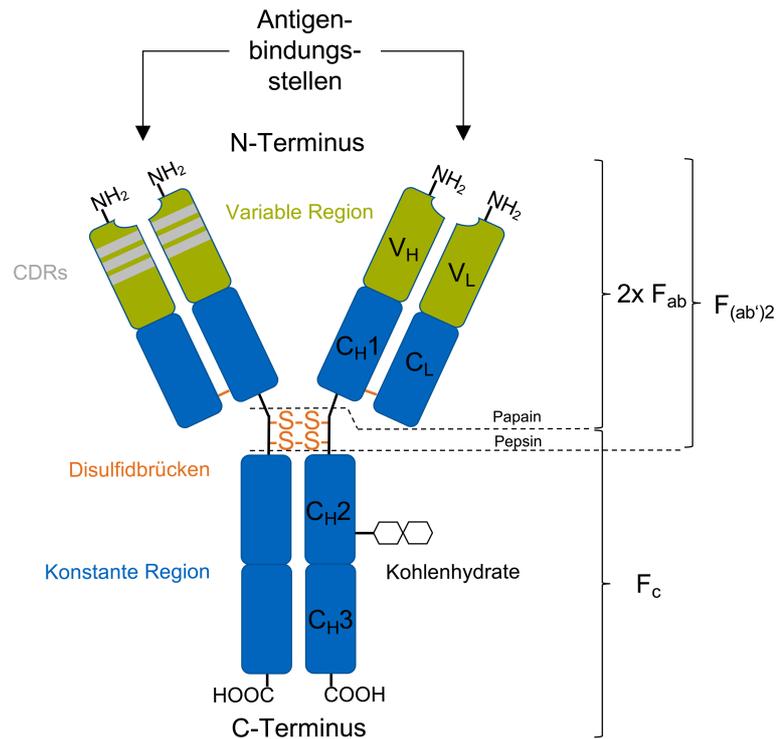


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines IgGs.

Das IgG-Molekül gliedert sich in drei globuläre Teile, welche über flexible Polypeptidketten in der Gelenkregion (engl. *hinge region*) miteinander verbunden sind. Am aminoterminalen Ende des IgGs definieren die variablen Domänen V_H und V_L mit ihren hypervariablen Aminosäuresequenzen hv_1 , hv_2 und hv_3 , auch CDR (engl. *complementary determining regions*) genannt, zwei identische und einzigartige Antigenbindungsstellen oder auch das Paratop des Antikörpers. Das carboxyterminale Ende des IgGs beschreibt über die schweren Ketten die Effektorfunktion des Moleküls.

Ein enzymatischer Verdau des IgGs mit der Protease Papain spaltet das bivalente Molekül auf der aminoterminalen Seite der Disulfidbrücken in der Gelenkregion in drei Fragmente: zwei monovalente Fab-Fragmente (engl. *fragment antigen binding*) und ein Fc-Fragment. Die Protease Pepsin hingegen spaltet das IgG auf der carboxyterminalen Seite der Disulfidbrücken in der Gelenkregion in ein bivalentes Fab'2-Fragment und weiterhin den Fc-Teil des Antikörpers in mehrere kleine Fragmente. Die Fab-Fragmente stellen folglich zwei monovalente Moleküle, das Fab'2-Fragment ein bivalentes Molekül ohne Effektorfunktion dar.

Der strukturelle Teil des Antigens (z.B. eines Proteins oder Polysaccharids), welcher von einem Antikörper erkannt wird, wird auch als Antigen determinante oder Epitop bezeichnet. Die hypervariablen Aminosäuresequenzen der variablen Domänen des Antikörpers definieren dabei die räumliche und ladungsbedingte Komplementarität. Die Interaktion erfolgt

durch elektrostatische Wechselwirkungen, wie Ionenbindung, die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen oder Van-der-Wals-Interaktionen, aber auch hydrophobe Wechselwirkungen unter Ausschluss von Wassermolekülen oder Kationen- π -Interaktionen. Diese nichtkovalenten Interaktionen können durch extreme pH-Werte, Salzkonzentration, organische Lösungsmittel sowie Detergenzien negativ beeinflusst werden.

2.3.4. Generierung polyklonaler und monoklonaler Antikörper

Antikörper finden heute bedingt durch ihre hohe Bindungsaffinität und -spezifität gegenüber ihren Bindungspartnern breite Anwendung in der Wissenschaft und Medizin. So werden sie für die quantitative und qualitative Analyse (z.B. für Western Blot, Immunoassay (ELISA), Microarray oder Immunohistochemie) und die gezielte Aufreinigung oder Anreicherung von Antigenen mittels Affinitätschromatographie oder auch Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (engl. *Fluorescence-activated cell sorting*, FACS), beispielsweise in der Bioanalytik, sowie für die Vermittlung physiologischer Effekte in Forschung, Diagnostik und medizinischer Therapie (Blattman et al., 2004; Reichert, 2011) eingesetzt. Um die Antikörper der Wissenschaft und Medizin zugänglich zu machen, muss ihre gezielte und gegen definierte molekulare Strukturen gerichtete Produktion erfolgen. (Lipman et al., 2005)

Zum Zweck der Generierung von Antikörpern können Versuchstiere, wie beispielsweise Mäuse, Ratten oder Kaninchen mit zuvor ausgewählten und designten immunogenen Strukturen immunisiert werden. Dabei müssen die immunogenen Strukturen einige Voraussetzungen erfüllen, um eine Immunantwort in den Versuchstieren zu induzieren. Dazu zählen unter anderem die Zugänglichkeit der immunogenen Strukturen auf der Oberfläche eines für die Immunisierung verwendeten Moleküls, die Stabilität des Immunogens, die chemische Differenz des Immunogens zu körpereigenen Strukturen des Versuchstiers sowie die Größe der immunogenen Struktur. Entsprechend muss das Molekulargewicht eines Immunogens > 5 kDa betragen. Moleküle geringeren Molekulargewichts, auch Haptene (Landsteiner, 1921) genannt, können keine Immunantwort im Versuchstier induzieren und müssen vor der Immunisierung an immunogene Trägerproteine (engl. *carrier*) wie Thyroglobulin (TG), Schlitzschnecken-Hämocyanin (engl. *keyhole limpet hemocyanin*, KLH) oder auch Rinderserumalbumin (engl. *bovine serum albumine*, BSA) gekoppelt werden. Versuchstiere werden häufig mit einem Gemisch aus Immunogen und einem Adjuvans, häufig dem inkompletten Freund-Adjuvans (engl. *incomplete Freund's adjuvant*, IFA), immunisiert. Das Adjuvans enthält Mineralöl für eine Depotwirkung und verlangsamte Freisetzung des Immunogens sowie einen Emulgator für die Stabilisierung des Öl-Wassergemischs und unterstützt somit die Aktivierung der humoralen und zelluläre Immunantwort auf das Immuno-

gen (Stils, 2005). Die Injektionen des Immunogens erfolgt häufig subkutan (s.c.), intradermal (i.d.), intramuskulär (i.m.), intraperitoneal (i.p.) oder intravenös (i.v.) (Leenaars et al., 2005).

Die Herstellung polyklonaler Seren oder pAk (s. Abbildung 9) erfolgt aufgrund der einfachen Haltung und des großen Blutvolumens häufig in Kaninchen (Stills, 2012).



Abbildung 9: Schematische Darstellung der Herstellung polyklonaler Antiseren.

Nach abgeschlossener Immunisierung wird dem Versuchstier Blut entnommen, welches anschließend zentrifugiert wird. Das erhaltene Serum enthält alle wasserlöslichen Immunglobuline. Folglich ist das Serum polyklonal, da es Antikörper verschiedenster Epitopspezifität und -affinität enthält. Die exakte Reproduktion eines solchen Antiserums ist nicht möglich. Nachteile polyklonaler Seren sind folglich ihre limitierte Verfügbarkeit sowie ihre geringe Reinheit und Konzentration im Vergleich zum Immunglobulin-Gesamtgehalt im Serum (50-200 µg/ml). Vorteile polyklonaler Seren sind ihre schnelle, kostengünstige und wenig technische Fertigkeiten voraussetzende Gewinnung. Weiterhin weisen pAk in Lösung eine hohe Stabilität gegenüber einem breiten Spektrum an Salzkonzentrationen und pH-Werten auf. Da sie von mehreren B-Zellklonen gebildet werden, zeigen sie häufig eine besonders hohe Spezifität gegenüber ihrem Antigen.

Im Kontext der Entwicklung analytischer Methoden erfolgt häufiger die Produktion von mAk nach Köhler und Milstein (s. Abbildung 10). MAk werden von einem einzigen B-Lymphozyten gebildet und sekretiert und binden folglich nur ein spezifisches Antigen. Für ihre Produktion werden die Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten aus der Milz (Splenozyten) des immunisierten Versuchstiers, häufig Maus oder Ratte, isoliert und mit genetisch modifizierten murinen Myelomazellen fusioniert. Dies führt zur Bildung eines Zellgemischs bestehend aus nicht fusionierten B-Lymphozyten und Myelomazellen, homokaryotischen Hybriden aus B-Lymphozyten und Myelomazellen sowie heterokaryotischen Hybriden aus je einem B-Lymphozyt und einer Myelomazelle. Nur letztere können über ein HAT-Selektionsmedium (enthält Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin) kultiviert werden und zeichnen sich phänotypisch durch eine unlimitierte Proliferation und die Produktion eines einzigartigen Antikörpers aus. Die Hybridomzellen werden anschließend vereinzelt und der ZKÜ der

Zellklone auf die Produktion geeigneter mAk, beispielsweise mit ELISA oder FACS-Analyse, getestet und selektiert.

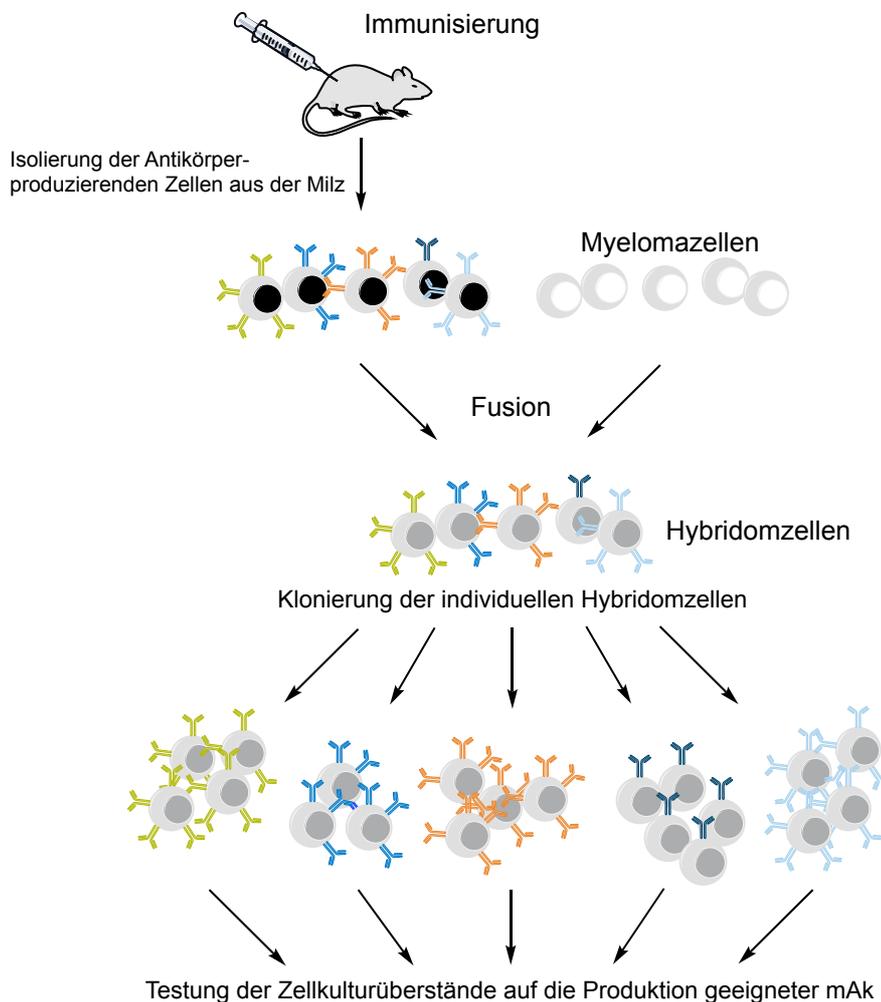


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Herstellung von mAk mittels Hybridomtechnik nach Köhler und Milstein.

Die Vorteile von mAk bestehen zum einen darin, dass ein hochreines Reagenz, aus gegenüber einem Epitop affinen und spezifischen Antikörpern bestehend, generiert wird, welches durch Kultivierung des entsprechenden Zellklons in großem Maßstab unbegrenzt in hoher Konzentration und in gleichbleibender Qualität verfügbar gemacht werden kann. Zum anderen ermöglicht die Sequenzierung des mAk seine rekombinante Synthese, beispielsweise in Bakterien. Weiterhin können chimäre oder humanisierte Antikörper hergestellt werden. Außerdem ist über Proteinengineering die Modifikation der Aminosäuresequenz des Paratops und damit die Beeinflussung der Bindungseigenschaften gegenüber dem Epitop möglich. Nachteile von mAk sind die oft hohe Empfindlichkeit gegenüber kleineren Änderungen der Salzkonzentrationen oder pH-Werte ihres Umgebungsmediums sowie ihre lange aufwendige und teure Herstellung.

2.4. Charakterisierung monoklonaler Antikörper

Um mAk für die Entwicklung bioanalytischer Methoden einzusetzen, muss ihre ausführliche Charakterisierung erfolgen. Zu diesem Zweck werden verschiedenste Methoden eingesetzt.

Die Konzentration eines gelösten mAk kann mittels herkömmlicher Proteinbestimmungsmethoden unter Verwendung eines Spektralphotometers ermittelt werden. So können Biuret-, Lowry-, Bicinchoninsäure- und Bradfordassays verwendet werden (Lottspeich et al., 2012), welche sich im Wesentlichen durch benötigte Probenvolumina und Nachweisgrenzen unterscheiden. Weiterhin ist die Quantifizierung mittels direkter spektralphotometrischer Bestimmung der Absorption im ultravioletten (UV) Bereich ($\lambda = 280 \text{ nm}$) durch aromatische Aminosäuren wie beispielsweise Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin möglich (Simonian, 2002).

Die qualitative Charakterisierung und Bestimmung der Reinheit einer Antikörper-Lösung sowie Bestimmung der Molekülmasse und damit Ermittlung des Antikörper-Isotyps kann nach Reduktion in leichte und schwere Ketten abschätzend über die Durchführung einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (engl. *polyacrylamid gel electrophoresis*, PAGE; (Laemmli, 1970)) erfolgen. Für genauere Analysen mit hoher Massengenauigkeit werden oft massenspektrometrische Ansätze verfolgt. So kommen häufig sanfte Ionisierungsmethoden wie ESI oder auch Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (engl. *matrix-assisted laser desorption ionisation*, MALDI) zum Einsatz (Zhang et al., 2009). MALDI-basierte MS kommt dabei ohne Dekonvolution aus. Die Ermittlung der Antikörper-Isotypen kann außerdem mit Hilfe Subtyp-spezifischer Antikörper über einen direkten oder *Sandwich*-ELISA (Hornbeck et al., 2017) sowie durch Bestimmung der genauen Molekülmasse anhand bereits erwähnter massenspektrometrischer Methoden erfolgen.

Auch die Sequenzierung und damit Bestimmung der Aminosäuresequenz des Paratops oder des gesamten mAks sowie die Analyse posttranslationaler chemischer Modifikationen, wie Glykosylierungen, sind durch massenspektrometrische Methoden häufig nach einem enzymatischen Verdau oder einer Fragmentierung sowie anschließender chromatographischer Auftrennung der einzelnen Fragmente möglich (Zhang et al., 2009).

Die dreidimensionale Struktur von mAk lässt sich mit Hilfe von NMR oder Röntgenstrukturanalyse ermitteln. Erstere lässt sich in wässriger Lösung durchführen und kann folglich Aussagen über die Dynamik sowie Orientierung der einzelnen Domänen in Lösung treffen. Die Röntgenstrukturanalyse hingegen erfolgt anhand von Proteinkristallen, in welcher die mAk in einem Kristallgitter fest verpackt sind (Vu et al., 2009).

Für die Entwicklung Antikörper-basierter analytischer Methoden von besonderer Wichtigkeit sind außerdem die Bestimmung der Stabilität, Spezifität und Selektivität sowie Affinität eines mAk. Von besonderer Relevanz ist die Stabilität eines mAk und des ausgebildeten Immunkomplexes in relevanten Probenmatrices. Sind die zu analysierenden Proben sehr komplex und enthalten neben dem Zielanalyten noch viele weitere Moleküle unterschiedlicher Polarität und Struktur, kann die Interaktion zwischen mAk und Antigen gestört werden. Auch Salzkonzentration, pH-Werte, Viskosität und organische Lösungsmittel spielen in diesem Zusammenhang eine Rolle und können zusätzlich die funktionelle Faltung eines Antikörpers negativ beeinflussen. Die Summe der Effekte aller in einer Probe vorkommenden Komponenten, welche die Messung des Zielanalyten beeinflussen, werden auch als Matrixeffekte bezeichnet (Raem et al., 2007) und müssen bei Entwicklung einer Antikörper-basierten Analytik untersucht werden.

Spezifität und Selektivität lassen sich über die Untersuchung von KR bestimmen. Obwohl mAk im Gegensatz zu pAk aufgrund der Antigen-gesteuerten somatischen Mutationen monospezifisch sein und ausschließlich mit ihrem Antigen und folglich einem Epitop reagieren sollten, werden häufig sogenannte KR beobachtet. Dabei handelt es sich um eine Interaktion zwischen Antikörper und seinem Antigen strukturell verwandten Molekülen (Kramer et al., 1997). Begründet sind diese Beobachtungen darin, dass aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit eine räumliche und chemische Komplementarität zwischen Antikörper und Kreuzreaktanden besteht (Mariuzza et al., 1993). Ermitteln lassen sich KR beispielsweise mit Hilfe eines indirekt kompetitiven ELISAs und einem Vergleich der ermittelten IC_{50} -Werte für das Antigen und dem Antigen strukturell verwandten Molekülen, den Substituenten. Die KR lässt sich dabei folgendermaßen berechnen:

$$\text{Kreuzreaktivität (KR) [\%]} = \frac{IC_{50}(\text{Substituent})}{IC_{50}(\text{Antigen})} \cdot 100 \quad (5)$$

Je kleiner die detektierte KR, desto selektiver ist der Antikörper. Die Untersuchung der KR ermöglichen außerdem die Charakterisierung der strukturellen antigenen Determinante für

die Interaktion zwischen Antikörper und Antigen. Unterstützend kann hier auch das strukturelle *Alignment* des Antigens mit ausgewählten Substituenten oder dem Immunogen hinzugezogen werden.

Die Affinität oder auch intrinsische Affinität eines Antikörpers wird als Stärke der Wechselwirkungen der monovalenten Interaktion zwischen einem Antikörper und seinem Antigen definiert. Sie unterscheidet sich von der Avidität, welche als funktionelle Affinität die Stärke einer Bindung unter Berücksichtigung der Valenzen definiert (Delves et al., 2017) und lässt sich beispielsweise durch einen kompetitiven ELISA über die Bestimmung der IC_{50} -Werte abschätzen (s. Abschnitt 2.3.2). Eine genauere Charakterisierung kann über die Bestimmung der Dissoziations- und Assoziationskonstanten erfolgen. Da die Bindung zwischen Antikörper und Antigen reversibel ist, handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion, welcher die thermodynamischen Gesetzmäßigkeiten des Massenwirkungsgesetzes zugrunde liegen:



Ak = Antikörper [M]

Ag = Antigen [M]

$AkAg$ = Antikörper-Antigen-Komplex [M]

k_a = Assoziationsratenkonstante [1/M · s]

k_d = Dissoziationsratenkonstante [1/s]

Aus der Gleichgewichtsreaktion lassen sich die Bindungsaffinitäten als K_a (Affinitätskonstante) oder K_d (Dissoziationskonstante) definieren:

$$K_a = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[AkAg]}{[Ak] \cdot [Ag]} = \frac{1}{K_d} \quad (7)$$

K_a = Assoziationskonstante im Gleichgewicht [1/M]

K_d = Dissoziationskonstante im Gleichgewicht [M]

Antikörper-Antigen-Interaktionen gelten als hoch affin und zeichnen sich üblicherweise durch K_d -Werte im nano- bis pikomolaren (nM - pM) Bereich (Landry et al., 2015; Stubenrauch et al., 2013) aus.

2.4.1. Bestimmung der thermodynamischen Bindungskonstanten

Für die thermodynamische Charakterisierung und damit Bestimmung der Bindungsaffinität eines mAk gegenüber seinem Antigen werden häufig die ITC oder die SPR-Spektroskopie eingesetzt. Die Bestimmung der Bindungskonstanten mit Hilfe eines ELISAs ist ebenfalls beschrieben (Friguet et al., 1985).

Isotherme Titrationskalorimetrie

Die ITC ermöglicht eine markierungsfreie thermodynamische Charakterisierung biochemischer Interaktionen zwischen sich in Lösung befindlichen Reaktionspartnern. Durch die Messung der Temperaturänderung während der chemischen Reaktion können die Dissoziationskonstante K_d , die Bindungsenthalpie ΔH , die Bindungsstöchiometrie N sowie weiterhin die freie Enthalpie ΔG und Entropie ΔS ermittelt werden. (Frasca, 2016; Lewis et al., 2005)

Die ITC wird vor allem für die Charakterisierung von Protein-Ligand-, Protein-Protein-, DNA-Protein-, Protein-Kohlenhydrat-, Protein-Lipid- und Antigen-Antikörper-Interaktionen eingesetzt (Velázquez-Campoy et al., 2004) und wurde erstmals in den 1960er Jahren beschrieben (Lewis et al., 2005). Das Messprinzip beruht auf der kontinuierlichen Vermischung der Reaktionspartner, beispielsweise eines mAks und seinem Antigen, in einem adiabatischen System (s. Abbildung 11). Abhängig von der thermodynamischen Natur der Reaktion wird dabei Wärme freigesetzt (exotherme Reaktion) oder aufgenommen (endotherme Reaktion).

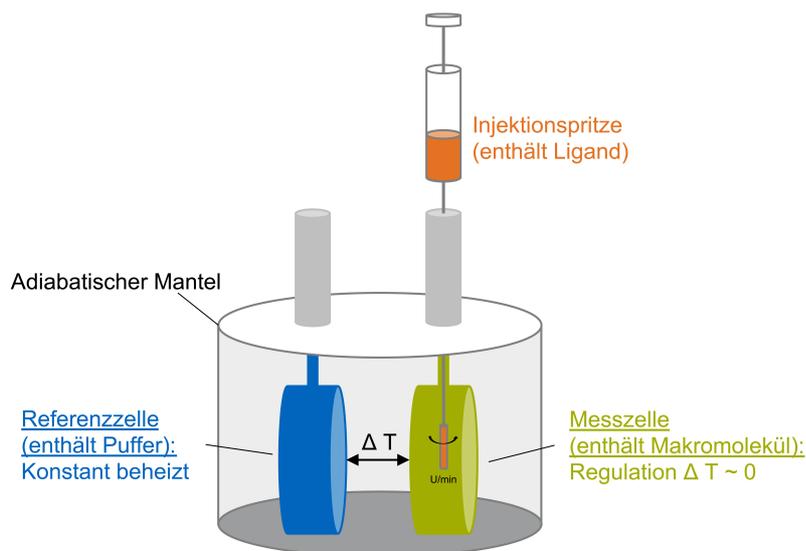


Abbildung 11: Schematische Darstellung eines isothermen Titrationskalorimeters - Ein Ligand wird schrittweise zu einem Makromolekül in der Messzelle titriert und die Temperaturänderung im Vergleich zur Referenzzelle bestimmt und ausgeglichen (in Anlehnung an (Lottspeich et al., 2012)).

Eine Temperaturänderung erfolgt so lange, bis alle Bindungsstellen des Makromoleküls abgesättigt sind (Ladbury et al., 1996) und wird im Vergleich zu einer konstant beheizten Referenzzelle ermittelt und ausgeglichen. Diese Differenzheizleistung (engl. *differential power*, DP) wird schließlich als Funktion der Zeit aufgetragen. Die Integrale der Reaktionsspitzen repräsentieren proportional zur Menge der interagierenden Reaktionspartner die bei der Reaktion entstandene oder verbrauchte Wärme ΔH . (Frasca, 2016; Lottspeich et al., 2012)

Die generierte Isotherme wird anschließend mittels nicht linearer Regression und unter Anwendung eines geeigneten Bindungsmodells (z.B. bimolekulare Reaktion Antikörper/Antigen mit 1:1 *single site model*) angepasst, was die Bestimmung von K_d als Steigung der Kurve, der Bindungsstöchiometrie N als Wendepunkt der Kurve und der absoluten Bindungsenthalpie ΔH als maximale Signaldifferenz ($\Delta H_{\max} - \Delta H_{\min}$) ermöglicht (Ghai et al., 2012).

Zusätzlich lassen sich mit Hilfe der ITC verschiedene weitere thermodynamische Parameter (ΔG , ΔS) bestimmen (s. Formel 8), wodurch eine vollständige thermodynamische Charakterisierung der bimolekularen Reaktion ermöglicht wird (Ladbury et al., 1996).

$$-RT \ln K_d = \Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (8)$$

R = allgemeine Gaskonstante [$J/K \text{ mol}$]

ΔG = freie Enthalpie / Gibbs-Energie [J]

T = Reaktionstemperatur [K]

ΔH = Enthalpie [J]

K_d = Dissoziationskonstante [M]

ΔS = Entropie [J/K]

Damit eine Interaktion zwischen zwei Molekülen erfolgt, muss die freie Enthalpie ΔG negativ sein. Die Gibbs-Energie ermöglicht es dabei, Affinitäten bei verschiedenen Bedingungen (pH Wert, Temperatur usw.) direkt zu vergleichen. Je höher die Affinität zwischen Makromolekül und Ligand, desto kleiner K_d und desto negativer ΔG . ΔH und ΔS geben weiterhin Aufschluss über den der Interaktion zugrundeliegenden Mechanismus. Enthalpie-Änderungen sind mit der Entstehung und dem Aufbrechen von nichtkovalenten Bindungen verknüpft. Die netto-Zunahme von nichtkovalenten Bindungen ist energetisch immer favorisiert. Weiterhin kann die Entropie ΔS Informationen über die Ordnung oder Unordnung im System und damit die konformationellen Freiheitsgrade liefern. (Frasca, 2016)

Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

Genau wie die ITC ermöglicht die SPR-Spektroskopie eine markierungsfreie Charakterisierung der Interaktion von Biomolekülen. Im Gegensatz zur ITC befindet sich nur einer der beiden Interaktionspartner in Lösung, während der zweite an einer Oberfläche immobilisiert ist (Karlsson, 2004). Optische SPR-Biosensoren können dabei durch Umwandlung eines biologischen in ein elektrisches Signal die Zusammensetzung, Struktur oder Funktion biologischer Proben messbar machen (Guo, 2012).

Die SPR-Spektroskopie wird unter anderem für die qualitative und quantitative Charakterisierung der Interaktionen von Proteinen, Peptiden, Lipiden, Viren, Nukleinsäuren und pharmakologisch wirksamen kleinen organischen Molekülen eingesetzt (Frostell et al., 2013; Karlsson, 2004). Die Beobachtung der Interaktion von Antikörpern und Antigenen anhand von SPR-Spektroskopie wurde erstmal 1983 beschrieben (Liedberg et al., 1983). Das physikalische Messprinzip (s. Abbildung 12) beruht auf einer lokalen Änderung des Brechungsindex an der Sensoroberfläche, welche häufig aus Gold besteht. Durch ein Prisma geleitetes Licht kann an einer Metalloberfläche Elektronengas in Schwingung versetzen, welches im Sinne der Energieerhaltung und als Resonanzphänomen Oberflächenplasmonen anregt. Durch Änderung des Brechungsindex an der Sensoroberfläche, beispielsweise durch unterschiedliche Lösungen oder Immobilisierung von Biomolekülen, erfolgt eine Änderung der Fortpflanzungskonstante der Oberflächenplasmonen an der Metalloberfläche und damit eine Änderung des Ausfallswinkels des reflektierten Lichts. Durch das zeitaufgelöste Monitoring des Brechungsindex entsteht ein Sensorgramm. (Karlsson et al., 1991; Lottspeich et al., 2012)

Das heutzutage kommerziell verfügbare System Biacore™ der Firma GE Healthcare kombiniert einen Detektor und einen Sensorchip mit geeigneter Mikrofluidik für den Transport von Proben- und Pufferlösungen und ermöglicht die thermodynamische Charakterisierung einer Vielzahl unterschiedlicher biologischer Interaktionen. Das Funktionsprinzip beruht dabei beispielsweise auf der Immobilisierung eines Antikörpers über Protein G oder funktionelle Gruppen auf einer modifizierten Goldchipoberfläche und der Adsorption und Desorption eines gelösten Antigens in einer Flusszelle. Die zeitlich aufgelöste Schichtdickenänderung während Assoziation und Dissoziation des Antikörper-Antigen-Komplexes, kann dann als Änderung der RU (engl. *refractive units*) detektiert werden. (Malmqvist, 1993)

Mit Hilfe von SPR-Spektroskopie lassen sich sowohl die Assoziations (k_a)- als auch die Dissoziationsratenkonstante (k_d) und damit die Assoziations (K_a)- und Dissoziationskonstante K_d einer monovalenten, aber auch bivalenten Rezeptor-Liganden-Interaktion bestimmen.

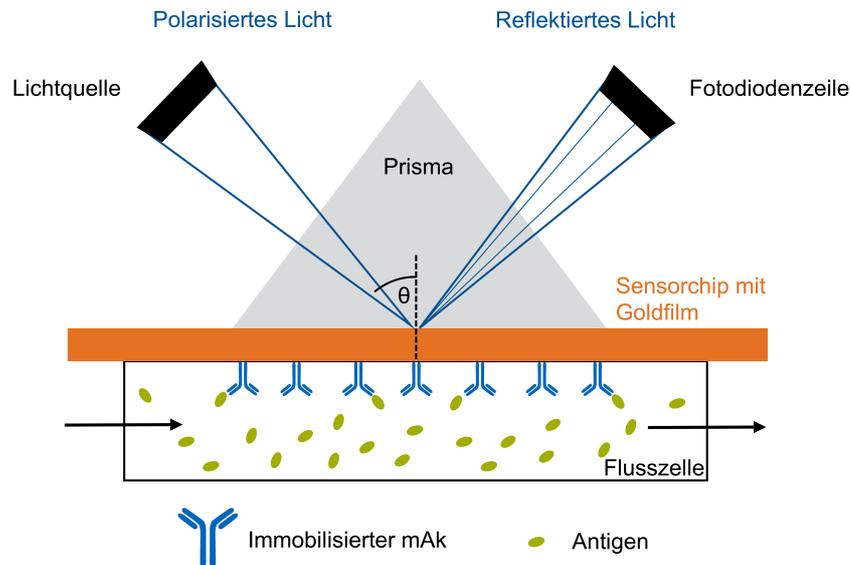


Abbildung 12: Schematische Darstellung der SPR-Spektroskopie - Nach Immobilisierung eines Liganden (z.B. mAk) wird eine Analytlösung (enthält Antigen) über die Chipoberfläche geleitet. Die Adsorption des Antigens an den mAk führt zu einer Schichtdickenzunahme und damit Änderung des Brechungsindex an der Oberfläche des Sensorchips. Die dadurch bedingte Änderung des Ausfallswinkels des polarisierten Lichts an der Oberfläche wird zeitaufgelöst aufgenommen (Abbildung nach (Malmqvist, 1993)).

Vergleicht man die beiden vorgestellten Methoden, bietet die ITC einige Vorteile. So sind in modernen Geräten, beispielsweise von Malvern Panalytical GmbH, heutzutage nur noch kleine Probenvolumina für eine kalorimetrische Messung notwendig. Weiterhin bildet die ITC im Gegensatz zur SPR-Spektroskopie realitätsnäher die Interaktion zwischen Antikörper und Antigen ab, da sich beide Reaktionspartner in Lösung befinden. Die Methode gilt deshalb als Goldstandard für die thermodynamische Charakterisierung bimolekularer Interaktionen und wird oft zur Validierung von SPR-Ergebnissen eingesetzt (Frasca, 2016). Ein Nachteil besteht jedoch darin, dass sich mittels ITC-Messung keine Ratenkonstanten (k_a und k_d) bestimmen lassen. Die Dynamik der Komplexbildung aus Antikörper und Antigen kann entsprechend nicht abgebildet werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Generierung monoklonaler Antikörper für die Detektion des PA-Grundkörpers Retronecin

3.1.1. Design, Synthese und Charakterisierung von Immunogenen

Das PA Retronecin zählt mit einem MW von 155,19 g/mol zu den sogenannten Haptenen, welche nicht in der Lage sind, eine Immunantwort in einem Organismus zu induzieren. Aus diesem Grund war die Kopplung an einen dem Organismus möglichst strukturfremden Proteinträger für die Immunisierung nötig. Da für die Kopplung mit Proteinen eine aktivierte funktionelle Gruppe, wie eine Carboxyl- oder primäre Aminofunktion notwendig ist, setzt diese häufig die Aktivierung oder Einführung funktioneller Gruppen in das Hapten und damit seine chemische Derivatisierung voraus. Weiterhin werden bei der Immunogensynthese häufig sogenannte Linker- oder Spacerstrukturen einer Länge von zwei bis sechs Atomen (Marco et al., 1995) eingeführt, um die Haptene auf der Oberfläche der globulären Proteinstruktur zu exponieren und somit dem Immunsystem zugänglich zu machen. Da es sich bei Retronecin um ein Diol handelt (s. Abbildung 13), musste vor der Einführung eines Linkers und der Kopplung an einen Proteinträger folglich die Aktivierung einer Hydroxylgruppe erfolgen.

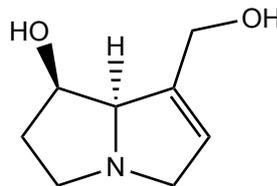


Abbildung 13: Für die Immunisierung verwendeter PA-Grundkörper Retronecin.

Die Synthese der Retronecin-basierten Immunogene erfolgte in Zusammenarbeit mit der Squarix GmbH in Marl. Basierend auf der Kopplung des Haptens an die Proteinträger BSA und TG über die chemisch reaktivere primäre Hydroxylgruppe und Verwendung eines Quadratsäure-Diethylesters (Glüsenkamp et al., 1991) wurden Konjugate synthetisiert, welche neben Kohlenstoff auch Heteroatome wie Stickstoff in der Linkerstruktur zwischen Hapten und Proteinträger enthielten (s. Abbildung 14).

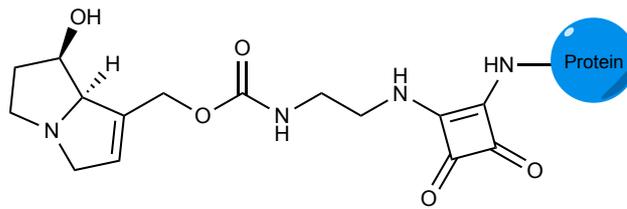


Abbildung 14: Struktur der in Zusammenarbeit mit der Squarix GmbH synthetisierten Retronecin-basierten Protein-Konjugate.

Das Design des Linkers war dabei zum einen in einer erhöhten Stabilität des Konjugats gegenüber einer Hydrolyse sowie der starken chemischen Unterscheidung gegenüber gängigen Seitenketten der Retronecin-basierten PA begründet. So enthalten voll veresterte PA neben dem tertiären Stickstoffatom im Grundkörper keine zusätzlichen Stickstoffatome. Die gewählte Strategie sollte hierbei die Generierung von mAk unterstützen, welche in erster Linie den Grundkörper Retronecin, unter Umständen aber auch voll veresterte Retronecin-basierte PA erkennen.

Die qualitative Charakterisierung des TG-basierten Immunogens sowie des heterologen BSA-Konjugats erfolgte mittels indirekt nicht kompetitivem ELISA unter Verwendung des mAk4B8 der japanischen Arbeitsgruppe Morimoto (Sakamoto et al., 2017) von der Kyushu Universität Fukuoka (s. Abbildung 15).

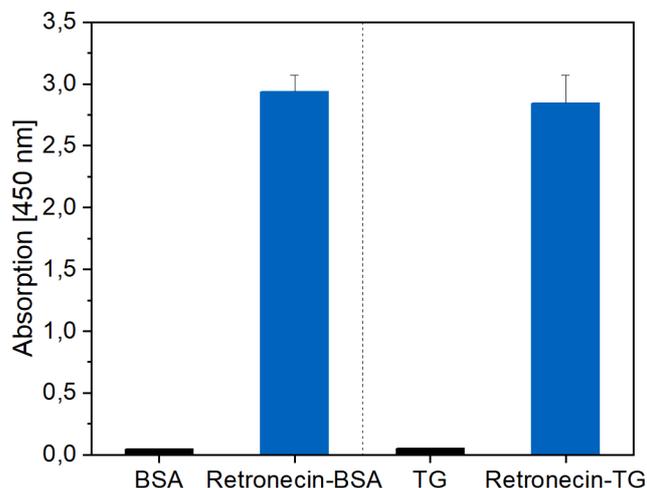


Abbildung 15: Indirekt nicht kompetitiver ELISA zur qualitativen Überprüfung der Synthese von Retronecin-Quadratsäure-Linker-Konjugaten unter Verwendung des mAk4B8 (Sakamoto et al., 2017), $m=3$, Fehler repräsentiert die Standardabweichung.

Der mAk4B8 erkennt hochspezifisch das makrozyklische PA Monocrotalin, zeigte jedoch auch eine geringe KR (0,11%) gegenüber Retronecin. Sowohl für das heterologe BSA- als auch das TG-Konjugat konnten im Vergleich zu ungekoppeltem BSA und TG eine Bindung

des mAk4B8 an die Retronecin-gekoppelten Proteine festgestellt werden, wie durch die signifikante Absorptionserhöhung bei 450 nm deutlich wurde.

Die repräsentative Bestimmung der Kopplungsdichte am BSA-Konjugat mittels MALDI-TOF-MS (s. Abbildung 16) und Verwendung von α -Cyano-4-hydroxycimtsäure (engl. *alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid*, HCCA) als organische Matrixsubstanz (*dried droplet*), ergab, berechnet aus der Massendifferenz $MW_{\text{Retronecin-BSA}} - MW_{\text{BSA}}$, eine mittlere Kopplungsdichte von 16 Retronecin-Molekülen pro BSA-Molekül.

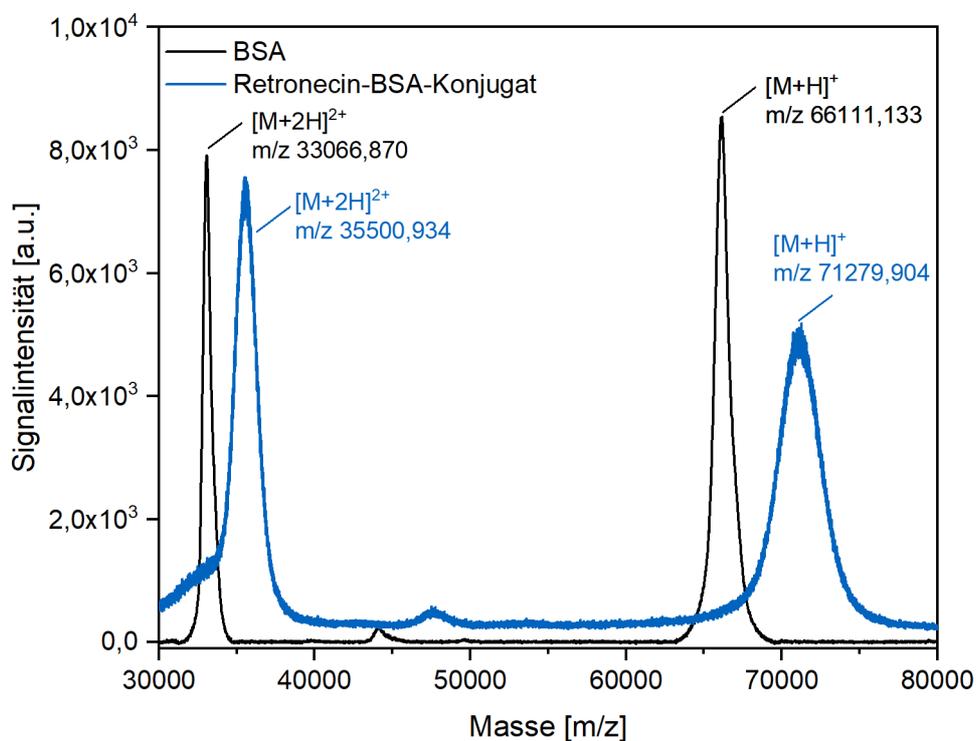


Abbildung 16: MALDI-TOF-MS-Spektren von BSA (schwarz) und Retronecin-BSA-Konjugat (blau) zur quantitativen Bestimmung der Kopplungsdichte; Matrix: HCCA, *dried droplet*, Laserenergie: 60%

Aufgrund der im indirekt nicht kompetitiven ELISA bei vergleichbarer *Coating*-Konzentration und Entwicklungszeit gemessenen und nahezu identischen Absorption sowohl für das BSA- als auch das TG-Konjugat, ist davon auszugehen, dass die Kopplungsdichte für den im Vergleich zum BSA (MW ~ 67 kDa) etwa zehnfach schwereren Proteinträger TG (MW ~ 660 kDa) deutlich höher lag. Eine exakte Bestimmung der Kopplungsdichte des TG-Konjugats mittels MALDI-TOF-MS war aufgrund des zu hohen MW jedoch nicht möglich.

Das Retronecin-TG-Konjugat wurde schließlich für die Immunisierung von Ratten in Zusammenarbeit mit der MAB *Monoclonal Antibody Core Facility* des Helmholtz Zentrums München (Dr. Regina Feederle) und damit für die Generierung von mAk zur Detektion des PA-Grundkörpers Retronecin verwendet.

3.1.2. Synthese und Charakterisierung eines heterologen Konjugats

Da im Rahmen dieser Arbeit hoch affine mAk generiert werden sollten, welche ein möglichst breites Spektrum an strukturell verschiedenen Retronecin-basierten PA detektieren, wurde für das Screening der Hybridom-ZKÜ mittels indirekt kompetitivem ELISA ein heterologes Retronecin-BSA-Konjugat eingesetzt. Die Verwendung eines heterologen Protein-Konjugats stellt sicher, dass während des Screenings der ZKÜ ausschließlich Zellklone identifiziert werden, welche Antikörper gegen das Hapten, nicht aber für den bei der Immunisierung verwendeten Proteinträger produzieren. Um auch Antikörper auszuschließen, welche Teile der Linkerstruktur im Retronecin-Linker-TG-Konjugat erkennen, wurde ein Retronecin-BSA-Konjugat ohne Linkerstruktur synthetisiert. Für die Synthese erfolgte die Kopplung des Retronecins über 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) (Sakamoto et al., 2017) an primäre ϵ -Aminogruppen der Aminosäure Lysin des Proteinträgers BSA (s. Abbildung 17).

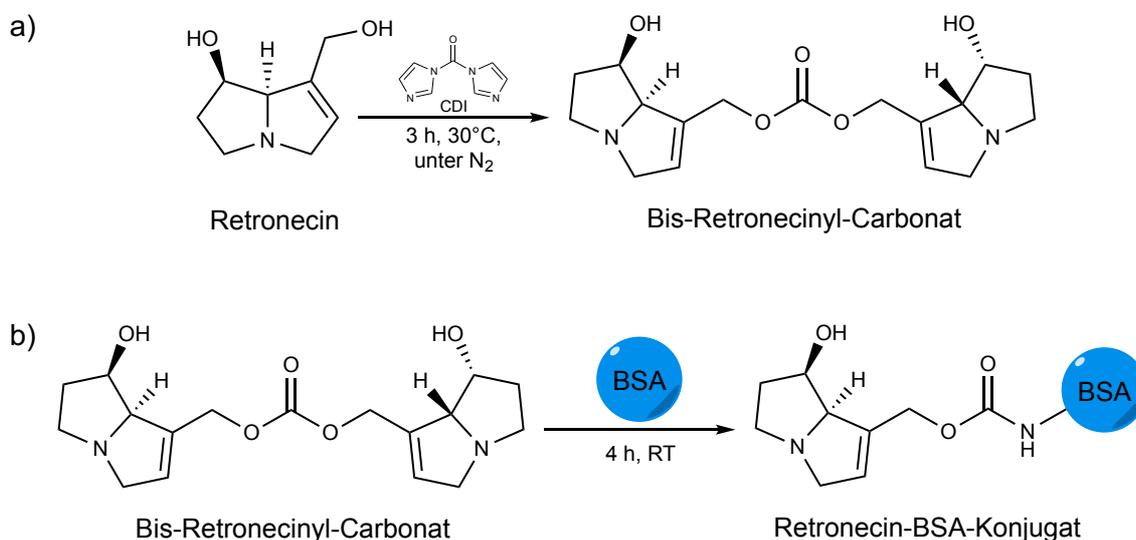


Abbildung 17: Derivatisierung von Retronecin mittels CDI zum Bis-Retronecinyl-Carbonat (a) und Kopplung an BSA über primäre ϵ -Aminogruppen (b).

Die Entstehung des Bis-Retronecinyl-Carbonats wurde mittels ESI-MS überprüft (s. Abbildung 18). Neben dem Reaktionsprodukt ($[M+H]^+$ m/z 337,17554), wies das aufgenommene Spektrum das Edukt Retronecin ($[M+H]^+$ m/z 156,10213), das Hauptnebenprodukt der Reaktion von Retronecin und CDI, sowie das Zerfallsprodukt von CDI Imidazol ($[M+H]^+$ m/z

69,04567) auf.

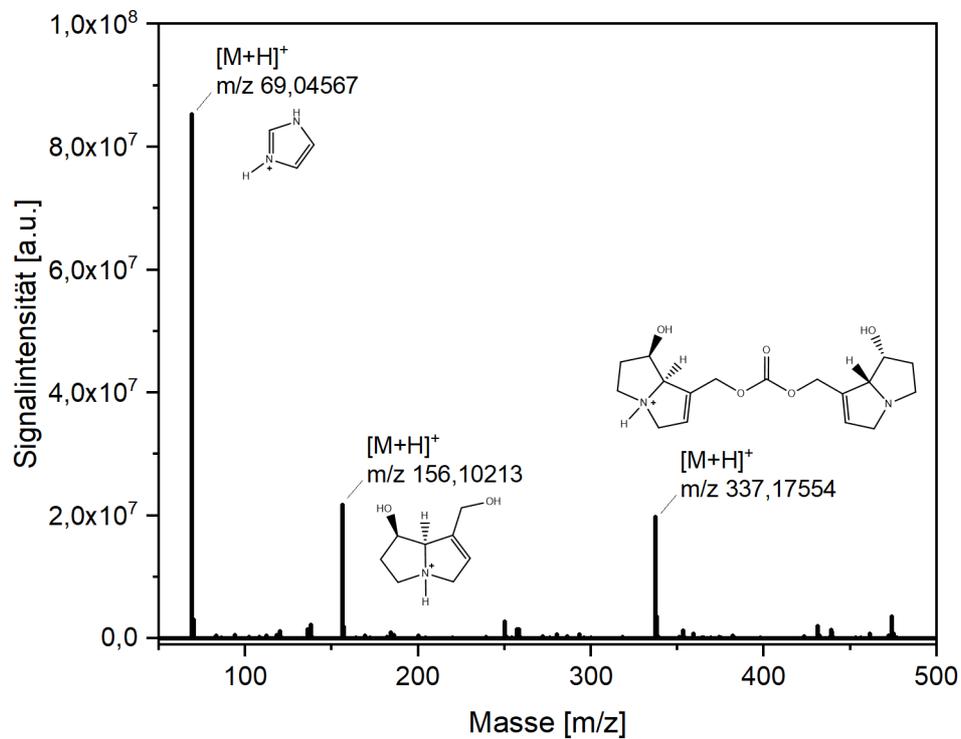


Abbildung 18: ESI-MS-Spektrum der Reaktion von Retronecin mit CDI.

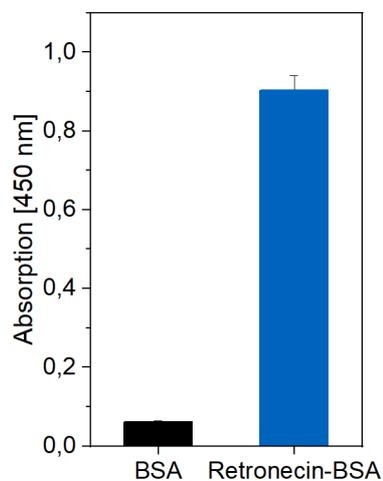


Abbildung 19: Indirekt nicht kompetitiver ELISA zur qualitativen Überprüfung des Retronecin-BSA-Konjugats unter Verwendung des mAk4B8 (Sakamoto et al., 2017), $m=3$, Fehler repräsentiert die Standardabweichung.

Die anschließende Kopplung an den Proteinträger BSA wurde in Borax-Puffer durchgeführt. Nach Dialyse und Lyophilisierung des Konjugats erfolgte wiederum eine qualitative Kontrolle des Kopplungserfolgs mittels indirekt nicht kompetitivem ELISA und Verwendung des mAk4B8 der japanischen Arbeitsgruppe Morimoto (Sakamoto et al., 2017) (s. Abbildung 19). Die im Vergleich zu ungekoppeltem BSA signifikante Absorptionserhöhung für das Retronecin-BSA-Konjugat bestätigte eine erfolgreiche Kopplungsreaktion.

Die quantitative Bestimmung der Kopplungsdichte mittels MALDI-TOF-MS und Verwendung von HCCA als organische Matrixsubstanz (*dried droplet*) (s. Abbildung 20) ergab, berechnet aus der Massendifferenz $MW_{\text{Retronecin-BSA}} - MW_{\text{BSA}}$, eine mittlere Kopplungsdichte von nur ein bis zwei Molekülen Retronecin pro BSA-Molekül und steht damit in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Sakamoto.

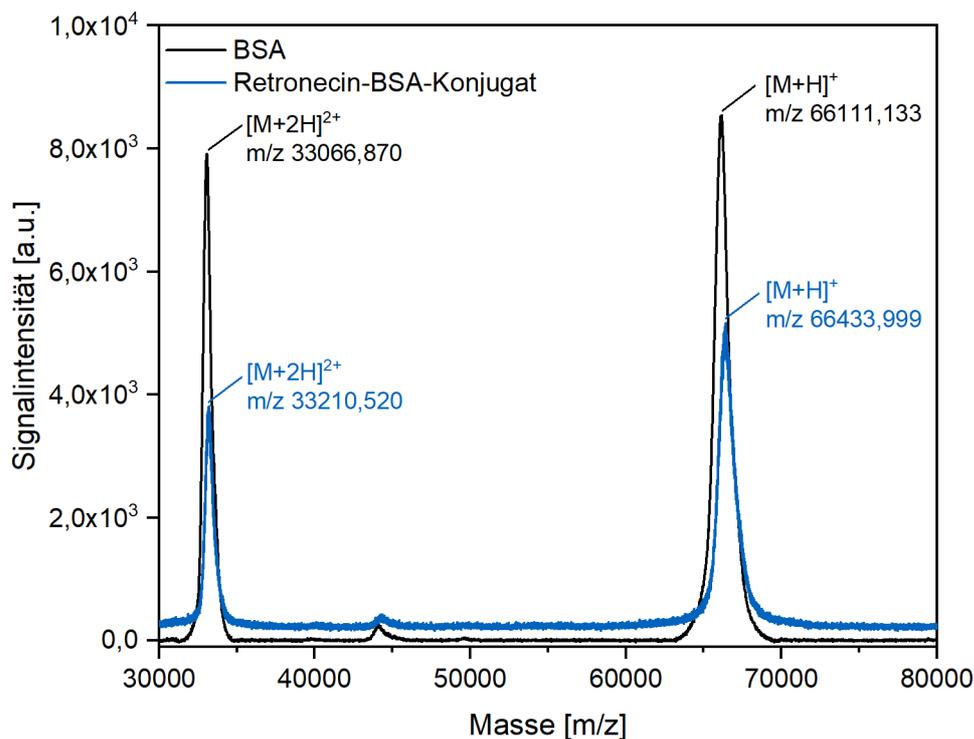


Abbildung 20: MALDI-TOF-MS-Spektren von BSA (schwarz) und Retronecin-BSA-Konjugat (blau) zur quantitativen Bestimmung der Kopplungsdichte; Matrix: HCCA, *dried droplet*, Laserenergie: 85%.

Das Konjugat wurde nachfolgend für das Screening der Hybridom-ZKÜ und in Immunoassays für die Abschätzung der Antikörperaffinität und -Stabilität, die Untersuchung der KR sowie die Bestimmung der Bindungskonstanten der mAk mittels SPR-Spektroskopie verwendet.

3.1.3. Immunisierung und Screening von Zellkulturüberständen

Für die Generierung von mAk zur Detektion des PA-Grundkörpers Retronecin wurden drei Wistar-Ratten mit dem synthetisierten Retronecin-Quadratsäure-Linker-TG-Immunogen (s. Abbildung 14) immunisiert. Nach sechs Wochen erhielten die Ratten eine erste, nach weiteren vier Wochen eine zweite Booster-Immunisierung. Drei Tage nach der letzten Immunisierung erfolgte die Entnahme der Milz und die Hybridomzellkultur. Zu ihrem Zweck wurden die aus der Milz isolierten B-Zellen mit der murinen Myelomazelllinie P3X63-Ag8.653 fusioniert und die ZKÜ nach zehntägiger Kultivierung auf die Produktion von Retronecin-spezifischen Antikörpern untersucht. Die Identifizierung geeigneter Zellklone und damit mAk erfolgte mittels indirekt kompetitivem ELISA. Um nur die für den Grundkörper spezifischen mAk zu identifizieren, wurde für die Beschichtung der MTP das heterologe Retronecin-BSA-Konjugat ohne Linkerstruktur zwischen PA und Proteinträger (s. Abbildung 17) verwendet.

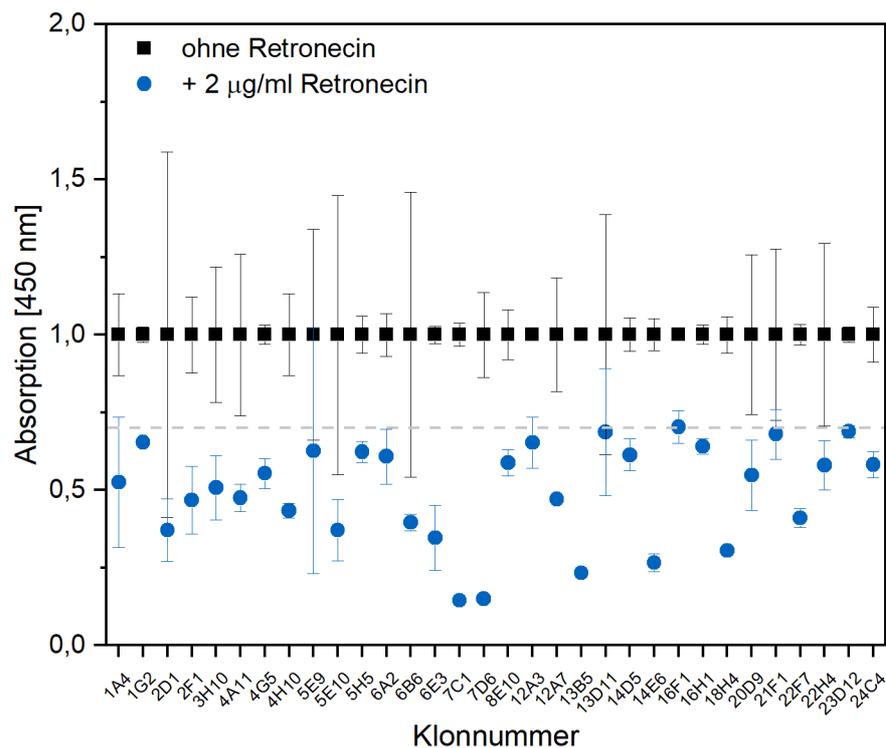
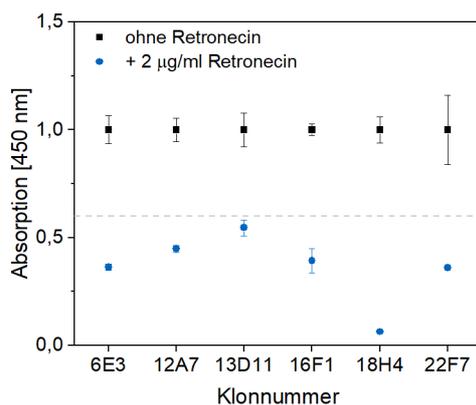


Abbildung 21: Aus etwa 800 im indirekt kompetitiven ELISA getesteten ZKÜ ermittelte positive Zellklone (Signalreduktion Absorption im kompetitiven ELISA $\geq 30\%$), Verdünnung ZKÜ im Verhältnis 1:2 (v/v) in PBS, Absorptionswerte bei 450 nm auf 1 normiert, $m=2$, Fehler repräsentiert die Standardabweichung.

Um das Screening nach geeigneten Zellklonen möglichst effizient zu gestalten, wurde eine einzige Retronecin-Konzentration von 2 µg/ml für den kompetitiven Assay gewählt und aufgrund des geringen ZKÜ-Volumens jeweils nur in Duplikaten gemessen. Insgesamt wurden etwa 800 ZKÜ auf diese Weise untersucht und 51 positive Klone identifiziert, unter denen 32 eine Signalreduktion der gemessenen Absorption bei 450 nm von $\geq 30\%$ im indirekt kompetitiven ELISA zeigten (s. Abbildung 21). Positiv getestete Zellklone wurden expandiert, kryokonserviert und anschließend rekultiviert. Dieser Vorgang gewährleistet, dass nur gefrier-, und damit lagerstabile, sowie genetisch stabile Zellklone für die Produktion von mAk ausgewählt werden. Es ergaben sich 24 Zellklone, welche erneut mittels indirekt kompetitivem ELISA auf die Produktion von Retronecin-spezifischen mAk untersucht wurden. Für sechs der getesteten Klone ergab sich im kompetitiven ELISA eine Reduktion der gemessenen Absorption bei 450 nm um $\geq 40\%$ (s. Abbildung 22a).

a)



b)

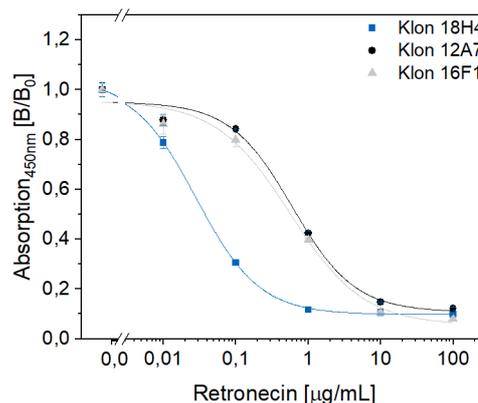


Abbildung 22: Aus 24 im indirekt kompetitiven ELISA getesteten ZKÜ ermittelte positive Klone (Signalreduktion Absorption im kompetitiven ELISA $\geq 40\%$), Verdünnung ZKÜ im Verhältnis 1:500 (v/v) in PBS, Absorptionswerte bei 450 nm auf 1 normiert, $m=3$ (a); ermittelte Kalibrierkurven (0,01 - 100 µg/mL Retronecin in PBS) für die Klone 18H4 (Verdünnung ZKÜ im Verhältnis 1:500 (v/v) in PBS), 12A7 (Verdünnung ZKÜ im Verhältnis 1:5000 (v/v) in PBS), 16F1 (Verdünnung ZKÜ im Verhältnis 1:500 (v/v) in PBS), $m=3$ (b), Fehler repräsentiert die Standardabweichung.

Für die Klone 12A7, 16F1 und 18H4 konnte im indirekt kompetitiven ELISA bei einer Kalibrierung über einen Konzentrationsbereich von 0,01 - 100 µg/ml Retronecin in PBS eine Konkurrenz detektiert werden (s. Abbildung 22b). Da der Zellklon 18H4 im Screening bei einer für die Reaktionsreaktion eingesetzten Konzentration von 2 µg/ml Retronecin die stärkste Signalreduktion ($> 90\%$) und folglich im indirekt kompetitiven ELISA eine im Vergleich zu den Zellklonen 12A7 und 16F1 deutliche Linksverschiebung der sigmoidalen Kalibrierkurve, hin zu niedrigeren Retronecin-Konzentrationen, zeigte, wurde dieser Zellklon zur Reklonierung durch Einzelzellverteilung und Generierung eines monoklonalen Hybridoms ausgewählt. Außerdem wurde unter Verwendung von IgG-Subklassen/Isotypen-

spezifischen mAk die Subklasse des mAk18H4 mittels direktem ELISA als IgG2a ermittelt. Der monoklonale Zellklon wurden anschließend erneut expandiert und der ZKÜ für die Protein G-basierte Affinitätsaufreinigung gesammelt. Der aufgereinigte mAk18H4 wurde bis zur weiteren Verwendung und seiner umfangreichen Charakterisierung bei 4°C gelagert.

3.1.4. MALDI-TOF-MS des aufgereinigten mAk18H4

Zur Überprüfung der Reinheit des aufgereinigten mAk18H4 wurde ein MALDI-TOF-MS-Spektrum aufgenommen. Aufgrund des im Vergleich zum BSA deutlich höheren MW wurde für die Charakterisierung des mAk18H4 mittels MALDI-TOF-MS Sinapinsäure (engl. *sinapinic acid*, SA) als organische Matrixsubstanz verwendet. Diese ist im „double layer“ besonders gut für die Messung intakter Proteine geeignet und wird häufig für die Charakterisierung von Proteinen mit einem MW > 100 kDa verwendet (Moniatte et al., 1996; Schlosser et al., 2003; Tissot et al., 2005).

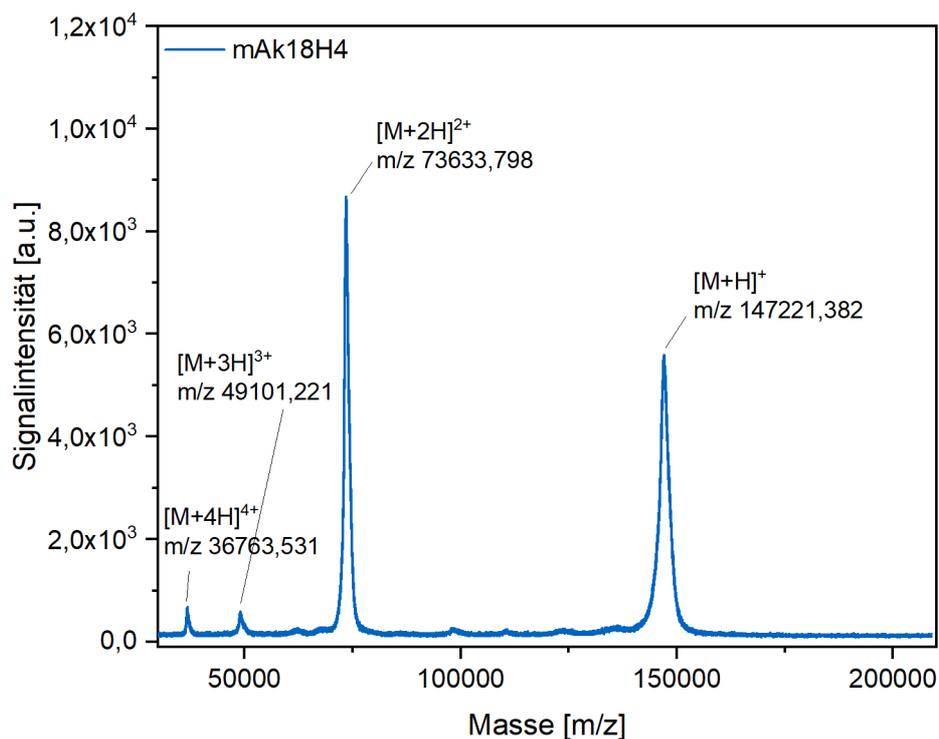


Abbildung 23: MALDI-TOF-MS-Spektrum von mAk18H4; Matrix: SA, double layer, Laserenergie: 100%.

Die MALDI-TOF-MS-Messungen des mAk18H4 ergaben Massenpeaks für [M+4H]⁴⁺, [M+3H]³⁺, [M+2H]²⁺ sowie [M+H]⁺ und ein MW von etwa 147 kDa (s. Abbildung 23).

Da die Kultivierung des Zellklons 18H4 für die Produktion des aufgereinigten Antikörpers in Serum-freiem Medium erfolgte und der Anteil am Gesamtprotein nach Aufreinigung des

Antikörpers über eine Affinitätschromatographie unter Verwendung einer Protein G-Säule rechnerisch bei etwa 1% lag, ist davon auszugehen, dass die Elutionsfraktion nahezu frei von Rinder-IgG war und auszuschließen, dass es sich bei der detektierten Masse um Rinder-IgG handelte. Weiterhin wiesen die Massenpeaks keine prominenten Schultern auf, was auf eine hohe Reinheit der Antikörper-Lösung schließen lässt. Diese hohe Reinheit war besonders im Hinblick auf die Bestimmung der Affinitätskonstanten mittels SPR-Spektroskopie und ITC von besonderer Bedeutung, da ohne den Einsatz exakter Mengen des mAk keine exakte Bestimmung der Bindungskonstanten möglich ist.

3.2. Affinitätsbestimmungen des murinen mAk18H4

Für eine ausführliche Charakterisierung des mAk18H4 erfolgten als Ausdruck der Antikörperaffinität die Bestimmung des IC_{50} -Werts mittels ELISA sowie die Bestimmung weiterer thermodynamischer Bindungskonstanten mittels ITC und SPR-Spektroskopie.

3.2.1. Affinitätsbestimmung mittels indirekt kompetitivem ELISA

Anhand des halbmaximalen Absorptionssignals (IC_{50}) kann in einem indirekt kompetitiven ELISA die Affinität eines Antikörpers gegenüber seinem Antigen näherungsweise ermittelt werden. Dazu werden üblicherweise zunächst die Konzentrationen des *Coating*-Antigens und des primären Antikörpers so lange reduziert, bis eine weitere Verringerung der Konzentrationen keine Verbesserung des IC_{50} -Werts erzielt oder das messbare Absorptionssignal nach ausreichender Entwicklungszeit zu gering ist. Aus den gemessenen Kalibrierkurven bei optimalen Bedingungen wird schließlich der IC_{50} -Wert sowie der lineare Arbeitsbereich (IC_{20} - IC_{80}) bestimmt. Außerdem lassen sich der LOD- und der LOQ-Wert ermitteln. Für die Bestimmung des IC_{50} -Werts wurden MTP mit Retronecin-BSA (ohne Linkerstruktur, *coating*-Antigen) mit einer ermittelten optimalen Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ und für eine maximal effiziente Adsorption an die Polystyrol-Oberfläche über Nacht (ÜN) bei 4°C beschichtet. Das verwendete Konjugat (s. Abschnitt 3.1.2) wies eine geringe Kopplungsrate von ein bis zwei Retronecin-Molekülen pro BSA-Molekül auf. Die Blockierung unbesetzter Bindungsstellen auf der MTP erfolgte durch die Inkubation mit einer Lösung aus 1% Casein in PBS. Die ermittelte optimale Konzentration des primären Antikörpers mAk18H4 lag abhängig vom Alter des mAk bei 260 ng/ml beziehungsweise 520 ng/ml in PBS. Die Kalibrierung beziehungsweise Konkurrenz mit dem PA-Grundkörper Retronecin erfolgte über einen Konzentrationsbereich von 0,001 - 100 $\mu\text{g/ml}$ PBS. Für die Detektion gebundener primärer Antikörper an immobilisierte *Coating*-Antigene wurde ein sekundärer HRP-gekoppelter anti-Ratte-IgG-Antikörper (aus Ziege) mit einer Konzentration von 180 ng/ml PBS eingesetzt. Die Farbreaktion durch die Umsetzung von TMB wurde nach etwa 10 min gestoppt und das

Absorptionssignal bei 450 nm ausgelesen. Die aus der sigmoidalen Kalibrierkurve (s. Abbildung 24) durchschnittlich ermittelten Parameter sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

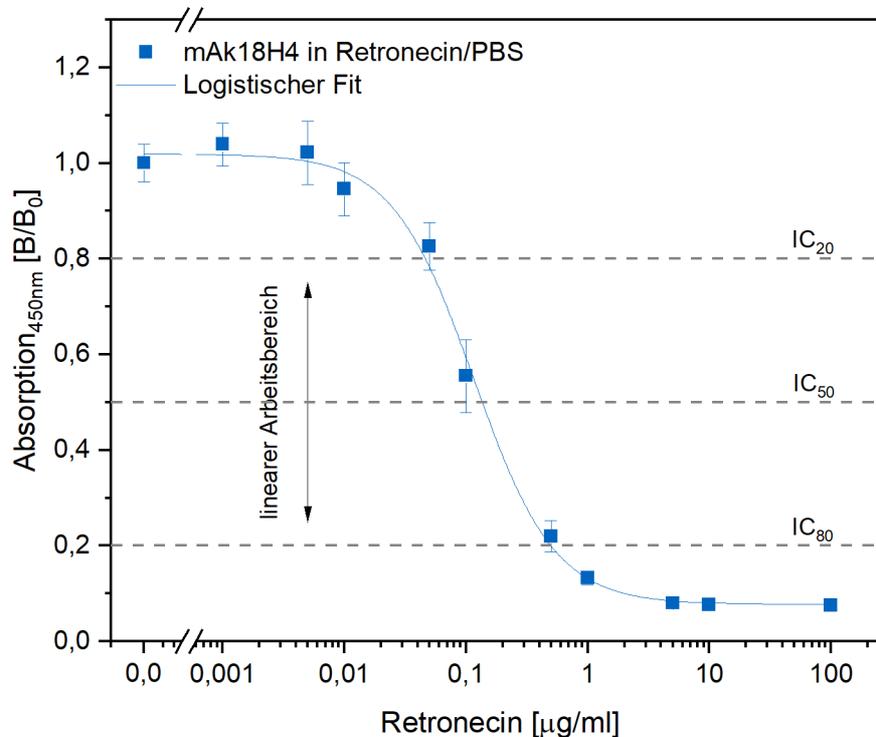


Abbildung 24: Kalibrierkurve für den aufgereinigten mAk18H4 unter optimierten Bedingungen; Konzentration *coating*-Antigen 1 µg/ml, Konzentration primärer Antikörper (mAk18H4) 260 ng/ml oder 520 ng/ml, Konzentration sekundärer Antikörper (HRP-gekoppelter anti-Ratte-IgG-Antikörper aus Ziege) 180 ng/ml, Kalibrierung 0,001 - 100 µg/ml Retronecin in PBS; n=7, m=3, Fehler repräsentiert die Standardabweichung.

Tabelle 2: Ermittelte analytisch relevante Parameter aus der Kalibrierkurve für mAk18H4.

	IC ₅₀ [ng/ml]	Linearer Arbeitsbereich IC ₂₀ -IC ₈₀ [ng/ml]	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]
mAk18H4	115,8 ± 30,3	61,9 - 500,8	29,9	96,6

So konnte für den mAk18H4 in PBS ein IC₅₀-Wert von durchschnittlich 115,8 ± 30,3 ng/ml, sowie ein linearer Arbeitsbereich (IC₂₀ - IC₈₀) von 61,9 - 500,8 ng/ml ermittelt werden. Der LOD lag bei 29,9 ng/ml, der LOQ bei 96,6 ng/ml. Die sich aus dem IC₅₀-Wert in grober Näherung ergebende Dissoziationskonstante (K_d) lag mit 746 nmol/l (7,46 × 10⁻⁷ M) im oberen nanomolaren Bereich. Vergleicht man die ermittelten Werte mit veröffentlichten analytischen Parametern von anti-PA mAk, wird eine signifikant höhere Bindungsaffinität des

mAk18H4 gegenüber Retronecin deutlich. So weist der von Sakamoto et al. veröffentlichte, für das PA Monocrotalin hochspezifische, mAk4B8 eine KR von 0,11% für Retronecin auf, was einem LOD von 44,36 ng/ml entspricht. Der von Zündorf et al. veröffentlichte Retrorsin-spezifische mAk hingegen zeigt gegenüber dem PA-Grundkörper keine KR.

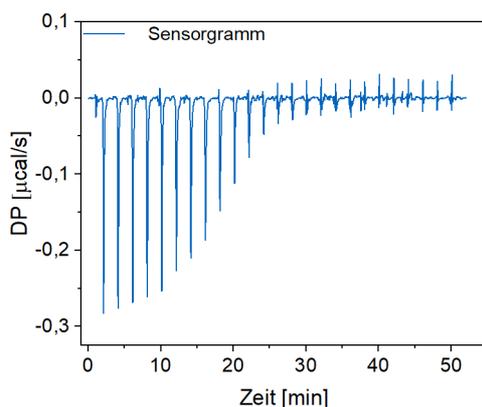
Der etablierte ELISA wurde im Folgenden auch für die Untersuchungen der Stabilität des mAk18H4 in Gegenwart unterschiedlicher organischer Lösungsmittel, pH-Werte und pflanzlicher Rohextrakte sowie für die Quantifizierung reduzierter PANO eingesetzt.

3.2.2. Bestimmung thermodynamischer Bindungskonstanten mittels ITC und SPR-Spektroskopie

Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten und weiterer thermodynamischer Parameter der Interaktion von mAk18H4 und Retronecin mittels ITC, wurde das Antigen Retronecin schrittweise zum mAk18H4 titriert und die benötigte Heizleistung für den Ausgleich der Temperatur zwischen Referenz- und Messzelle gemessen. Sobald es zu einer Sättigung des Paratops kam, führte das Hinzufügen des Antigens zu keiner weiteren messbaren Temperaturänderung mehr. Da es sich bei der Wechselwirkung zwischen mAk18H4 und Retronecin um eine exotherme Reaktion handelt, war die ermittelte Differenzheizleistung (DP) negativ (s. Abbildung 25a).

a)



b)

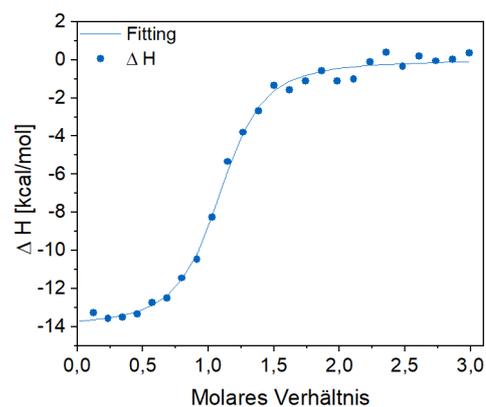


Abbildung 25: Rohdaten ITC-Messung der exothermen Reaktion von mAk18H4 (8,8 μM) mit Retronecin (132 μM) (a) und angepasste (Bindungsmodell 1:1) Titrationskurve/Isotherme der integrierten Signalspitzen des Sensorgramms (b).

Durch die Integration der Signalspitzen des Sensorgramms wurde die Isotherme (s. Abbildung 25b) ermittelt, welche durch Wahl des Bindungsmodells für eine 1:1-Interaktion zur

Berechnung der Dissoziationskonstanten K_d (Steigung der Isotherme), der Bindungsstöchiometrie N (Wendepunkt der Isotherme) sowie der Reaktionsenthalpie ΔH ($\text{Signalmaximum}_{\text{Isotherme}} - \text{Signalminimum}_{\text{Isotherme}}$) verwendet wurde. Weiterhin konnten Parameter der thermodynamischen Signatur (ΔG , ΔS) der Reaktion zwischen mAk18H4 und Retronecin bestimmt werden (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Mit ITC bestimmte durchschnittliche Dissoziationskonstante K_d , Werte für ΔH , ΔG , $-T\Delta S$ und die Bindungsstöchiometrie N , $n=3$, Fehler repräsentiert die Standardabweichung.

Titrant	K_d [M]	ΔH [kcal/mol]	ΔG [kcal/mol]	$-T\Delta S$ [kcal/mol]	N
Retronecin	$2,13 \times 10^{-7} \pm 9,00 \times 10^{-8}$	$-13,67 \pm 0,85$	$-9,15 \pm 0,29$	$4,55 \pm 1,12$	$1,09 \pm 0,03$

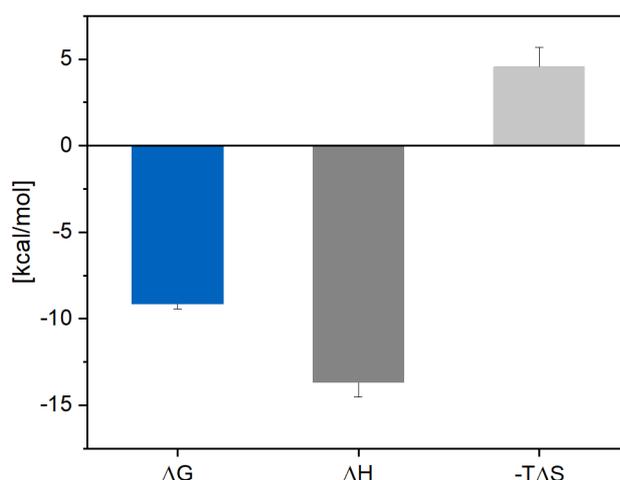


Abbildung 26: Mit ITC ermittelte thermodynamische Parameter für die Interaktion von mAk18H4 und Retronecin, $n=3$, Fehler repräsentiert die Standardabweichung.

Für die Dissoziationskonstante K_d ergab sich ein Wert von $2,13 \times 10^{-7} \pm 9,00 \times 10^{-8}$ M. Der negative Wert für die Reaktionsenthalpie ΔH von $-13,67 \pm 0,85$ kcal/mol deutet auf die interaktionsbedingte Entstehung von Wasserstoffbrücken- und weiteren nichtkovalenten Bindungen hin. Der positive Wert für die Entropie $-T\Delta S$ von $4,55 \pm 1,12$ kcal/mol hingegen gibt Hinweis auf einen Verlust von Freiheitsgraden durch die bimolekulare Reaktion von mAk18H4 und Retronecin.

Der Wert der Bindungsstöchiometrie N lag für das vorliegende Experiment bei $1,09 \pm 0,03$ und damit etwas über 1. Setzt man bei der bimolekularen Reaktion von Antigen und Antikörper eine 1:1-Interaktion voraus, ist die Abweichung wahrscheinlich auf eine fehlerhafte Konzentration entweder des Antigens oder des Antikörpers zurückzuführen. Wahrscheinlicher ist eine fehlerhafte Konzentration des Antikörpers, was durch die durchgeführten SPR-Messungen bestätigt werden konnte.

Eine ITC-Messung für die Interaktion des mAk18H4 und BSA ergab erwartungsgemäß keine unspezifische Interaktion (Daten nicht gezeigt).

Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie)

Im Unterschied zur ITC kann über die SPR-Spektroskopie die Charakterisierung der Dynamik einer molekularen Interaktion anhand der Bestimmung der Ratenkonstanten k_a und k_d erfolgen. Für ihre Bestimmung ist im Gegensatz zur ITC die Immobilisierung eines der beiden Reaktionspartner der bimolekularen Reaktion auf einer Sensoroberfläche erforderlich. Für die Charakterisierung der Interaktion zwischen Antikörper und Antigen hat sich die Immobilisierung des Antikörpers (*Antibody-capture* Format) auf der Oberfläche des Sensorchips bewährt. Dadurch können Aviditätseffekte vermindert und die Aktivität des Antigens erhalten werden. Häufig wird zu diesem Zweck eine carboxymethylierte Dextran-Matrix mit immobilisiertem rekombinanten Protein G verwendet. Protein G bindet spezifisch den Fc-Teil von IgG (Bjorck et al., 1984) und sorgt somit für eine gerichtete Immobilisierung des Antikörpers auf der Sensoroberfläche.

Für die Bestimmung der Ratenkonstanten k_a und k_d sollte das maximale Analytsignal (R_{max}) einen Wert von 100 RU nicht übersteigen. Die benötigte Ligandendichte (R_L) auf der funktionalisierten Chipoberfläche lässt sich dabei nach Formel 9 ermitteln.

$$R_{max} = \frac{MW_{Analyt}}{MW_{Ligand}} \cdot R_L \cdot s \quad (9)$$

$R_{max} = 100$ RU

$R_L =$ Ligandendichte auf
Sensoroberfläche

$s =$ Stöchiometrisches
Verhältnis

Analyt = Retronecin-BSA

Ligand = mAk18H4

Da die Verwendung von Retronecin als Analyt aufgrund seines geringen MW und folglich eines nicht messbaren Analytsignals nicht möglich war, wurde für die SPR-Messungen das bereits eingeführte Retronecin-BSA-Konjugat ohne Linkerstruktur verwendet. Unter Berücksichtigung des MW des mAk18H4 (147 kDa) sowie des Retronecin-BSA-Konjugats (67

kDa) und Auflösung der Formel nach R_L konnte eine für die Messung der Kinetik notwendige RU von 110 ermittelt werden. Die berechnete Ligandendichte war jedoch nicht ausreichend, um eine Kinetik messbar zu machen. Zu vermuten ist, dass die Fab-Fragmente einiger mAk nicht korrekt gefaltet waren. Infolgedessen wurde die Ligandendichte in Flusszelle 2 über längere Immobilisierungszeiten auf einen Wert von $R_L=1000$ erhöht.

Die Bestimmung der Affinitäts- und Dissoziationsratenkonstanten (k_a und k_d) sowie die daraus resultierende Dissoziationskonstante (K_d) erfolgte über die Messung einer *single cycle* Kinetik (SCK). Hierfür wurden beginnend mit der niedrigsten Konzentration jeweils 120 s Retronecin-BSA (Assoziationsphase) und anschließend jeweils 180 s Laufpuffer (Dissoziationsphase) über den Sensorchip geleitet. Für die Bestimmung der Ratenkonstanten wird die Konzentration des Analyten üblicherweise über einen Bereich von 0,1 - 10 beziehungsweise $100 \times K_d$ titriert. Bei einer im Fließgleichgewicht (engl. *steady state*) ermittelten Dissoziationskonstante K_d von $6,74 \times 10^{-6}$ M (s. Abbildung 27) wurde Retronecin-BSA entsprechend über einen Konzentrationsbereich von 1,88 - 30 μM titriert.

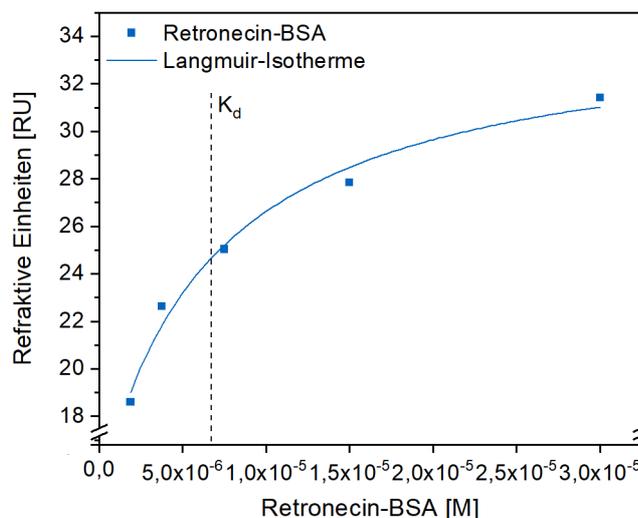
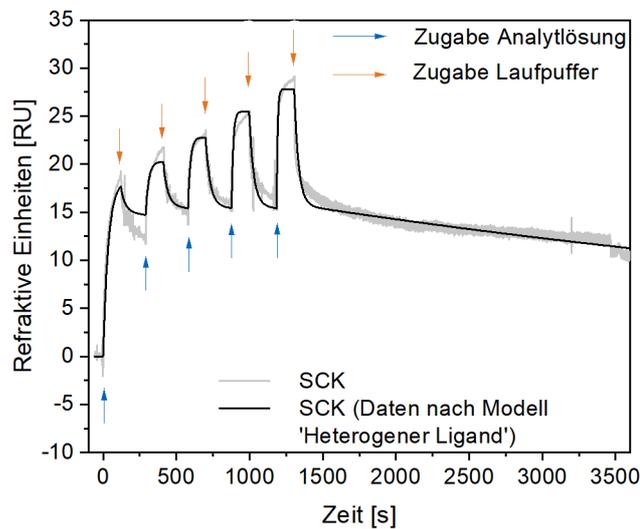


Abbildung 27: Ermittelte $R_{U_{max}}$ im Fließgleichgewicht (*steady state*) bei Titration der Analytkonzentrationen von 1,88 - 30 μM . Das Fitting der Daten ergibt die Dissoziationskonstante im Gleichgewicht K_d (gestrichelte Linie) als Wendepunkt der Langmuir-Isotherme.

Nach Injektion der höchsten Analytkonzentration wurde der Chip für weitere 35 min mit Laufpuffer gespült. Das erhaltene Sensorgram (s. Abbildung 28a) wurde unter Verwendung eines geeigneten Fitting-Modells für die Berechnung der Ratenkonstanten k_a und k_d verwendet. Für die Anpassung der Daten und unter Berücksichtigung der Dissoziation des mAk18H4 von der Chipoberfläche als am besten geeignet, erwies sich das Modell für einen heterogenen Liganden. Dieses Modell legt zugrunde, dass ein heterogener Ligand vorliegt

und es zur Ausbildung zweier Komplexe (Komplex 1 und Komplex 2) aus Ligand und Analyt mit unterschiedlichen Halbwertszeiten und dementsprechend jeweils individuellen und unterschiedlichen k_a -, k_d - und folglich K_d - Werten kommt.

a)



b)

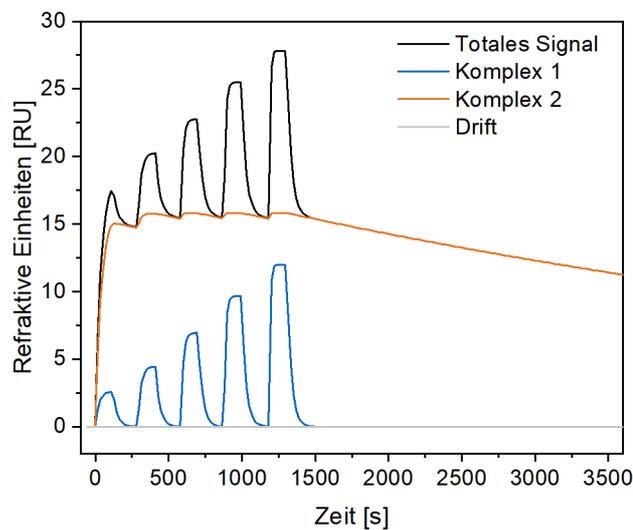


Abbildung 28: Sensorgramm für die Analyse der Kinetik der Interaktion von mAk18H4 mit Retronecin-BSA - Die Zugabe der Analytlösung erfolgte jeweils für 60 s (Assoziationsphase), die Zugabe von Laufpuffer für jeweils 180 s (Dissoziationsphase); Anpassung der Daten mit Hilfe des Modells ‚Heterogener Ligand‘ (a); Zerlegung des angepassten Sensorgramms in einzelne zur Kinetik beitragende Komponenten: Komplex 1, Komplex 2 und Drift (b).

Es ergaben sich einerseits ein relativ instabiler Komplex 1 und andererseits ein stabilerer Komplex 2 (s. Abbildung 28b). Die erhaltenen Ratenkonstanten sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Mittels SPR-Spektroskopie bestimmte kinetische Konstanten k_a , k_d und K_d .

	k_a [1/Ms]	k_d [1/s]	K_d [M]
Steady state			$6,74 \times 10^{-6}$
Komplex 1	$3,63 \times 10^3$	$3,43 \times 10^{-2}$	$9,46 \times 10^{-6}$
Komplex 2	$1,40 \times 10^4$	$1,49 \times 10^{-4}$	$1,06 \times 10^{-8}$

Die unterschiedliche Stabilität der Komplexe wird vor allem durch den Vergleich der ermittelten k_d -Werte von $3,43 \times 10^{-2}$ M für Komplex 1 und $1,49 \times 10^{-4}$ M für Komplex 2 deutlich. Komplex 1 wies mit einem K_d -Wert von $9,46 \times 10^{-6}$ M einen im Vergleich zum über die Analyse der Interaktion zwischen mAk18H4 und Retronecin-BSA im Fließgleichgewicht ermittelten K_d -Wert von $6,74 \times 10^{-6}$ M (s. Abbildung 27) ähnlichen Wert auf. Die Bildung des stabileren Komplex 2 war durch einen K_d -Wert von $1,06 \times 10^{-8}$ M charakterisiert.

Die Entstehung zweier Komplexe mit unterschiedlichen Halbwertszeiten lässt sich möglicherweise durch die Ausbildung eines instabileren Komplexes aus mAk18H4 und nur einem Retronecin-Molekül als monovalente Interaktion sowie eines stabileren Komplexes aus mAk18H4 und zwei Retronecin-Molekülen auf einem oder zwei Konjugaten als bivalente Interaktion erklären. Dabei zeigte sich für die Bildung von Komplex 1 eine deutlichere Abhängigkeit von der eingesetzten Analytkonzentration, wohingegen die Bildung von Komplex 2 eine schnelle Sättigung zeigte. Da der Chip durch Zugabe von BSA in den Laufpuffer mit einem dem eingesetzten Retronecin-Konjugat entsprechenden Proteinträger abgesättigt war und auch die ITC-Messungen keine Interaktion des mAk18H4 mit BSA detektieren konnte, kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem zusätzlichen Komplex um eine unspezifische Interaktion des mAk18H4 mit BSA handelte.

Vergleich der über ITC und SPR-Spektroskopie ermittelten Affinitätskonstanten

Die mittels ITC und SPR-Spektroskopie ermittelten K_d -Werte für die monovalente Interaktion von mAk18H4 und Retronecin lagen mit Werten von $2,13 \times 10^{-7} \pm 9,00 \times 10^{-8}$ M (ITC) und $6,74 \times 10^{-6}$ M beziehungsweise $9,46 \times 10^{-6}$ M (SPR) in einem sehr ähnlichen Bereich. Allerdings sind ITC und SPR-Spektroskopie und damit die ermittelten K_d -Werten nur bedingt

vergleichbar, da sich das Messprinzip und das Design der Experimente deutlich unterscheiden. Bei der ITC liegen beide Bindungspartner in Lösung vor, bei der SPR-Spektroskopie hingegen ist einer der beiden Bindungspartner auf der Sensorchipoberfläche immobilisiert. Zusätzlich wurde für die Bestimmung der K_d -Werte mittels ITC Retronecin als Titrant verwendet, wohingegen bei der SPR-Spektroskopie aufgrund des zu geringen MW von Retronecin das Retronecin-BSA-Konjugat verwendet werden musste. Dennoch stehen die K_d -Werte aus beiden Messprinzipien in guter Übereinstimmung mit dem im ELISA vom IC_{50} -Wert abgeleiteten K_d -Wert. Dieser lag bei einer Analytkonzentration von $115,8 \pm 30,3$ ng/ml und damit bei $7,46 \times 10^{-7}$ M. Es sei erwähnt, dass ein direkter Vergleich zwischen IC_{50} - und K_d -Wert nur unter Annahme eines Fließgleichgewichts sinnvoll und daher für einen kompetitiven ELISA nur bedingt zulässig ist (Cheng et al., 1973).

3.3. Untersuchung der Kreuzreaktivitäten gegenüber verschiedenen Retronecin-, Heliotridin- und Otonecin-basierten PA

Da für die Immunisierung und damit Generierung des mAk18H4 der PA-Grundkörper Retronecin verwendet wurde, sollte weiterhin untersucht werden, ob der Antikörper eine Bindung von kompletten Retronecin-basierten und damit strukturell verwandten offenkettigen und makrozyklischen PA oder auch mit Heliotridin- und Otonecin-basierten PA zeigte. Ausgewählte Retronecin-basierte PANO wurden ebenfalls in die Untersuchungen einbezogen. Insgesamt wurden für 29 PA und PANO die KR ermittelt. Dies erfolgte für alle Strukturen mit einem indirekt kompetitiven ELISA über einen äquimolaren Konzentrationsbereich von 0,01 - 100 µg/ml aus Stammlösungen in PBS. Die Berechnung der KR für die einzelnen Substituenten erfolgte im Vergleich zu Retronecin (Antigen) (s. Formel 5). Eine vollständige Auflistung aller untersuchten PA sowie der für den betrachteten Konzentrationsbereich ermittelten KR sind in Tabelle 5, eine Übersicht über alle für die Untersuchungen der KR eingesetzten molekularen PA-Strukturen in Tabelle 9 (Anhang) zusammengefasst.

Tabelle 5: Übersicht über ermittelte KR gegenüber 29 PA und PANO für den mAk18H4, n=2-3 (KR \leq 1%: -), Fehler repräsentiert die Standardabweichung.

Pyrrolizidinalkaloid (PA)	Kreuzreaktivität [%]
Retronecin	100
Retronecin-basierte, offenkettige PA	
Intermedin (Im)	177,0 \pm 58,6
7-O-Acetylintermedin (AcIm)	94,9 \pm 7,7

7-O-Acetyllycopsamin (AcLy)	66,9 ± 10,3
Indicin (Ic)	59,3 ± 14,0
Lycopsamin (Ly)	33,0 ± 1,4
Echimidin (Em)	-

Retronecin-basierte, makrozyklische PA

Seneciophyllin (Sp)	216,9 ± 6,9
Integerrimin (Ig)	93,2 ± 2,4
Monocrotalin (Mc)	14,4 ± 5,6
Trichodesmin (Td)	12,9 ± 4,6
Sceleratin (Sl)	12,7 ± 4,7
Senecionin (Sc)	10,0 ± 0,9
Merenskin (Mk)	9,8 ± 1,8
Retrorsin (Re)	7,6 ± 0,3
Merepoxin (Mx)	5,7 ± 1,5
Jacolin (Jl)	3,7 ± 1,0
Erucifolin (Ec)	3,0 ± 1,7
Senecivernin (Sv)	3,0 ± 0,8
Jacobin (Jb)	-

Retronecin-basierte PANO

Retronecin-N-Oxid	-
Seneciophyllin-N-Oxid	-
Integerrimin-N-Oxid	-
Intermedin-N-Oxid	-

Heliotridin-basierte PA

Heliotridin (Hd)	29,6 ± 1,3
Heliotrin (Ht)	2,8 ± 1,0
Lasiocarpin (Lc)	2,6 ± 0,2
Europin (Eu)	2,0 ± 0,5

Otonecin-basierte PA

Otonecin (On)	-
Senkirkin (Sk)	-

Die umfangreichen Untersuchungen ergaben für Retronecin-basierte PA sehr unterschiedliche Ergebnisse mit teilweise hoher KR für offenkettige und makrozyklische PA. Mit einer einzigen Ausnahme, dem Em, zeigten alle untersuchten offenkettigen Retronecin-basierten PA eine KR > 30%. Für Im ergab sich mit $177,0 \pm 58,6\%$ sogar eine KR > 100%, was auf die Ausbildung eines im Vergleich zu Retronecin stabileren Immunkomplexes mit mAk18H4 schließen lässt. Strukturell unterscheidet sich Em als offenkettiger Diester von den übrigen PA vor allem durch die an Position C7 veresterte C₅-Angelicasäure. Alle weiteren offenkettigen Retronecin-basierten PA liegen entweder als Monoester (Im, Ly, Ic) vor oder sind an Position C7 lediglich acetyliert (AcIm, AcLy). An Position C9 ist Em über eine Echimidinsäure, Im und AcIm jeweils über eine (+)-Trachelanthinsäure und Ly und AcLy über eine (-)-Viridiflorinsäure verestert. Ic hingegen ist an Position C9 der Necinbase Retronecin über eine (-)-Trachelanthinsäure verestert (s. Abbildung 29).

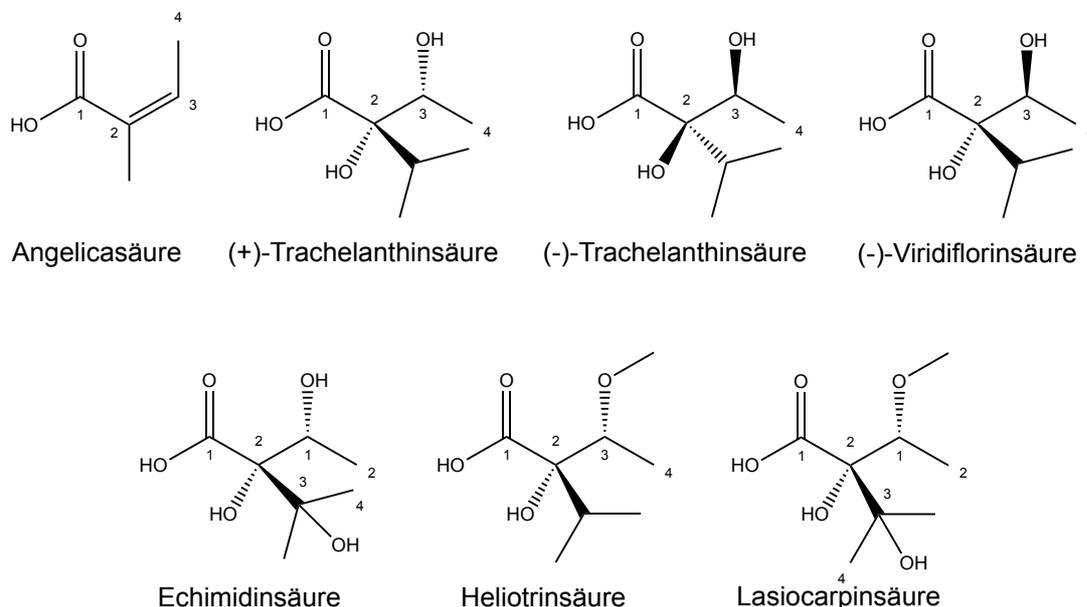


Abbildung 29: Ausgewählte C₅- und C₇-Monocarbonsäuren, welche als Necinsäuren mit den Necinbasen Retronecin und Heliotridin offenkettigen Mono- oder Diester bilden (Roeder, 1995).

Strukturell unterscheiden sich die PA folglich nur minimal in den Topizitäten weniger Stereozentren der veresterten Necinsäuren, was jedoch zu deutlichen Unterschieden in den ermittelten KR führte.

In der Gruppe der makrozyklischen Retronecin-basierten Diester konnten nur für die PA Sp mit $216,9 \pm 6,9\%$ und Ig mit $93,2 \pm 2,4\%$ KR $> 30\%$ ermittelt werden. Alle anderen untersuchten PA zeigten Werte deutlich $< 15\%$. Da für Sp genau wie für Im eine KR $> 100\%$ ermittelt werden konnte, ist der ausgebildete Immunkomplex besonders stabil. Strukturell unterscheiden sich die elf- oder zwölfgliedrigen makrozyklischen Diester durch die über die Positionen C7 und C9 des PA-Grundkörpers Retronecin veresterten unterschiedlichen Dicarbonsäuren. So ist Sp mit einer Seneciophyllinsäure, Ig mit einer Integerrinecinsäure, Mc mit einer Monocrotalinsäure, Td mit einer Trichodesminsäure, Sl mit einer Sceleranecinsäure, Sc mit einer Senecinsäure, Mk mit einer Chlordeoxyscleraneceinsäure, Re mit einer Isatinecinsäure, Mx mit einer Epoxyscleraneceinsäure, Jl mit einer Jacolinecinsäure, Ec mit einer Erucifolinecinsäure, Sv mit einer Seneciverninsäure und Jb mit einer Jacobinecinsäure verestert (s. Abbildung 30). Die Dicarbonsäuren unterscheiden sich dabei teilweise ebenfalls nur in geringem Maße durch die Stereochemie einzelner Stereozentren (vgl. Seneciophyllin- und Senecinsäure) oder auch deutlich durch die Anzahl substituierter Methylgruppen oder funktioneller und polarer Gruppen wie Hydroxylgruppen und Epoxidfunktionen. Die Chlordeoxyscleraneceinsäure weist außerdem ein Chloratom auf.

Für die untersuchten PANO hingegen konnte keine KR ermittelt werden. Gleiches gilt für Otonecin-basierte PA. Hier konnten weder für den Grundkörper noch für das makrozyklische PA Sk, welches einen Diester mit einer Integerrinecinsäure (s. Abbildung 30) bildet, eine KR bestimmt werden. Für Heliotridin-basierte PA konnte für den Grundkörper eine KR von knapp 30% ermittelt werden. Keine signifikanten KR ($< 3\%$) hingegen ergaben sich für die drei weiteren untersuchten Heliotridin-basierten PA Ht, Lc und Eu, welche sich wiederum in ihren veresterten Necinsäuren unterscheiden. So ist Ht an Position C9 mit einer Heliotrinsäure, Lc und Eu hingegen mit einer Lasiocarpinsäure verestert. Lc ist als offenkettiger Diester zusätzlich an Position C7 mit einer Angelicasäure verestert (s. Abbildung 29).

Ergebnisse und Diskussion

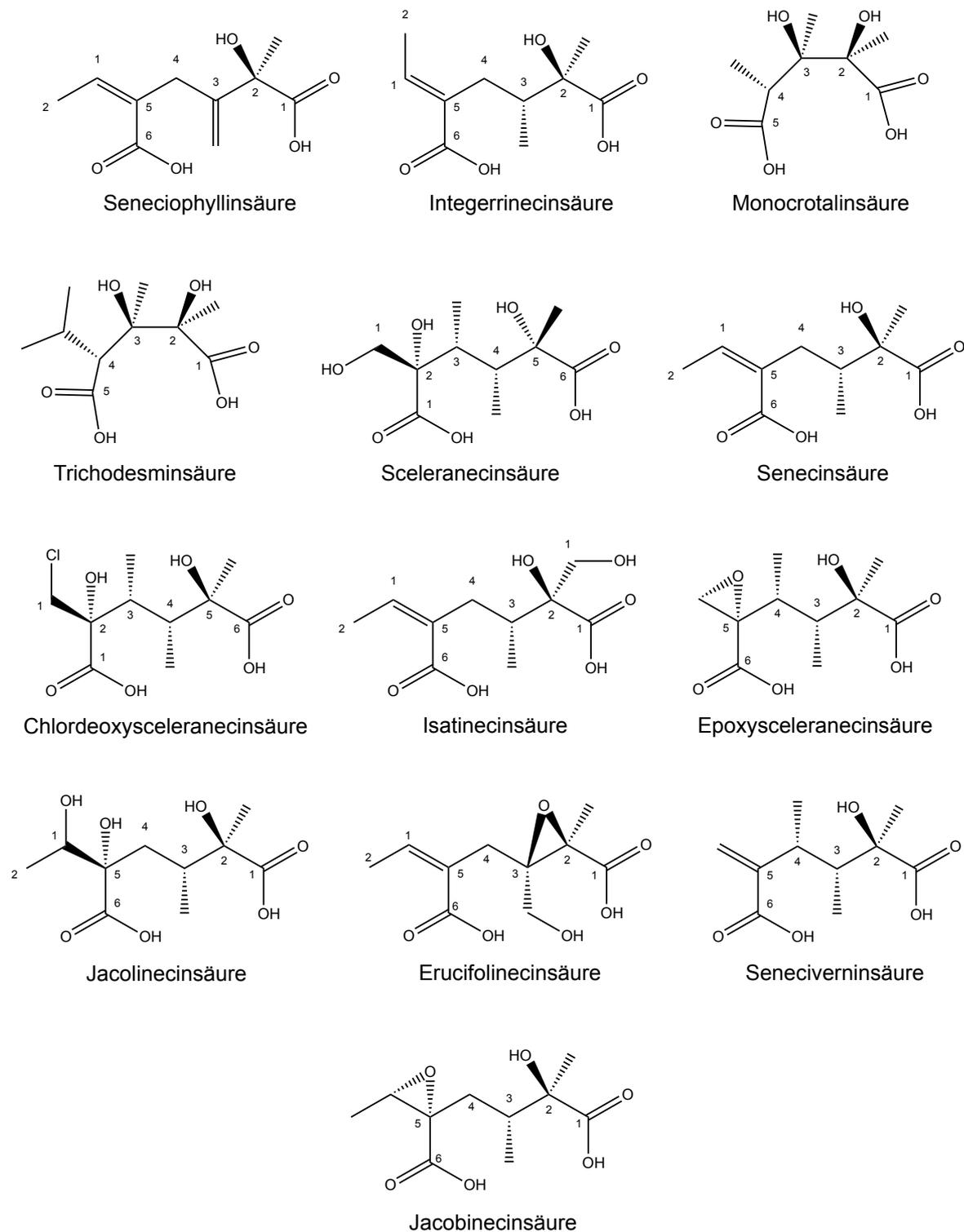


Abbildung 30: Ausgewählte Dicarbonsäuren, welche als Necinsäuren mit den Necinbasen Retro-necin und Otonecin makrozyklische PA bilden (Bredenkamp et al., 1985; De Waal et al., 1948; Drewes et al., 1982; Roeder, 1995).

3.3.1. Untersuchung der antigenen Determinante

Durch den Vergleich der für 29 PA ermittelten KR sollte die antigenen Determinante und damit das Epitop näher charakterisiert werden. Sie ist strukturell komplementär zum Paratop eines mAk. Dazu wurden zunächst die KR für verschiedene PA-Grundkörper und PANO verglichen. Aufgrund des Immunogen-Designs (s. Abbildung 14) unter Verwendung von Retronecin waren KR mit nicht-Retronecin-basierten PA als weitgehend unwahrscheinlich einzuschätzen, was für die Necinbase Otonecin bestätigt werden konnte. Dies lässt sich einerseits durch die Einführung einer Methylgruppe am tertiären Amin und andererseits durch die Oxidation an Position C8 sowie einer dadurch bedingten Entstehung eines monozyklischen Ringsystems und im Vergleich zum Retronecin stark abweichenden chemischen Struktur erklären (s. Abbildung 31). Folglich konnten auch für Otonecin-basierte PA keine KR detektiert werden. Gleiches gilt für alle untersuchten PANO, welche am tertiären Amin oxidiert sind und somit eine zusätzliche polare Gruppe im Grundkörper aufweisen (s. Abbildung 31).

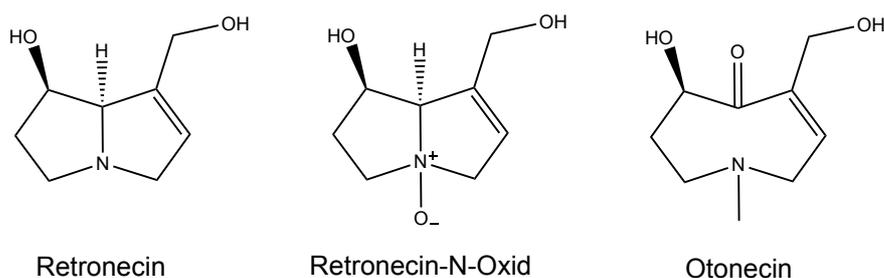


Abbildung 31: Strukturen von Retronecin, Retronecin-N-Oxid und Otonecin.

Die für den PA-Grundkörper Heliotridin ermittelte KR von etwa 30% lässt sich durch den nur geringen strukturellen Unterschied im Stereozentrum an der Position C7 erklären. Retronecin weist an dieser Stelle eine (*R*)-Konfiguration, Heliotridin hingegen eine (*S*)-Konfiguration auf (s. Abbildung 32). Für die Ausbildung des Immunkomplexes ist die räumliche Position der tertiären Hydroxylgruppe aber von besonderer Bedeutung. Es ist davon auszugehen, dass sie eine Rolle bei der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen mAk18H4 und Antigen spielt.

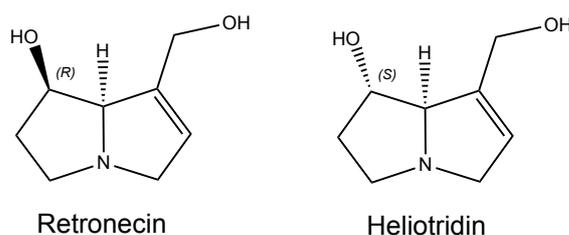


Abbildung 32: Strukturen der zueinander stereoisomeren PA-Grundkörper Retronecin und Heliotridin.

Im Kontext Retronecin-basierter offenkettiger und makrozyklischer PA konnten trotz der strukturellen Überschneidungen nicht für alle getesteten PA KR in gleicher oder ähnlicher Höhe detektiert werden. Anhand der teilweise über 100% liegenden KR lässt sich der strukturelle Einfluss der Linkerstruktur des Immunogens (s. Abbildung 14) auf die antigene Determinante erkennen. Die Stabilität des Immunkomplexes kann durch die Ausbildung des Carbonsäureesters über die primäre OH-Gruppe an Position C9 der Necinbase erhöht sein. Möglicherweise stabilisiert der Carbonsäureester als Teil der antigenen Determinante den Immunkomplex über die Ausbildung von Wasserstoffbrücken.

Weiterhin ließ sich beobachten, dass für die getesteten offenkettigen PA mit Ausnahme von Em höhere KR ermittelt werden konnten, als für alle makrozyklischen PA mit Ausnahme von Sp und Ig. Dabei beeinflusst die Acetylierung an Position C7 der Necinbase die Stabilität des Immunkomplexes negativ. So halbierte sich die ermittelte KR für AcIm (KR $94,9 \pm 7,7\%$) im Vergleich zu Im (KR $177,0 \pm 58,6\%$) nahezu. Konsequenterweise konnte für den offenkettigen Diester Em, welcher über die tertiäre OH-Gruppe an Position C7 nicht acetyliert, sondern mit einer raumfordernden C₅-Carbonsäure verestert ist, keine KR ermittelt werden. Da jedoch auch in der Gruppe der Monoester nicht für alle PA die gleiche KR ermittelt werden konnte, spielt höchstwahrscheinlich die räumliche Struktur der Necinsäuren auch gleicher Summenformel eine wichtige Rolle bei der Interaktion von mAk18H4 und den Kreuzreaktanden. Das wird besonders deutlich, wenn man die ermittelte KR für Im (KR $177,0 \pm 58,6\%$) und Ly (KR $33,0 \pm 1,4\%$) vergleicht, deren Necinsäuren (+)-Trachelanthinsäure und (-)-Viridiflorinsäure Stereoisomere sind und sich nur in der Topizität des Stereozentrums an Position C3 unterscheiden. Vergleicht man die Struktur mit der auf den Carbamatester folgenden Linkerstruktur des Immunogens, so weist diese eine deutlich geringere strukturelle Komplexität auf. Zusätzliche Methylgruppen sowie polare Gruppen können abschirmende Wirkung für die Ausbildung nichtkovalenter Interaktionen haben oder durch Raumforderung die räumliche Komplementarität zum Paratop herabsetzen.

Im Kontext der makrozyklischen PA lässt sich feststellen, dass die Einführung zusätzlicher polarer Gruppen wie Hydroxylgruppen oder auch Epoxide als Elektronendonoren in den Dicarbonsäuren zu einer starken Verminderung der KR führten und folglich die Ausbildung des Immunkomplexes negativ beeinflussten. Auch die Anzahl und Position von raumfordernden Methylgruppen beeinflusste die KR. Interessant sind in diesem Zusammenhang vor allem die unterschiedlichen ermittelten KR für die PA Sp (KR $216,9 \pm 6,9\%$) und Sc (KR $10,0 \pm 0,9\%$), welche sich lediglich durch die Substitution an Position C4 ihrer Necinsäuren mit einer Methylen- und einer Methylgruppe unterscheiden. Aus diesem Grund wurde die Betrachtung der räumlichen Struktur der PA in die Untersuchungen mit aufgenommen. Ausgewählte Verbindungen wurden hierbei in eine dreidimensionale Struktur überführt und die

potentielle Energie durch Optimierung von Bindungslänge und Torsionswinkel innerhalb der Moleküle unter Verwendung eines MM2 Kraftfelds (Allinger, 1977) minimiert. Die Moleküle wurden anschließend durch ein *Alignment* und Verwendung der Software FlexS (Lemmen et al., 1998) miteinander verglichen. Zu diesem Zweck wurden Retronecin als Basisfragment und Ankerstruktur definiert und darauf basierend das Testmolekül auf dem starren Referenzmolekül platziert. Unter Berücksichtigung der korrekten Bindungslängen, Torsionswinkel und Polaritäten, wurde das Testmolekül anschließend mit dem Referenzmolekül *aligned*. Die erhaltenen Konformationen wurden in Bezug auf die Qualität des *Alignments*, beispielsweise hinsichtlich sinnvoller Platzierung des Basisfragments, bewertet. Die Untersuchungen ergaben für den Vergleich der dreidimensionalen Strukturen von Sp und Sc, dass bei Platzierung der PA-Grundkörper vor allem der Carbonsäureester an Position C9 des Retronecins sowie die Hydroxylgruppen an Position C2 der beiden Necinsäuren nicht zur Deckung gebracht werden kann (s. Abbildung 33).

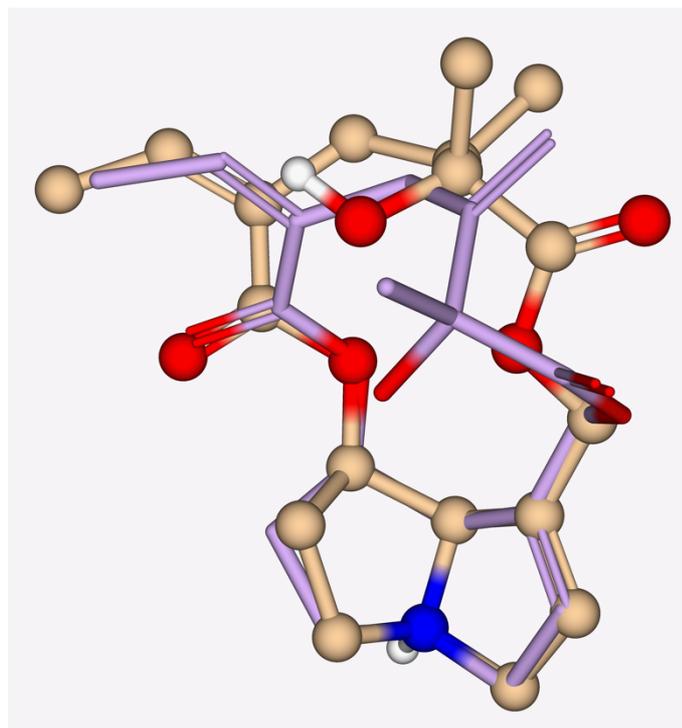


Abbildung 33: *Alignment* aus Sp (lila, Referenzstruktur) und Sc mit Retronecin als Basisfragment; N = blau, O = rot, H = weiß.

Betrachtet man hingegen das *Alignment* der Cis-Trans-Isomere Sp und Ig, so kann der Carbonsäureester bei nicht ganz vollständiger Platzierung der Basisfragmente besser zur Deckung gebracht werden (s. Abbildung 34), wodurch sich Ig deutlich besser in das Volumen des Sp einpassen lässt. Erklärbar wäre dadurch die hohe, jedoch im Vergleich zu Sp verminderte KR von $93,2 \pm 2,4\%$.

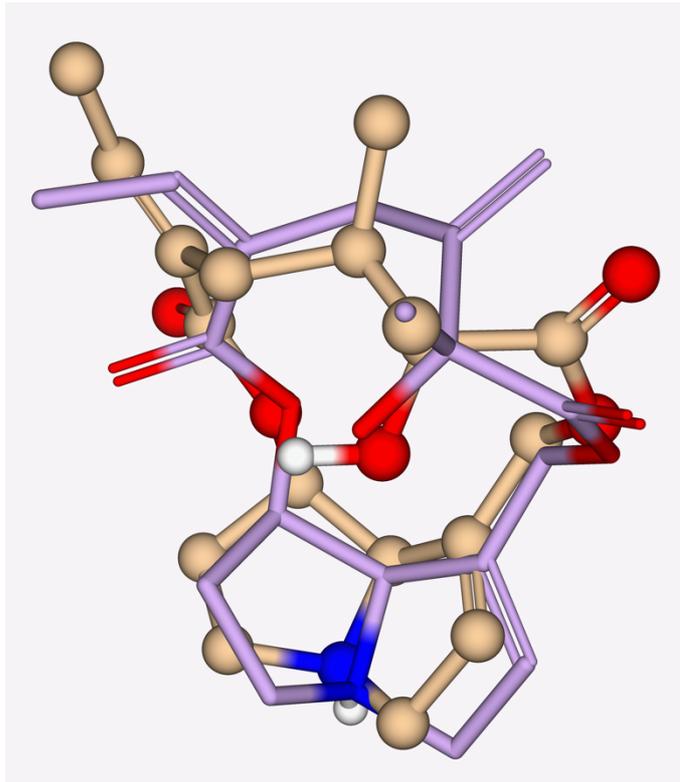


Abbildung 34: *Alignment* aus Sp (lila, Referenzstruktur) und Ig mit Retronecin als Basisfragment; N = blau, O = rot, H = weiß.

Vergleicht man die Konformation der PA Sp und Jb, für welche keine KR ermittelt werden konnte, ergeben sich wiederum starke Unterschiede in der Konformation der PA (s. Abbildung 35).

Die Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass geringe Unterschiede in der atomaren Zusammensetzung der Dicarbonsäure die Konformation des Makrozyklus und somit möglicherweise auch die Komplementarität zum Paratop und konsequenterweise die Stabilität des ausgebildeten Immunkomplexes deutlich beeinflussen. Monoester sind im Vergleich zu den rigiden makrozyklischen PA dabei deutlich flexibler, wodurch sich die allgemein höhere KR für offenkettige PA erklären lässt. Die strukturelle Determinante wird daher erwartungsgemäß von der Necinbase Retronecin sowie dem Carbonsäureester an Position C9 bestimmt. Sie steht in enger Beziehung zur Konformation des Carbamatesters des für die Immunisierung verwendeten Immunogens.

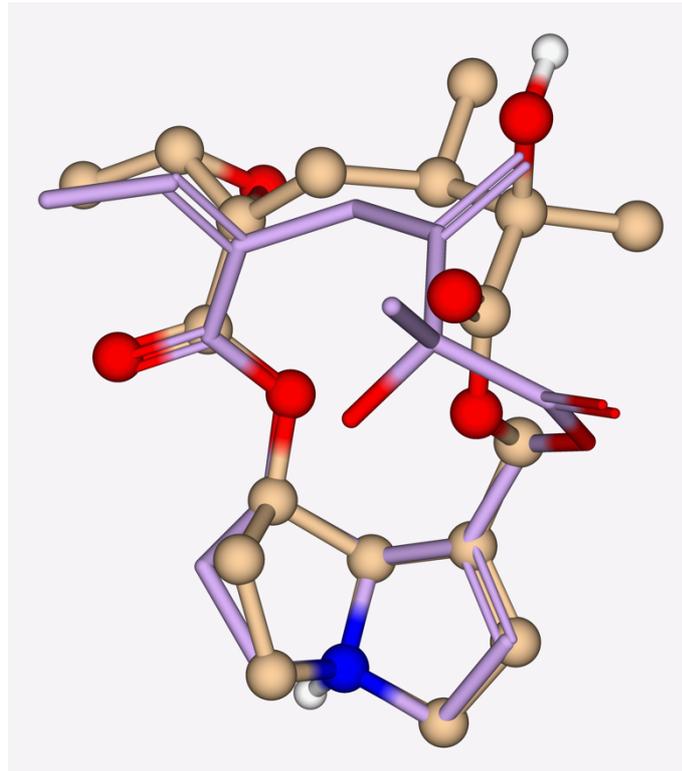


Abbildung 35: *Alignment* aus Sp (lila, Referenzstruktur) und Jb mit Retronecin als Basisfragment; N = blau, O = rot, H = weiß.

Weiterhin ist denkbar, dass zusätzliche Substituenten wie polare Hydroxylgruppen oder raumfordernde Methylgruppen den Immunkomplex destabilisieren, da sie entweder die Konformation des Makrozyklus und somit auch die des Carbonsäureesters beeinflussen oder auch die Wechselwirkung zwischen PA und mAk18H4 räumlich nicht zulassen.

Allgemein lässt sich weiterhin festhalten, dass weder die Konformationen des Immunogens oder der im Immunkomplex gebundenen PA, noch die Kristallstrukturen des mAk18H4 oder eines vollständigen Immunkomplexes bekannt waren. Aus diesem Grund basieren alle Überlegungen auf den Konformationen ungebundener PA. Weiterhin ist ein Einfluss von Aminosäureseitenketten des Proteinträgers auf die strukturelle Determinante des Antigens nicht auszuschließen.

3.4. Stabilitätsuntersuchungen des murinen mAk18H4

Die Stabilitätsuntersuchungen des mAk18H4 sollten Aufschluss über seine potentielle Anwendbarkeit im Kontext einer ELISA-basierten Quantifizierung von Retronecin-basierten PA in pflanzlichen Rohextrakten geben.

3.4.1. Stabilität gegenüber verschiedenen organischen Lösungsmitteln und pH-Werten

Die Sekundär- und Tertiärstruktur und damit Faltung und Konformation eines Antikörpers hat maßgeblichen Einfluss auf seine Funktion. Die durch Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe und ionische Wechselwirkungen sowie Van-der-Waals-Kräfte und Disulfidbrücken gebildete funktionelle Struktur kann durch Abweichungen von physiologischen Bedingungen (bspw. Temperatur, Scherkräfte, organische Lösungsmittel oder pH-Werte) denaturiert und folglich in ihren chemischen, biologischen und physikalischen Eigenschaften gestört werden (Neurath et al., 1944). Zusätzlich ist die reversible Interaktion zwischen Antikörpern und Antigenen durch nichtkovalente, wie beispielsweise elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen bestimmt (Van Regenmortel, 2009) und kann ebenfalls durch organische Lösungsmittel, extreme pH-Werte oder verschiedene Detergenzien reversibel beziehungsweise irreversibel negativ beeinflusst werden. Die Affinität eines Antikörpers und die messbaren analytischen Parameter in einem ELISA können folglich durch Gegenwart von organischen Lösungsmitteln oder pH-Wert-Änderungen negativ beeinflusst sein. Da für die Extraktion von PA aus verschiedenen pflanzlichen Matrices sowie ihre Aufarbeitung über SPE häufig Extraktionsmittel mit sehr niedrigen pH-Werten (Kaltner et al., 2018; Oplatowska et al., 2014) oder auch organische Lösungsmittel (Betteridge et al., 2005; Kempf et al., 2008) verwendet werden, musste die Stabilität und folglich die Affinität des mAk18H4 unter ausgewählten Bedingungen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde ein indirekt kompetitiver ELISA durchgeführt und das Antigen Retronecin für die Messung der Kalibrierkurve (0,01 - 100 µg/ml) in verschiedenen organischen, im Vergleich zu Wasser unpolareneren Lösungsmitteln (MeOH, EtOH und ACN), sowie Lösungen unterschiedlicher pH-Werte (pH 1,35, pH 4,68, pH 9,96) gelöst.

Es war zu beobachten, dass in Abhängigkeit erhöhter Konzentrationen organischer Lösungsmittel in der Probenlösung die IC_{50} -Werte anstiegen (s. Abbildung 36). Vor allem Alkohole, hierbei EtOH stärker als MeOH, und damit protische Lösungsmittel, beeinflussten den IC_{50} -Wert bereits ab einem Anteil von nur 10% in der Probenlösung. So stiegen die IC_{50} -Werte um jeweils etwa 150%, während das deutlich unpolare und aprotische Lö-

sungsmittel ACN die IC_{50} -Werte deutlich weniger beeinflusste. Diese stiegen auch bei einem Anteil von 20% ACN in der Probenlösung nur um etwa 40%. In allen Lösungsmitteln sanken außerdem die absolut messbaren Absorptionen für den Blindwert in Abhängigkeit der Lösungsmittelkonzentration. In ACN war dieser Effekt mit etwa 21% und knapp 40% geringer, als in den beiden Alkoholen EtOH und MeOH mit 38% und 57% beziehungsweise

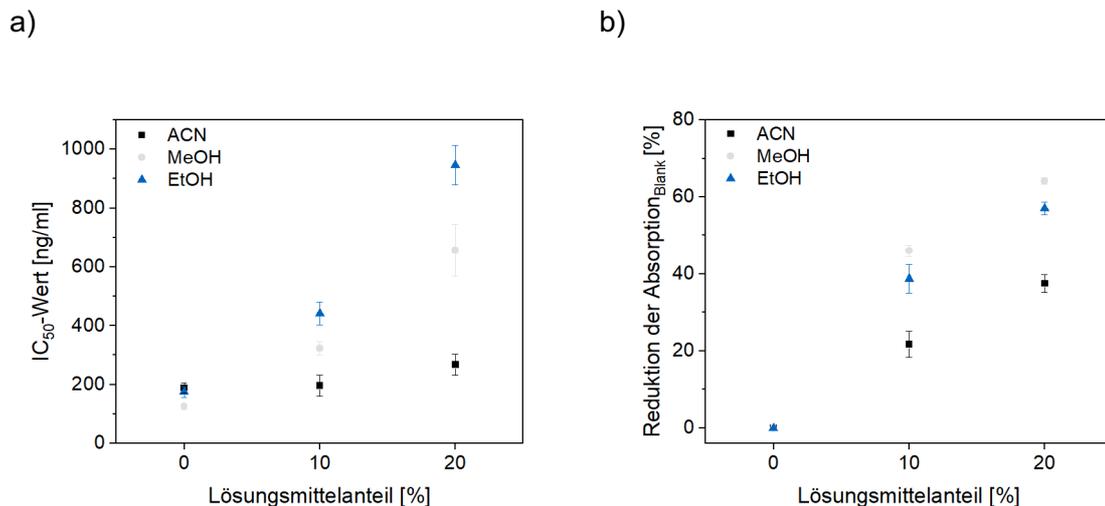


Abbildung 36: Mittels indirekt kompetitivem ELISA ermittelte IC_{50} -Werte für eine Kalibrierung (0,01 - 100 $\mu\text{g/ml}$) mit Retronecin (a) und Reduktion der messbaren Absorptionen bei 450 nm in Abwesenheit eines Analyten (b) für den mAk18H4 in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen organischer Lösungsmittel; $n=3$, $m=3$, Fehler repräsentiert die Standardabweichung.

46% und 64%. Der mAk18H4 zeigte somit gegenüber ACN eine höhere Stabilität als gegenüber den polareren Alkoholen. Die konzentrationsabhängige Denaturierung von Proteinen durch Alkohole, im speziellen Ethanol, ist vielfach beschrieben und wird mit der negativen Beeinflussung des hydrophoben Proteinkerns und dadurch bedingter Änderung der Faltung begründet (Ghosh et al., 2013; Herskovits et al., 1970). Für wässrige ACN-Lösungen ist die Beeinflussung der Sekundärstruktur und eine dadurch bedingte Faltungsänderung beschrieben (Griebenow et al., 1996). Allerdings ist die Ausprägung des negativen Effekts organischer Lösungsmittel auf die Proteinstruktur abhängig von ihrer individuellen Aminosäurezusammensetzung und damit Primärstruktur.

Da die Ladung eines Moleküls in einem ihm umgebenden Medium von dessen pH-Wert bestimmt wird, kann eine Änderung des pH-Werts zur Ladungsänderung und somit Umkehr von adsorptiven hin zu repulsiven Kräften und folglich zur negativen Beeinflussung ionischer Wechselwirkungen innerhalb der Struktur des Antikörpers sowie zwischen einem Antikörper und seinem Antigen führen. Besonders extreme pH-Werte können zu einer teilweisen oder auch vollständigen Denaturierung und damit dem Verlust der thermodynamischen Stabilität sowie der funktionellen Struktur des Antikörpers führen. Dabei wird eine hohe

thermodynamische Stabilität häufig im Bereich des isoelektrischen Punkts des Proteins beobachtet (Anderson et al., 1990).

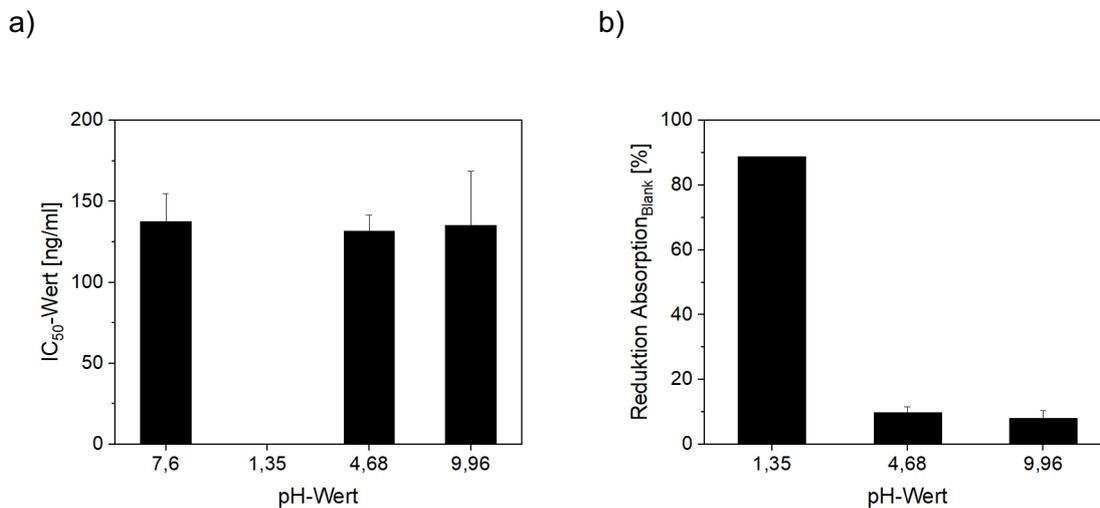


Abbildung 37: Mittels indirekt kompetitivem ELISA ermittelte IC₅₀-Werte für eine Kalibrierung (0,01 - 100 µg/ml) mit Retronecin (a) und Reduktion der messbaren Absorptionswerte bei 450 nm in Abwesenheit eines Analyten (b) für den mAk18H4 bei unterschiedlichen pH-Werten; $n_{\text{pH } 1,35}=1$, $n_{\text{pH } 4,68 - 9,96}=2$, $m=3$, Fehler repräsentiert die Standardabweichung.

Der mAk18H4 zeigte über einen Bereich von pH 4,68 - pH 9,96 eine hohe Stabilität und keine oder nur eine minimale negative Beeinflussung der bestimmten IC₅₀-Werte sowie der gemessenen Absorptionen bei 450 nm (s. Abbildung 37). Bei einem dem im Kontext der Extraktion von PA häufig eingesetzten Extraktionsmittel 0,05 M H₂SO₄ entsprechenden pH-Wert von 1,35 hingegen, konnte durch die starke Reduktion der Absorption kein IC₅₀-Wert gemessen werden, da der Antikörper präzipitierte.

Konsequenterweise muss für eine Bestimmung von PA in pflanzlichen Rohextrakten die Anpassung und damit Anhebung des pH-Werts auf einen Wert zwischen pH 4,68 - pH 9,96 vor einer ELISA-basierten Quantifizierung erfolgen. Dies wurde durch die Zugabe einer definierten Menge NaOH erreicht. Um den Rohextrakt nicht zusätzlich zu verdünnen, wurde für den Ausgleich des pH-Werts ein geringes Volumen von 9,26 µl/ml Extrakt einer konzentrierten NaOH-Lösung (32%) verwendet und als essentieller Schritt bei der Probenvorbereitung für die Quantifizierung von PA in Rohextrakten etabliert.

3.4.2. Stabilität in pflanzlichen Rohextrakten und Honig

Für eine potentielle Anwendung des mAk18H4 im Kontext eines indirekt kompetitiven ELISAs für die Bestimmung von Retronecin-basierten PA, war insbesondere eine Untersuchung der Stabilität des Antikörpers in relevanten Matrices wie Tee und Honig von Bedeutung. Die hohe Stabilität in Rohextrakten ist dabei von besonderem Interesse, da auf eine

zusätzliche zeitaufwendige Probenaufbereitung, beispielsweise über eine SPE, verzichtet werden kann. Häufig zeigen sich bei der qualitativen und quantitativen Analyse in Realproben jedoch sogenannte Matrixeffekte, welche durch endogene koextrahierte Verbindungen ähnlicher Polarität verursacht werden. Sie können die Interaktion zwischen Antikörper und Analyt negativ beeinflussen und sich somit auch negativ auf die Sensitivität des Assays auswirken. Um die Matrixeffekte näher zu untersuchen, wurden exemplarisch Rohextrakte aus den relevanten Matrices Pfefferminze, Fenchel und Kamille sowie aus Honig hergestellt.

Für die Herstellung pflanzlicher Extrakte wurde ein für PA etabliertes und publiziertes Protokoll einer Fest-Flüssig-Extraktion unter Verwendung verdünnter Schwefelsäure (0,05 M) als Extraktionsmittel eingesetzt (Kaltner et al., 2018). Gefriergetrocknete und nachweislich PA-freie Blätter/Blüten von Pfefferminze, Fenchel und Kamille sowie Honig wurden eingewogen und mit verdünnter Schwefelsäure versetzt. Nach einer Homogenisierung und Behandlung der Probe im Ultraschallbad erfolgte die Extraktion. Der filtrierte Überstand des Rohextrakts wurde nach Ausgleich des sauren pH-Werts mit konzentrierter NaOH-Lösung schließlich für die Herstellung der Retronecin-Kalibrierstandards (0,01 - 100 µg/ml) für den indirekten und indirekt kompetitiven ELISA verwendet (s. Abbildung 38).

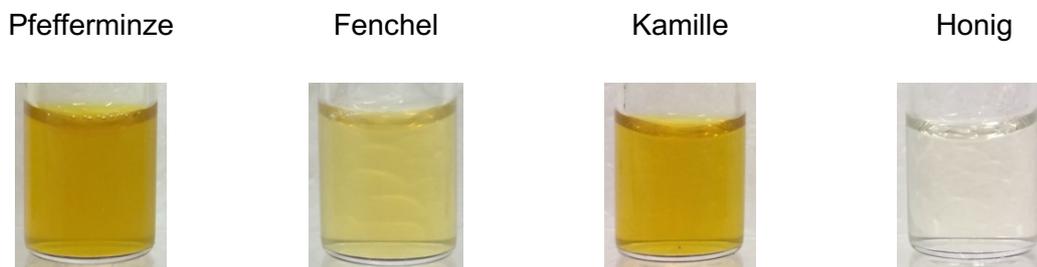


Abbildung 38: Filtrierte Rohextrakte aus Pfefferminze, Fenchel, Kamille und Honig nach Einstellung des pH-Werts mit NaOH.

Stabilität in Rohextrakten der pflanzlicher Matrices Pfefferminze, Fenchel und Kamille

Die Messungen mittels indirektem ELISA ergaben im Vergleich zu einer Messung in PBS für alle unverdünnten pflanzlichen Matrices eine starke Reduktion der gemessenen Absorptionswerte bei 450 nm in Abwesenheit eines Analyten (s. Abbildung 39). So zeigte sich mit $89,2 \pm 0,4\%$ für Pfefferminze, $87,3 \pm 6,5\%$ für Fenchel und $87,4 \pm 5,8\%$ für Kamille für alle pflanzlichen Rohextrakte eine ähnlich starke Matrix-bedingte Signalreduktion. Eine Kalibrierung in unverdünnten pflanzlichen Extrakten war folglich nicht möglich. Da alle pflanzlichen Rohextrakte eine grünlich-gelbliche Färbung aufwiesen (s. Abbildung 38), ist anzunehmen, dass es sich bei möglichen koextrahierten Matrixbestandteilen unter anderem um

Farbpigmente wie Chlorophylle und Xanthophylle handelte, welche potentiell auch für die beobachteten Matrixeffekte verantwortlich sein können. Da die Rohextrakte jedoch nicht im gleichen Maße pigmentiert waren, kann davon ausgegangen werden, dass neben den Pigmenten noch weitere Matrixbestandteile eine Rolle spielten. Prinzipiell gelten pflanzliche Matrices als sehr komplex (Chu et al., 2017), wobei die Zusammensetzung durch die Polarität des Extraktionsmittels bestimmt wird.

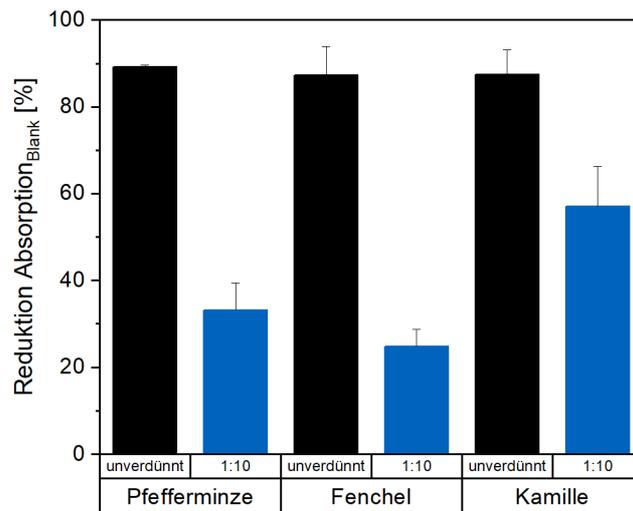


Abbildung 39: Mittels indirektem ELISA im Vergleich zu PBS ermittelte Signalreduktion der messbaren Absorptionswerte bei 450 nm in Gegenwart verschiedener unverdünnter oder im Verhältnis 1:10 (v/v) in PBS verdünnten pflanzlichen Matrices, $n_{\text{unverdünnt}}=2$, $n_{1:10}=7$, $m=3$, Fehler repräsentiert die Standardabweichung.

Negativ beeinflussende Matrixeffekte lassen sich im Kontext von Immunoassays häufig sehr effizient durch Verdünnung der Probe minimieren oder vollständig eliminieren (Abad et al., 1995; Oplatowska et al., 2014). Um die Verdünnung des Zielanalyten in der Matrix möglichst gering zu halten und gleichzeitig die Konzentration extrahierter Matrixbestandteile und folglich die Matrixeffekte so weit zu reduzieren, dass die Messung einer Kalibrierung und somit eine potentielle Quantifizierung von Retronecin möglich war, wurden die Rohextrakte einheitlich im Verhältnis 1:10 (v/v) in PBS verdünnt. Die Verdünnung konnte die Signalreduktion für gemessene Absorptionswerte in Abwesenheit eines Analyten deutlich reduzieren und lag für Pfefferminze bei nur noch $33,2 \pm 6,3\%$, für Fenchel bei $24,8 \pm 4,0\%$ und für Kamille bei $57,1 \pm 9,2\%$ (Abbildung 39).

Für die weitere Charakterisierung der Assay-Sensitivität wurde in den verdünnten Rohextrakten ein indirekt kompetitiver ELISA durchgeführt und die IC_{50} -Werte ermittelt. Es zeigten sich im Vergleich zu einer Messung in PBS sehr ähnliche, lediglich leicht erhöhte IC_{50} -Werte

von $146,7 \pm 19,6$ ng/ml für Pfefferminze und $140,5 \pm 25,6$ ng/ml für Fenchel sowie ein etwas deutlicher erhöhter IC_{50} -Wert von $200,2 \pm 74,3$ ng/ml für Kamille (s. Abbildung 40).

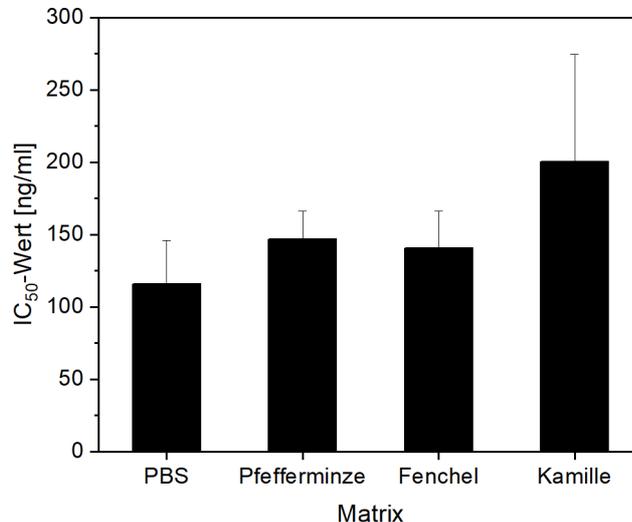


Abbildung 40: Mittels indirekt kompetitivem ELISA ermittelte IC_{50} -Werte für eine Kalibrierung (0,01 - 100 μ g/ml) mit Retronecin in PBS sowie in verschiedenen im Verhältnis 1:10 (v/v) in PBS verdünnten pflanzlichen Matrices, $n_{\text{PBS}}=7$, $n_{\text{Matrix}}=5$, $m=3$, Fehler repräsentiert die Standardabweichung.

Stabilität in Rohextrakten aus Honig

Auch die Matrix Honig ist im Kontext der PA von besonderer Relevanz und bereits mehrfach als mit PA kontaminiertes Lebensmittel dokumentiert. Aus diesem Grund wurde die Stabilität des mAk18H4 und des etablierten ELISAs auch in dieser Matrix untersucht. Wie für die bereits analysierten pflanzlichen Matrices, zeigte sich für eine Messung in unverdünntem Rohextrakt im indirekten ELISA eine im Vergleich zu PBS starke Reduktion der messbaren Absorption bei 450 nm in Abwesenheit eines Analyten (s. Abbildung 41), welche im Gegensatz zu den Pigmenten der pflanzlichen Rohextrakte vermutlich in erster Linie durch den hohen Glucose/Fructose-Anteil im Honig verursacht wurde.

Die Reduktion der Absorption lag mit $68,5 \pm 22,5\%$ zwar niedriger als für alle untersuchten pflanzlichen Matrices, trotzdem wurde als Kompromiss aus möglichst geringer Verdünnung des Analyten und gleichzeitig ausreichender Verdünnung der Störsubstanzen für eine potentielle Quantifizierung und Messung eine Kalibrierung, eine Verdünnung mit PBS im Verhältnis 1:10 (v/v) untersucht. Die Verdünnung konnte die Reduktion der messbaren Absorption auf einen Wert von $24,3 \pm 5,1\%$ reduzieren. Die Untersuchung der Assay-Sensitivität mittels indirekt kompetitivem ELISA ergab einen im Vergleich zu einer Kalibrierung in PBS sehr ähnlichen IC_{50} -Wert von $123,5 \pm 13,7$ ng/ml.

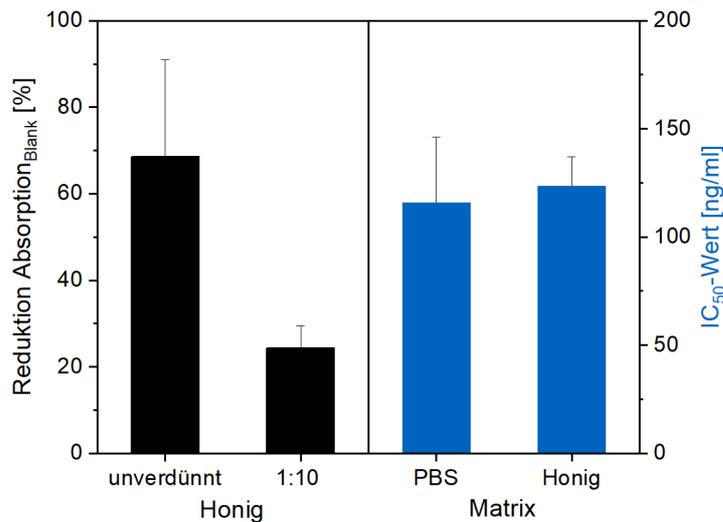


Abbildung 41: Mittels indirektem ELISA im Vergleich zu PBS ermittelte Signalreduktion der messbaren Absorptionswerte bei 450 nm in Gegenwart von unverdünntem oder im Verhältnis 1:10 (v/v) in PBS verdünntem Rohextrakt aus Honig (links); mittels indirekt kompetitivem ELISA durchschnittlich ermittelte IC₅₀-Werte für eine Kalibrierung (0,01 - 100 µg/ml) mit Retronecin in PBS oder in einem im Verhältnis 1:10 (v/v) in PBS verdünnten Rohextrakt aus Honig (rechts), $n_{\text{unverdünnt}}=2$, $n_{1:10}=7$, $n_{\text{PBS}}=7$, $n_{\text{Matrix}}=5$, $m=3$, Fehler repräsentiert die Standardabweichung.

Die beobachteten Matrixeffekte konnten in pflanzlichen Rohextrakten sowie Extrakten aus Honig durch eine Verdünnung im Verhältnis 1:10 (v/v) in PBS effektiv reduziert, jedoch nicht vollständig eliminiert werden. Da eine weitere Verdünnung der Extrakte auch die Konzentration des potentiellen Zielanalyten erheblich reduzieren würde, sollte die Quantifizierung von Retronecin zukünftig unter Verwendung eines *matrix-matched* Kalibrierstandards erfolgen. Diese Herangehensweise findet oftmals auch bei der massenspektrometrischen Quantifizierung von Analyten Anwendung, um negative Effekte chromatographisch koelutierter Matrixbestandteile auf die Ionisierung des Analyten ausschließen zu können (Taylor, 2005). Sie setzt jedoch die Verfügbarkeit einer nachweislich Analyt-freien Blank-Matrix voraus (Zhou et al., 2017) und kann mit einem Sensitivitätsverlust der analytischen Methode einhergehen. Um die Komplexität der Probe und folglich die Matrixeffekte zu reduzieren, ist weiterhin eine Fest-Flüssig-Extraktion unter Verwendung anderer Extraktionsmittel denkbar.

3.4.3. Stabilität in SPE-Eluaten

Um pflanzliche Extrakte unterschiedlicher Art vor einer quantitativen Analyse weiter aufzureinigen und somit die Komplexität der Probe zu verringern beziehungsweise den Analyten anzureichern, wird einer LC-MS-basierten Analyse häufig eine SPE vorgeschaltet (Nowak, 2003; Pukalskas et al., 2005). Sie kann jedoch den zeitlichen und finanziellen Aufwand

einer Analyse gravierend erhöhen. Da die Messung in pflanzlichen Extrakten nur nach Verdünnung in PBS möglich war, wurde in der vorliegenden Arbeit weiterhin untersucht, ob die Aufreinigung der Extrakte über eine im Kontext LC-MS-basierter PA-Analysen standardmäßig eingesetzten SPE mit einer Kationentauscher-Säule (Kaltner et al., 2018) und Elution in Ammoniak-haltigem MeOH eine mAk18H4-basierte Quantifizierung von PA in unverdünnten und möglicherweise angereicherten SPE-Eluaten ermöglichte. Hierzu wurde das eingedampfte SPE-Eluat aus je 10 ml Rohextrakt (pflanzlicher Matrix oder Honig) entweder in 1 ml PBS (s. Abbildung 42, entspricht einem 10-fach konzentrierten Rohextrakt), im Verhältnis 1:10 (v/v) verdünnt in PBS (entspricht einem unverdünnten Rohextrakt) oder im Verhältnis 1:100 (v/v) verdünnt in PBS (entspricht einem 10-fach verdünnten Rohextrakt) aufgenommen und die Signalreduktion im indirekten ELISA in Abwesenheit des Analyten (Blindwert) ermittelt.

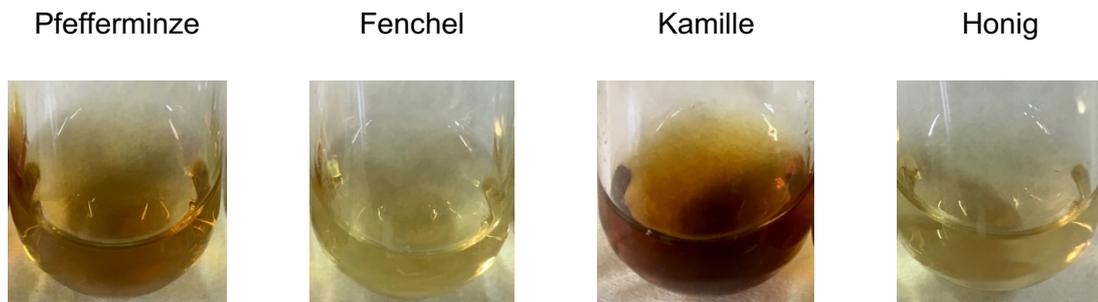


Abbildung 42: In 1 ml PBS rückgelöste SPE-Eluate aus je 10 ml Rohextrakt von Pfefferminze, Fenchel, Kamille und Honig.

Stabilität in SPE-Eluaten aus Rohextrakten der pflanzlichen Matrices Pfefferminze, Fenchel und Kamille

Die Ergebnisse des indirekten ELISAs (s. Abbildung 43) ergaben, dass eine Bestimmung im unverdünnten SPE-Eluat und damit konzentrierten Rohextrakt nicht möglich war. Es zeigte sich für alle Matrices eine 80-90%ige Reduktion der maximalen Absorption (Blindwert). Da die SPE-Eluate nach Rücklösung in PBS im Vergleich zu den bereits untersuchten Rohextrakten eine noch immer deutliche grünlich-bräunliche Färbung aufwiesen, ist davon auszugehen, dass Farbpigmente über die SPE nicht ausreichend abgereichert wurden und diese die Interaktion zwischen Analyt und Antikörper folglich weiterhin negativ beeinflussen konnten. Auch eine Verdünnung der Eluate im Verhältnis 1:10 (v/v) in PBS ergab eine Reduktion der maximalen Absorptionen in Abwesenheit eines Analyten von etwa 60% für Pfefferminze, 50% für Fenchel und knapp 80% für Kamille. Interessanterweise spiegelte die Absorptionsreduktion die unterschiedlich starke Färbung der Eluate wider (s. Abbildung 42). Eine Verdünnung der Eluate im Verhältnis 1:100 (v/v) in PBS konnte die Absorptionsreduktion mit $18,2 \pm 4,2\%$ für Pfefferminze, $21,5 \pm 7,4\%$ für Fenchel und $31,9 \pm 3,9\%$ für Kamille

im Vergleich zu einer Messung in PBS soweit reduzieren, dass eine Kalibrierung mit Retro-necin (0,01 - 100 µg/ml) möglich war.

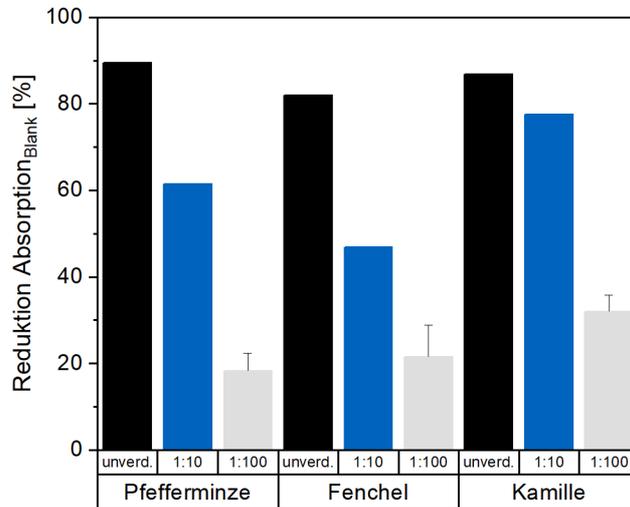


Abbildung 43: Mittels indirektem ELISA im Vergleich zu PBS ermittelte Signalreduktion der messbaren Absorptionswerte bei 450 nm in Gegenwart verschiedener unverdünnter oder im Verhältnis 1:10 (v/v) und 1:100 (v/v) in PBS verdünnten SPE-Eluaten aus Rohextrakten pflanzlicher Matrices, $n_{\text{unverdünnt}}=1$, $n_{1:10}=1$, $n_{1:100}=4$, $m=3$, Fehler repräsentiert die Standardabweichung.

Die Untersuchung der Assay-Sensitivität ergab einen für alle verdünnten pflanzlichen Matrices im Vergleich zu einer Kalibrierung in PBS leicht erhöhten IC_{50} -Wert von $165,6 \pm 10,1$ ng/ml für Pfefferminze, $128,1 \pm 4,3$ ng/ml für Fenchel und $166,4 \pm 34,3$ ng/ml für Kamille (s. Abbildung 44).

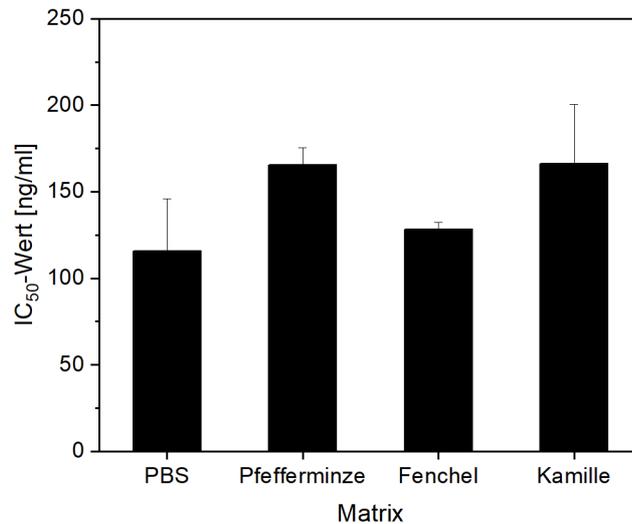


Abbildung 44: Mittels indirekt kompetitivem ELISA ermittelte IC₅₀-Werte für eine Kalibrierung (0,01 - 100 µg/ml) mit Retronecin in PBS sowie in verschiedenen im Verhältnis 1:100 (v/v) in PBS verdünnten SPE Eluaten aus Rohextrakten pflanzlicher Matrices, $n_{\text{PBS}}=7$, $n_{\text{Matrix}}=4$, $m=3$, Fehler repräsentiert die Standardabweichung.

Vergleicht man die Reduktion der Absorptionswerte und die ermittelten IC₅₀-Werte zwischen verdünntem Rohextrakt und entsprechend verdünntem SPE-Eluat (s. Tabelle 6), ergibt sich für alle Matrices eine leichte Verbesserung der Signalreduktion. Die Auswirkung auf die IC₅₀-Werte ist ebenfalls marginal. Allenfalls ist eine Abnahme der Standardabweichungen der IC₅₀-Werte im Vergleich zu den Bestimmungen in verdünnten Rohextrakte festzustellen.

Tabelle 6: Vergleich der Reduktion der maximalen Absorptionswerte (OD_{450nm}) im Vergleich zu einer Messung in PBS sowie der ermittelten IC₅₀-Werte für verdünnte pflanzliche Rohextrakte und SPE-Eluate, Fehler repräsentiert die Standardabweichung.

Matrix	Reduktion OD _{450nm} [%]		IC ₅₀ -Wert [ng/ml]	
	Rohextrakt 1:10	SPE-Eluat 1:100	Rohextrakt 1:10	SPE-Eluat 1:100
Pfefferminze	33,2 ± 6,3	18,2 ± 4,2	146,7 ± 19,6	165,6 ± 10,1
Fenchel	24,8 ± 4,0	21,5 ± 7,4	140,5 ± 25,6	128,1 ± 4,3
Kamille	57,1 ± 9,2	31,9 ± 3,9	200,2 ± 74,3	166,4 ± 34,3

Stabilität in SPE-Eluaten aus Honig-Rohextrakten

Auch für unverdünnte SPE-Eluate der Rohextrakte aus Honig waren Bestimmungen mit dem indirekten ELISA nicht möglich (s. Abbildung 45). Die Reduktion der Absorptionswerte im Vergleich zu einer Bestimmung in PBS in Abwesenheit eines Analyten betrug knapp 90%, was auf eine Anreicherung störender Matrixbestandteile über die SPE schließen lässt. Die Verdünnung im Verhältnis 1:10 (v/v) oder 1:100 (v/v) in PBS reduzierte diesen Wert auf etwa 25% und 12%.

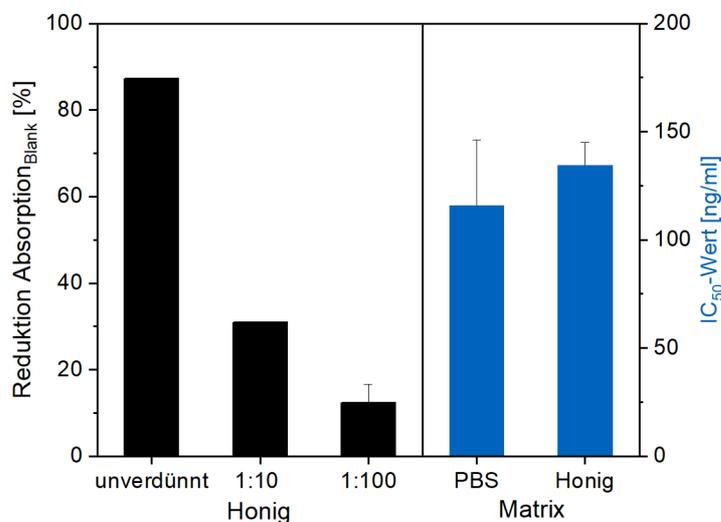


Abbildung 45: Mittels indirektem ELISA im Vergleich zu PBS ermittelte Signalreduktion der maximalen Absorptionswerte bei 450 nm in unverdünnten oder im Verhältnis 1:10 (v/v) und 1:100 (v/v) in PBS verdünnten SPE-Eluaten aus Honig- Rohextrakten (links); mittels indirekt kompetitivem ELISA ermittelte IC₅₀-Werte für eine Kalibrierung (0,01 - 100 µg/ml) mit Retronecin in PBS oder in im Verhältnis 1:100 (v/v) in PBS verdünnten SPE-Eluaten aus Honig-Rohextrakten (rechts), $n_{\text{unverdünnt}}=1$, $n_{1:10}=1$, $n_{1:100}=4$, $n_{\text{PBS}}=7$, $n_{\text{Matrix}}=5$, $m=3$, Fehler repräsentiert die Standardabweichung.

Die Bestimmung des IC₅₀-Werts in im Verhältnis 1:100 (v/v) in PBS verdünnten SPE-Eluaten ergab $134,6 \pm 10,5$ ng/ml. Da bei einer Verdünnung der SPE-Eluate im Verhältnis 1:10 in PBS die Signalreduktion im indirekten ELISA bereits auf 30% reduziert werden konnte, ist folglich eine Bestimmung in unverdünnten Rohextrakten nach einer SPE denkbar. Vergleicht man im speziellen die ermittelten IC₅₀-Werte (s. Tabelle 7) in im Verhältnis 1:10 (v/v) in PBS verdünnten Rohextrakten und im Verhältnis 1:100 (v/v) in PBS verdünnten SPE-Eluaten ergibt sich keine Verbesserung der Assay-Sensitivität.

Tabelle 7: Vergleich der Reduktion der maximalen Absorptionswerte (OD_{450nm}) im Vergleich zu einer Bestimmung in PBS sowie der ermittelten IC_{50} -Werte für in PBS verdünnte Rohextrakte und SPE-Eluate aus Honig, Fehler repräsentiert die Standardabweichung.

Matrix	Reduktion OD_{450nm} [%]		IC_{50} -Wert [ng/ml]	
	Rohextrakt 1:10	SPE-Eluat 1:100	Rohextrakt 1:10	SPE-Eluat 1:100
Honig	24,3 ± 5,1	12,4 ± 4,1	123,5 ± 13,7	134,6 ± 10,5

Die Matrixeffekte in den SPE-Eluaten konnten, vergleichbar mit den Verdünnungen der Rohextrakte, durch Verdünnung verringert, jedoch nicht vollständig eliminiert werden. Eine potentielle Quantifizierung von Repronocin ist jedoch durch Verwendung einer *matrix-matched* Kalibrierung möglich.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die Vorteile einer SPE durch Abreicherung unerwünschter extrahierter Matrixbestandteile in Honig-Rohextrakten nutzbringend angewendet werden könnten. Eine Verdünnung des SPE-Eluats im Verhältnis zum Rohextrakt ist nicht zwingend erforderlich. Dies lässt sich durch die im Vergleich zu pflanzlichen Matrices geringere Komplexität der Matrix Honig erklären. Für die pflanzlichen Rohextrakte bietet die SPE, basierend auf den vorliegenden Untersuchungen keine Vorteile, da die beobachteten Matrixeffekte nicht eliminiert werden konnten und weiterhin eine Verdünnung der Eluate im Verhältnis zum Rohextrakt erforderlich ist. Um eine effektive Abreicherung der Matrixbestandteile zu erzielen und somit die nötige Verdünnung der Extrakte auszuschließen, wäre die Testung weiterer Festphasen, auch als Tandem-SPE, mit der bereits etablierten Methode für die Aufreinigung der Rohextrakte denkbar.

3.5. Reduktion von PANO zu PA

Bedingt durch die Oxidation des tertiären Amins und die Einführung eines polaren Sauerstoffatoms konnten für N-Oxide keine KR ermittelt werden (s. Abschnitt 3.3). Da die Aminoxide aufgrund ihrer höheren Polarität jedoch die wasserlöslichere Speicherform von PA in Pflanzen darstellen und damit auch einer auf pflanzlichen Extrakten basierenden quantitativen Analysemethode zugänglich gemacht werden sollten, wurde geprüft, ob eine Zink-Staub-basierten Umwandlung (Reduktion) von PANO zu PA (Oplatowska et al., 2014) (s. Abbildung 46) als Teil der Probenvorbereitung die Quantifizierung von PANO mit dem etablierten mAk18H4-basierten indirekt kompetitiven ELISA ermöglichte.

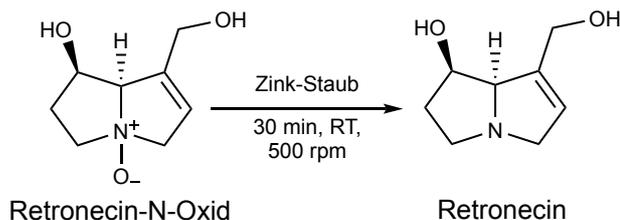


Abbildung 46: Reduktion von Retronecin-N-Oxid zu Retronecin mit Zink-Staub.

Zu diesem Zweck wurde 1 µg/ml Retronecin-N-Oxid, stellvertretend für Retronecin-basierte PA im Extraktionsmittel (0,05 M H₂SO₄) oder in Rohextrakten aus Fenchel und Honig, in Gegenwart von Zink-Staub reduziert. Der Überstand wurde nach Einstellung des pH-Werts mit NaOH auf pH 7,6 filtriert (0,45 µm PVDF-Spritzenfilter) und die Menge reduzierten Retronecin-N-Oxids nach Verdünnung im Verhältnis 1:10 (v/v) in PBS mit dem ELISA bestimmt. Zusätzlich wurde der Überstand im Verhältnis 1:20 (v/v) in Laufmittel A (H₂O, 5 mM Ammoniumformiat, 0,1% Ameisensäure) verdünnt und für eine qualitative sowie quantitative Überprüfung des Reduktionserfolgs mittels HPLC-MS (Kaltner et al., 2018) unter Einsatz einer *Polar embedded* C18-Selektivitätssäule und einer *matrix-matched* Kalibrierung verwendet.

In ersten Voruntersuchungen ergab sich erwartungsgemäß, dass im Vergleich zum reinen (Matrix-freien) Extraktionsmittel für die Matrices Fenchel und Honig eine höhere Menge Zink für die Reduktion der PANO zu PA nötig war. Dies ist durch die deutlich höhere Komplexität der Rohextrakte zu erklären. So wurde die Zinkmenge für Fenchel verdoppelt (2 g/ml Rohextrakt) und für Honig sogar verfünffacht (5 g/ml Rohextrakt). In Abhängigkeit der zunehmenden Zinkkonzentration konnte die Reduktionseffizienz deutlich gesteigert werden. So lag die mittels HPLC-MS ermittelte Reduktionseffizienz im Extraktionsmittel bei 51,1 ± 1,2%, in Fenchel bei 78,3 ± 0,9% und in Honig bei 107,9 ± 1,6% (s. Abbildung 47). Um in allen Matrices eine vollständige Reduktion zu ermöglichen, kann die Zink-Menge zusätzlich erhöht werden. Allerdings sollte eine Menge von 5 g/ml Extrakt aus praktischen Gründen nicht überschritten werden.

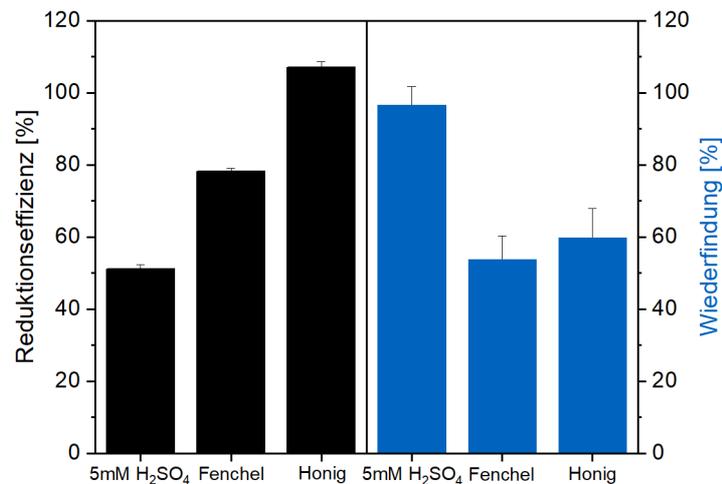


Abbildung 47: Mittels HPLC-MS ermittelte Reduktionseffizienz von Retronecin-N-Oxid (1 µg/ml) zu Retronecin mit Zink-Staub im Extraktionsmittel (5 mM H₂SO₄) und in Rohextrakten aus Fenchel und Honig (n=3) sowie die entsprechenden Wiederfindungsraten der reduzierten PANO im mAk18H4 basierten ELISA (n=3, m=3), Fehler repräsentiert die Standardabweichung.

Weiterhin wurde die Wiederfindungsrate (WFR) als Vergleich zwischen der HPLC-MS- sowie ELISA-basierten Quantifizierung ermittelt (s. Formel 10). Diese ergab nach Normierung der ermittelten Absorptionen auf den Blindwert für die Reduktion im Extraktionsmittel einen Wert von $98,1 \pm 5,4\%$, in Fenchel $53,8 \pm 6,5\%$ und in Honig $59,7 \pm 8,3\%$ (s. Abbildung 47).

$$\text{Wiederfindungsrate (WFR)} = \frac{X_{Ist}}{X_{Soll}} \quad (10)$$

$$X_{Ist} = [c] \text{ Analyt ELISA}$$

$$X_{Soll} = [c] \text{ Analyt HPLC-MS}$$

Da die Proben parallel prozessiert wurden, lässt sich die reduzierte WFR in den beiden ausgewählten Matrices Fenchel und Honig möglicherweise durch die Entstehung eines Niederschlags nach Zugabe der NaOH-Lösung zur Einstellung des pH-Werts in der Probe erklären. Dieser Niederschlag war im Vergleich zum reinen Extraktionsmittel sowohl in Fenchel als auch Honig deutlich ausgeprägter, konnte durch Filtration der Probe jedoch entfernt werden. Eine mögliche Erklärung könnte darin bestehen, dass durch die pH-Wert-Änderung zuvor gelöste Matrixbestandteile der Probe wieder ausfallen, welche reduzierte PANO unspezifisch adsorbieren und somit durch die anschließende Filtration aus der Probe entfernt werden.

Die Einstellung des pH-Werts ist jedoch essentieller Teil der Probenvorbereitung für die quantitative Analyse mittels ELISA, sodass ein Verzicht nicht möglich ist. Auch die Abtrennung des Präzipitats durch Filtration oder Zentrifugation ist als Teil der Probenvorbereitung unverzichtbar, da Proben für Antikörper-basierte Detektionsmethoden generell klar und ohne Präzipitat eingesetzt werden sollten. Andernfalls ist nicht auszuschließen, dass die Interaktion zwischen Antikörper und Analyt durch unlösliche Probenbestandteile gestört und folglich die Quantifizierung beeinträchtigt ist.

Die Quantifizierung reduzierter PANO mit Hilfe des etablierten ELISAs ist folglich möglich. Die Verbesserung (Erhöhung) der WFR setzt eine weitere Optimierung der Probenvorbereitung voraus.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch die Immunisierung mit einem neuartigen Quadratsäure-Linker-basierten Retronecin-Konjugat und das Screening von Hybridom-ZKÜ mit Hilfe eines Retronecin-Konjugats ohne Linkerstruktur ein neuer mAk18H4 generiert und selektiert werden. Der entwickelte und optimierte indirekt kompetitive ELISA ergab für den PA-Grundkörper Retronecin, gelöst in PBS, einen IC_{50} -Wert von $115,8 \pm 30,3$ ng/ml, einen linearen Arbeitsbereich von 62,9 - 500,8 ng/ml sowie einen LOD von 29,9 ng/ml. Damit zeigte der generierte mAk im Vergleich zu bisher veröffentlichten Arbeiten über die Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen PA (Sakamoto et al., 2017; Zündorf et al., 1997) eine höhere Sensitivität gegenüber der Necinbase Retronecin. Die Untersuchung und Charakterisierung der Bindungsaffinität gegenüber Retronecin mittels ITC und SPR-Spektroskopie ergaben für den mAk18H4 eine mittlere Dissoziationskonstante im unteren μ M-Bereich (10^{-6} - 10^{-7} M). Die Untersuchung der KR gegenüber 29 verschiedenen Retronecin-, Heliotridin- und Otonecin-basierten PA und PANO ergab für den mAk18H4 erwartungsgemäß eine hohe KR gegenüber Retronecin-basierten PA und insbesondere gegenüber offenkettigen Verbindungen wie Im (KR 177,0%), AcIm (KR 94,9%), AcLy (KR 66,9%), Ic (KR 59,3%) und Ly (KR 33,0%) sowie den makrozyklischen PA Sp (KR 216,9%) und Ig (KR 93,2%). Keine relevanten KR konnten gegenüber Heliotridin- und Otonecin-basierten PA sowie ausgewählten Retronecin-basierten PANO detektiert werden. Aus den ermittelten KR ergab sich weiterhin, dass die antigene Determinante und damit die zum Paratop komplementäre Struktur des Antigens, bedingt durch das für die Immunisierung verwendete Immunogen, nicht ausschließlich den PA-Grundkörper Retronecin umfasste. Vielmehr spielt die über die Hydroxylgruppe an Position C9 des Grundkörpers veresterte Dicarbonsäure und damit die Konformation der kompletten PA, eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung des Immunkomplexes. Weiterhin zeigte der mAk18H4 eine hohe Stabilität gegenüber einem breiten pH-Wert-Bereich (pH 4,68 - 9,96) sowie akzeptable Toleranzen gegenüber den getesteten organischen Lösungsmitteln ACN, MeOH und EtOH. Darüber hinaus wurde die Stabilität des etablierten ELISAs in relevanten pflanzlichen Rohextrakten aus Pfefferminze, Kamille, Fenchel sowie in Honig untersucht. Hier ergab sich für alle Matrices eine ausreichende Stabilität in im Verhältnis 1:10 (v/v) in PBS verdünnten Extrakten. Eine Quantifizierung von Retronecin in pflanzlichen Rohextrakten setzt jedoch aufgrund der festgestellten Signalreduktion zukünftig die Verwendung eines *matrix-matched* Kalibrierstandards voraus. In Extrakten aus Honig konnte die untersuchte und auf einer kationischen Festphase basierende SPE die Komplexität der Matrix ausreichend reduzieren, sodass eine Quantifizierung von Retronecin in unverdünnten SPE-Eluaten unter Verwendung eines *matrix-*

matched Kalibrierstandards möglich ist. Die Reduktion von PANO zu PA in unterschiedlichen Matrices sowie die anschließende Quantifizierung von PA mit Hilfe des etablierten ELISAs ergaben WFR von $98,1 \pm 5,4\%$ in Reduktionsmittel, $53,8 \pm 6,5\%$ in Fenchel und $59,7 \pm 8,3\%$ in Honig. Durch Anpassung der Probenaufbereitung nach der Reduktion erscheint eine Steigerung der WFR in pflanzlichen Matrices und Honig denkbar.

Einschätzung der Anwendbarkeit des mAk18H4 für das Screening von kontaminierten pflanzlichen Rohextrakten

Der mit Hilfe eines indirekt kompetitiven ELISAs unter Verwendung des mAk18H4 ermittelte lineare Arbeitsbereich für den PA-Grundkörper Retronecin lag in PBS bei 62,9 - 500,8 ng/ml ($\mu\text{g/l}$). Da die Quantifizierung von Retronecin in pflanzlichen Rohextrakten jedoch eine Verdünnung der Extrakte im Verhältnis 1:10 (v/v) in PBS voraussetzte, entspricht der lineare Arbeitsbereich 0,62 - 5 $\mu\text{g/ml}$ (mg/l). Berücksichtigt man weiterhin die eingesetzte Extraktionsmethode, in welcher 1 g getrocknetes pflanzliches Material oder Honig in 20 ml Extraktionsmittel extrahiert wird, könnte der etablierte indirekt kompetitive ELISA ab einer Kontamination von 12,4 mg/kg Retronecin oder Retronecin-Äquivalenten in pflanzlichem Rohmaterial und Honig und damit im Kontext hoch kontaminierte Proben eingesetzt werden. Besonders hoch belastete Proben werden in der Literatur vor allem für Kräutertees oder Nahrungsergänzungsmitteln beschrieben, welche auf PA-produzierenden Pflanzen basieren (s. Abschnitt 2.1.5). Die Testung der Stabilität des mAk18H4 in entsprechenden Rohextrakten steht in diesem Zusammenhang noch aus. Für geringer kontaminierte Proben ist der entwickelte ELISA gegebenenfalls nach Anpassung des Extraktionsprotokolls sowie der Optimierung der SPE-gestützten Aufreinigung der Extrakte einsetzbar. So könnten eine mögliche simultane Extraktion und Anreicherung von Matrixbestandteilen und die dadurch bedingten Matrixeffekte minimiert werden. Infolgedessen wäre eine Verdünnung der Extrakte oder SPE-Eluat nicht weiter erforderlich.

Für die gezielte Anreicherung von PA vor einer ELISA-basierten Quantifizierung mittels SPE ist neben gängigen Festphasen auch die Verwendung einer speziell geprägten Polymermatrix, bestehend aus MIPs, als *molecularly imprinted solid-phase extraction* (MISPE), denkbar. MIPs werden bereits vielfach als selektive Sorbenzien vor einer HPLC-gestützten Quantifizierung verschiedenster niedermolekularer Analyten eingesetzt (Gomes Costa Silva et al., 2010; Lai et al., 2004; Olcer et al., 2017; Yang et al., 2009), sind jedoch für PA bisher nicht beschrieben. Im Vergleich zu mAk-basierten Affinitätsanreicherungen bieten sie Vorteile in Hinblick auf eine kostengünstigere Herstellung (Vlatakis et al., 1993) sowie eine erhöhte chemische und physikalische Stabilität (Tamayo et al., 2007). Bei der häufig

eingesetzten *bulk* Synthese wird der Zielanalyt als Template in Gegenwart geeigneter funktioneller Monomere und *Cross-Linker* polymerisiert und anschließend aus dem Polymer entfernt. Es entsteht eine Bindungstasche oder Kavität, welche in ihrer Form und Größe komplementär zum Zielanalyten ist und letzteren über nichtkovalente Interaktionen wie Wasserstoffbrückenbindungen, π - π - und Van der Waals-Wechselwirkungen spezifisch bindet (s. Abbildung 48). (Haupt, 2003; Haupt et al., 2000)

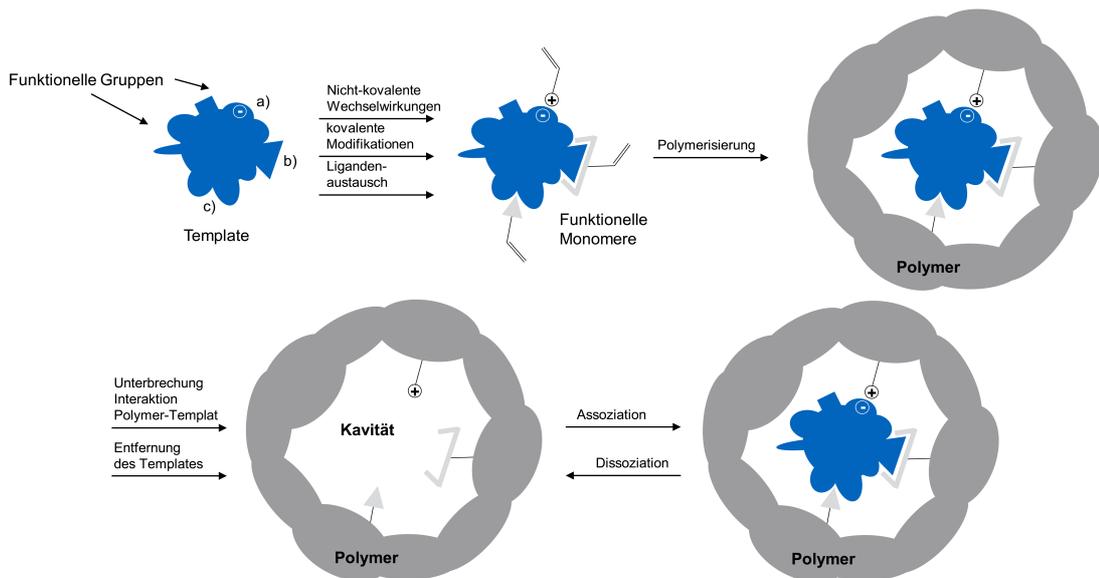


Abbildung 48: Schematische Darstellung der Synthese von MIPs (Gama et al., 2017).

Für eine radikalische Polymerisation werden in Abhängigkeit von funktionellen Gruppen des Analyten oftmals organische Vinyl- oder Acrylmonomere verwendet. Als *Cross-Linker* dienen häufig Acrylate und als Radikalstarter kommen Azoverbindungen zum Einsatz (Chen et al., 2016a). Als Porogene werden Lösungsmittel verwendet, in welchen alle Reaktionskomponenten ausreichend löslich sind und die Bildung von Polymeren mit gleichmäßiger Porenverteilung und großer Oberfläche begünstigen (Bird et al., 2018).

In einer ersten Machbarkeitsstudie zur Synthese von MIPs unter Verwendung eines PAs als Templat-Molekül, wurden Polymere in Gegenwart von Senecionin synthetisiert. Senecionin wurde als Retronecin-basiertes makrozyklisches PA ausgewählt, um möglichst große Bindungstaschen im Polymer zu generieren und somit auch einfach- und zweifach veresterte sowie makrozyklische PA und folglich eine hohe Bandbreite Retronecin-basierter PA zu binden. Unter Verwendung von 2-(Trifluormethyl)acrylsäure (engl. *2-(Trifluoromethyl)acrylic acid*, TFMAA) als funktionelles Monomer, Trimethylolpropan Trimethacrylat (engl. *Trimethylol-propane trimethacrylate*, TRIM) als *Cross-Linker*, sowie 2,2'-Azobis(2,4-dimethylvaleronitril) (ABDV) als Radikalstarter und ACN als Porgen, konnten durch eine

Fällungspolymerisation bei 40°C Polymere generiert werden, welche in einem Bindungsassay im Vergleich zu nicht geprägten Polymeren (engl. *non-imprinted polymers*, NIPs) sowohl in reinem als auch angesäuertem ACN Senecionin signifikant besser binden konnten (s. Abbildung 49) und damit vielversprechende Anwendungsmöglichkeiten im Rahmen der PA-Analytik andeuten. Für die potentielle Anwendung der synthetisierten MIPs ist eine Optimierung des Waschprotokolls unabdingbar. So muss sichergestellt werden, dass Senecionin vollständig aus dem frisch synthetisierten Polymer entfernt ist und während einer späteren Probenanreicherung kein Ausbluten (engl. *bleeding*) und damit eine Beeinflussung der PA-Konzentration während einer quantitativen Bestimmung auftritt. Weiterhin ist eine ausführliche Analyse der selektiven Adsorption von strukturell verwandten Retronecin-basierten PA erforderlich. Eine BET- (Brunauer-Emmett-Teller) Messung könnte über Gasadsorption außerdem Aufschluss über die massenbezogene spezifische Oberfläche der Polymere liefern (Brunauer et al., 1938; Sikiti et al., 2014).

Da der mAk18H4 zwar gegenüber einer relativ großen Anzahl Retronecin-basierter PA eine KR zeigte, allerdings bedingt durch die Struktur des verwendeten Immunogens nicht ausschließlich der PA-Grundkörper Retronecin die antigene Determinante umfasste, wurden folglich nicht alle Retronecin-basierten PA gleichermaßen erkannt. Demzufolge kann der etablierte ELISA nicht direkt als Summenmethode für die Bestimmung von Retronecin-Äquivalenten eingesetzt werden. Um dem mAk18H4-basierten Immunoassay alle Retronecin-basierten PA zugänglich zu machen und damit auch die Konzentration des PA-Grundkörpers in pflanzlichen Extrakten etc. zu erhöhen, besteht die Möglichkeit, die Reduktion voll veresterter PA zu ihrem korrespondierenden Grundkörper unter Verwendung des Reduktionsmittels Lithiumaluminiumhydrid (LiAlH_4) (Cramer et al., 2013; Kempf et al., 2008) als Teil der Probenvorbereitung zu etablieren (s. Abbildung 50).

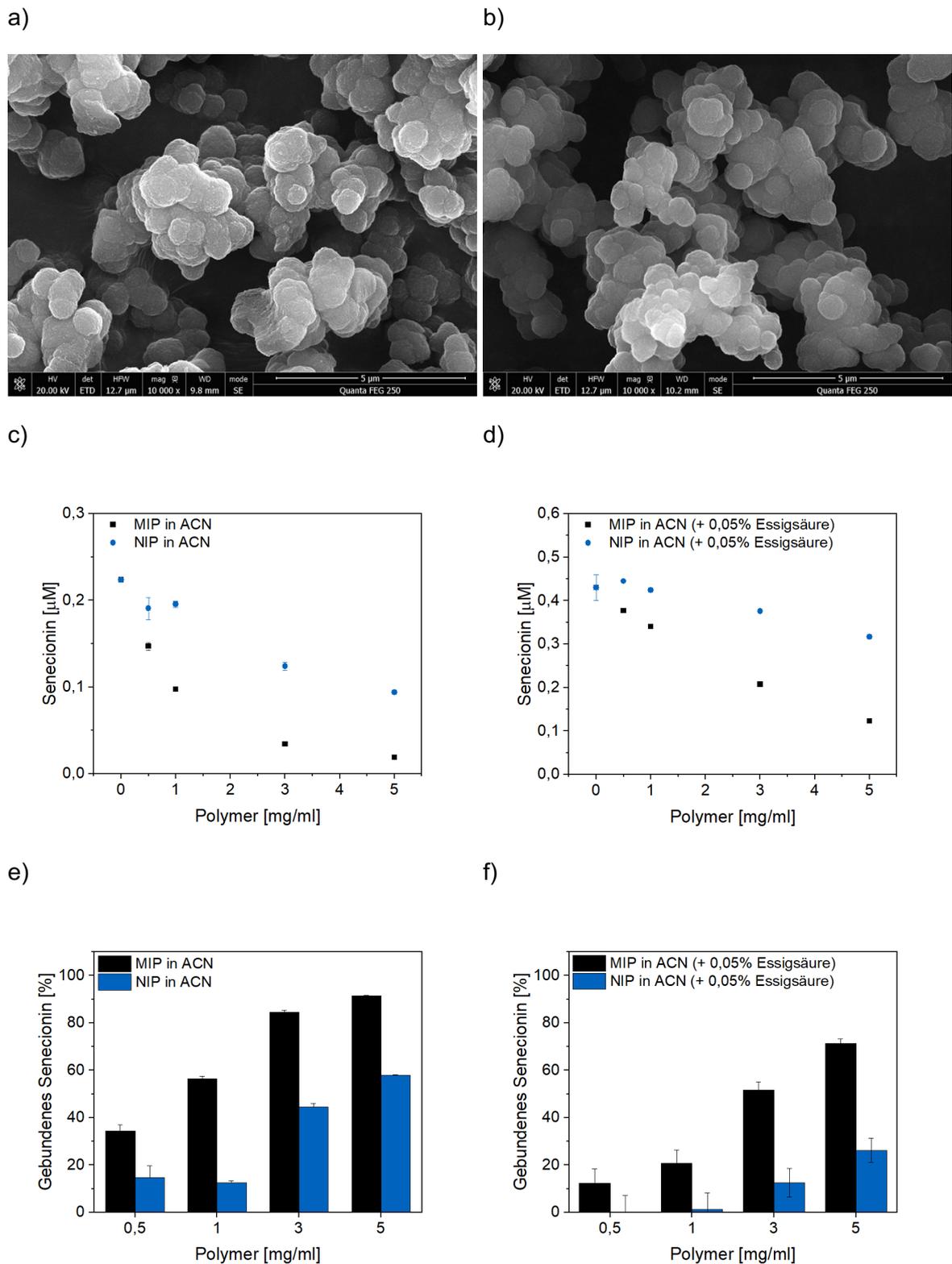


Abbildung 49: Rasterelektronenmikroskopie (REM) der synthetisierten MIPs (a) und NIPs (b), Ergebnisse der HPLC-MS-gestützten Bindungsassays in Gegenwart unterschiedlicher Mengen der Polymere und Senecionin in ACN (c) sowie ACN + 0,05% Essigsäure (d) sowie der prozentuale Anteil des gebundenen Senecionins in ACN (e) und ACN + 0,05% Essigsäure, m=3, Fehler repräsentiert die Standardabweichung.

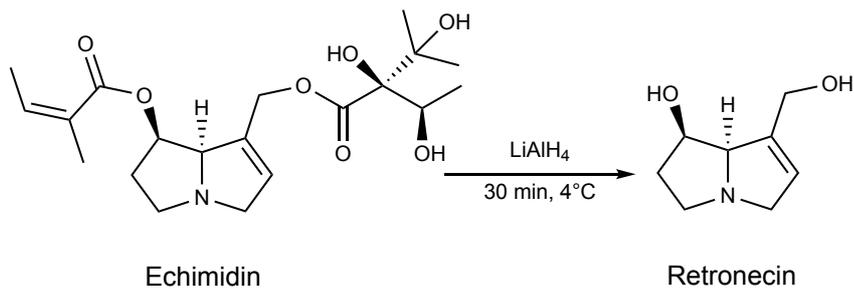


Abbildung 50: Reduktion des Retronecin-basierten PAs Echimidin zu Retronecin durch LiAlH_4 .

Die LiAlH_4 -basierte Reduktion zu PA-Grundkörpern kann im Anschluss an eine Reduktion der PANO zu PA oder durch entsprechende Anpassungen der Konzentrationen des Reduktionsmittels LiAlH_4 direkt vom PANO zum PA-Grundkörper erfolgen (Cramer et al., 2013). Diese Reduktion würde im Erfolgsfall dem etablierten ELISA alle Retronecin-basierten PA zugänglich machen und somit eine Quantifizierung der Retronecin-Äquivalente im Sinne einer Summenmethode ermöglichen. Allerdings wäre eine Unterscheidung zwischen Retronecin- und Heliotridin-Äquivalenten aufgrund der KR des mAk18H4 zum stereoisomeren Heliotridin (KR etwa 30%) nicht möglich. Die für die etablierte HPLC-MS-gestützte Quantifizierung von PA vorgeschaltete Reduktionsmethode nutzt die Aufarbeitung und Extraktion des Reduktionsprodukts mit Dichlormethan sowie die nachfolgende Trocknung der organischen Phase mit Natriumsulfat. Demzufolge muss untersucht werden, ob die Messung der reduzierten PA nach Einengung und Rücklösung in PBS mit dem etablierten ELISA unter Verwendung des mAk18H4 möglich ist. Matrixeffekte durch potentielle Rückstände des Reduktions- oder Trocknungsmittels müssen untersucht und gegebenenfalls durch die Anpassungen der Aufarbeitungsmethode reduziert werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Immunisierung mit einem Necinbase-Protein-Konjugat mAk generiert werden können, welche eine weitgehend selektive Bestimmung der entsprechenden Necinbase-basierten PA nach deren Reduktion zum Grundkörper in einem indirekt kompetitiven ELISA ermöglichen. Das Ziel weiterführender Arbeiten könnte deshalb darin bestehen, durch Neuimmunisierung mit alternativen Haptenstrukturen, ein weiter optimiertes Screening sowie unter Umständen die Einbeziehung gentechnischer Methoden noch praxistauglichere Antikörper (maßgeschneiderte rekombinante Antikörper) zu gewinnen. Da es aufgrund der immensen strukturellen Vielfalt der PA nicht gelingen kann, einen Antikörper mit gleicher Bindungsaffinität für sämtliche komplette PA zu generieren, bleibt der Fokus auf die Grundkörper die wohl vielversprechendste Option.

5. Experimenteller Teil

5.1. Geräte und Materialien

5.1.1. Geräte

ELISA

Mikroplattenleser Synergy™ HT BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland

Mikroplattenwaschautomat ELx405 Select BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland

Schüttler EasyShaker EAS 2/4 SLT, Crailsheim, Deutschland

ITC

MicroCal PEAQ-ITC Malvern Instruments Limited, Malvern, UK

LC-MS

Exactive™ Orbitrap Massenspektrometer Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland

Säulenofen HotDog™ 5090 Prolab Instruments GmbH, Reinach, Schweiz

Surveyor Autosampler Plus Lite Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland

Surveyor MS PumpPlus Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland

Spritzenpumpe Fusion HT Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland

MALDI-TOF-MS

Massenspektrometer autoflex™ speed MALDI-TOF (/TOF) Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland

Oberflächenplasmonenresonanz - SPR

Biacore X100 GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

Sonstiges

Autoklav Laboklav ECO	SHP Steriltechnik AG, Detzel, Schloss/Satuelle, Deutschland
Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 LSCbasic	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
HPLC-Selektivitätssäule Thermo Scientific™ Accucore™ Polar premium (100 x 2,1 mm; Partikelgröße 2,6 µm)	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland
HPLC-Vorsäule Thermo Scientific™ Accucore™ Polar premium (10 x 2,1 mm; Partikelgröße 2,6 µm)	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland
Inkubationsschüttler C24CK	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Magnetrührer C-MAG HS 7 Package	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Magnetrührer MR 3002 S	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
MTP 384 <i>ground steal target</i>	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutsch- land
pH Messgerät FiveEasy Standard	Mettler-Toledo, Columbus, USA
Pipette Research® 1 - 5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette Research® Plus 0,5 - 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette Research® Plus 10 - 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette Research® Plus 100 - 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette Research® Plus 20 - 200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette Research® Plus Pro Multi-Kanal 30 - 300 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reinstwasseranlage Milli-Q® direct C85358	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trockenschrank 20 - 250°C	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex Super RK 106	BANDELIN electronic GmbH & Co.KG, Berlin, Deutschland

Vortexmischer/Reagenzglasschüttler Heidolph™	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
Vortexmischer/Reagenzglasschüttler TopMix FB 15024	Fischer Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Waage AT261 DeltaRange	Mettler-Toledo, Columbus, USA
Waage PM4600 DeltaRange	Mettler-Toledo, Columbus, USA
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

5.1.2. Software

Biacore X100 Control Software Version 1.1	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Biacore X100 Evaluation Software Version 1.1	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
ChemDraw 18.1	PerkinElmer®, Waltham, USA
Chem3D 18.1	PerkinElmer®, Waltham, USA
flexAnalysis 3.4	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutsch- land
flexControl 3.4	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutsch- land
FlexS 2.1.3	BioSolveIT GmbH, Sankt Augustin, Deutschland
Gen5 Datenanalyse-Software	BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland
MicroCal PEAQ-ITC Analysesoftware	Malvern Instruments Limited, Malvern, UK
MicroCal PEAQ-ITC Software Gerätesteuerung	Malvern Instruments Limited, Malvern, UK
Origin® 2019 Grafik & Analyse Software	OriginLab Corporation, Northampton, USA
SeeSAR 9.2	BioSolveIT GmbH, Sankt Augustin, Deutschland
Xcalibur™ Software	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland

5.1.3. Antigene und Antikörper

Antigene

7-O-Acetylintermedin	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
7-O-Acetyllycopsamin	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Echimidin	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Erucifolin	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Heliotridin	Cfm Oskar Tropitzsch, Marktredwitz, Deutschland
Heliotrin	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Indicin	Cfm Oskar Tropitzsch, Marktredwitz, Deutschland
Integerrimin	Cfm Oskar Tropitzsch, Marktredwitz, Deutschland
Integerrimin-N-Oxid	Cfm Oskar Tropitzsch, Marktredwitz, Deutschland
Intermedin	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Intermedin-N-Oxid	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Jacobin	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Jacolin	Cfm Oskar Tropitzsch, Marktredwitz, Deutschland
Lasiocarpin	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Lycopsamin	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Merenskin	Cfm Oskar Tropitzsch, Marktredwitz, Deutschland
Merepoxin	Cfm Oskar Tropitzsch, Marktredwitz, Deutschland
Monocrotalin	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Otonecin	Cfm Oskar Tropitzsch, Marktredwitz, Deutschland

Retronecin	Cfm Oskar Tropitzsch, Marktredwitz, Deutschland
Retronecin-N-Oxid	Cfm Oskar Tropitzsch, Marktredwitz, Deutschland
Retrorsin	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Sceleratin	Cfm Oskar Tropitzsch, Marktredwitz, Deutschland
Senecionin	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Seneciophyllin	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Seneciophyllin-N-Oxid	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Senecivernin	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Senkirkin	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Trichodesmin	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland

Antikörper

mAk gegen Monocrotalin, 4B8 aus Maus	Department für Pharmakognosie, Kyushu Universität, Fukuoka
mAk gegen Retronecin, 18H4 aus Ratte	Lehrstuhl für Analytische Chemie und Wasserchemie, TUM, München
Pferd-anti-Maus IgG (H&L) Antikörper, HRP-markiert, PI-2000	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland
Ziege-anti-Ratte IgG (H&L) Antikörper, HRP-markiert, GtxRt-003-DHRPX	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland

5.1.4. Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Materialien

Biacore BIA Maintenance Kit, BR-1006-66	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Bond Elut SCX-Kartuschen, 6 ml, 500 mg, 102114	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland
Einmal-Kanülen Sterican [®] , 0,8 x 120 mm, C630.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland

Experimenteller Teil

Einmal-Kanülen Sterican [®] , 0,8 x 40 mm, X127.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Einmal-Reagenzreservoir, CYN5.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Einmalspritze Injekt [®] , 10 ml, 0058.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Einmalspritze Injekt [®] , 2 ml, 0056.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Einmalspritze Injekt [®] , 20 ml, 0059.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Einmalspritze Injekt [®] , 5 ml, 0057.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
HBS EP+ Puffer 10x, BR-1008-26	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Konzentratoren Amicon [®] Ultra-0.5, Ultracell-30 Membran, MWCO 30kDa, Z740173	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Konzentratoren VivaSpin [®] 20, MWCO 10kDa, Z614602	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Mikrotiterplatten, 96-well, PS, F-Boden, transparent, MICROLON [®] , High binding, 655061	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Multi [®] -Sicherheitsreaktionsgefäße, 1,5 ml, 7080.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Multi [®] -Sicherheitsreaktionsgefäße, 2 ml, 7083.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Nalgene [™] Rapid-Flow [™] Sterile Einweg-Flaschenaufsatzfilter, PES, 0,22 µm, 295-3345	Thermo Fisher Scientific GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Parafilm [®] M, H666.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Pasteurpipetten, 230 mm, 4522.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen Brand, 0,1 - 20 µl, AL17.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland

Pipettenspitzen Brand, 5-300 µl, ALX8.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen Standard MAKRO 1 - 5 ml, 5846.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen Standard UNIVERSAL, 10 - 200 µl, B007.2	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen Standard UNIVERSAL, 100 - 1200 µl, 2679.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Plastik Vials PP, BR-1002-87	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Rollrandgläschen, 10 ml, X655.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Rollrandgläschen, 20 ml, X657.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Rollrandgläschen, 30 ml, X660.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Rollrandgläschen, 40 ml, X662.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotilabo®-Abdeckfolien, EN76.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotilabo®-Faltenfilter, Ø 185 mm, AY79.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotilabo®-Kurzgewindefläschchen, Braunglas, LC06.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotilabo®-Kurzgewindefläschchen, Klarglas, LC03.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotilabo®-Micro-Magnetrührstäbchen, PK68.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotilabo®-Spritzenfilter, PTFE, KC94.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotilabo®-Spritzenfilter, PVDF, PP48.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Rubber Caps, BR-1004-14	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

Experimenteller Teil

Schraubkappen geschlossen, PP, TY75.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Schraubkappen mit Bohrung, LC14.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Sensor Chip Protein G	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen PP, 15 ml, CELLSTAR [®] , 188261	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen PP, 50 ml, CELLSTAR [®] , 210216	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Matrices

Fenchel	Martin Bauer GmbH & Co. KG, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Honig	Imkerei Murnau, Deutschland
Kamille	Martin Bauer GmbH & Co. KG, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Pfefferminze	Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit, Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland

Chemikalien

1,1'-Carbonyldiimidazol, PEPTIPURE [®] , 6992.2	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
1,4-Dioxan, wasserfrei, 99,8%, 296309	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, 6834.3	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Aceton ROTISOLV [®] , mind. 99,9%, KK40.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Aceton, mind. 99,5 %	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Acetonitril für HPLC, Chromasolv [®] , ≥ 99,9%, 34998	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
α-Cyano-4-hydroxizimtsäure, 8201344	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland

Ameisensäure, für LC-MS LiChropur [®] , 98 - 100%, 5.33022	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ammoniaklösung, 25%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Casein aus Kuhmilch, C5890	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Coffein, ≥ 98,5%, N815.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat Trihydrat, <i>ReagentPlus</i> [®] , ≥ 99,0%, P5504	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Essigsäure, 100%, 3738.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol vergällt, K928.4	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, ≥ 99,5%, 5054.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
H ₂ O für HPLC, Chromasolv [®] , ≥ 99,9%, 270733	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Kaliumdihydrogencitrat, Alfa aesar [™] , 99%, wasserfrei, 44415	Thermo Fisher Scientific GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat, wasserfrei, 60220	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Kaliumsorbat, <i>ReagentPlus</i> [®] , ≥ 99,0%, 359769	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Lithiumaluminiumhydrid, 2,0 M in THF, 593702	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Met-Arg-Phe-Ala Acetat, ≥ 90%, M1170	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Methanol für HPLC, Chromasolv [®] , ≥ 99,9%, 34860	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> 'ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDC), E7750	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Experimenteller Teil

<i>N,N'</i> -Dimethylformamid (DMF), $\geq 99,8\%$, wasserfrei, 227056	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Natriumazid $\geq 99,99\%$, 438456	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Natriumchlorid min. 99,8%, HN00.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid, S7653	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat, 1063291000	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid, $\geq 85\%$, 6751.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumtetraborat Decahydrat, $\geq 99,5\%$, S9640	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
pH-Pufferlösung pH 10.01, 9606.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
pH-Pufferlösung pH 4.01, 9602.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
pH-Pufferlösung pH 7.01, 9604.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Rinderserumalbumin, Fraktion V, pH 7.0, 11930.03	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Salzsäure, rauchend, 30721	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Schwefelsäure, 95 - 97%, 30743	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Stickstoff 5.0	Air Liquide, München
Trans-3,5-dimethoxy-4-hydroxymzimtsäure, 8201345	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland
Trifluoressigsäure, $\geq 99,9\%$, 6957.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween [®] 20 für Synthese, 8.22184	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Wasserstoffperoxid-Lösung, 30% (w/w), 31642	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Zink, Staub < 10 μ , \geq 98%, 209988	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

5.1.5. Pufferlösungen

Alle Pufferlösungen wurden ausschließlich mit UV-Licht-behandeltem Milli-Q[®] Reinstwasser angesetzt, der pH-Wert eingestellt und anschließend ggf. autoklaviert oder filtriert.

ELISA

Blocklösung, 1% Casein in PBS

Die Lösung wurde auf 90°C erhitzt und anschließend nach Abkühlen auf RT durch einen Faltenfilter filtriert. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte eine Lagerung bei 4°C.

Coating-Puffer, pH 9,6

Na ₂ CO ₃	15 mM
NaHCO ₃	35 mM
NaN ₃	3 mM

Phosphatpuffer, PBS, 80 mM, pH 7,6

KH ₂ PO ₄	10 mM
K ₂ HPO ₄	70 mM
NaCl	145 mM

Stopplösung

H ₂ SO ₄	5%
--------------------------------	----

Experimenteller Teil

Substratpuffer, pH 3,8

$\text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_7$	200 mM
$\text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_2$	0,67 mM

Substratlösung

Substratpuffer	25 ml
TMB-Stammlösung	500 μl
H_2O_2 (1%)	100 μl

TMB-Stammlösung in DMSO

TMB	52 mM
-----	-------

Waschpuffer, pH 7,6, PBS-T

PBS	8 mM
Tween [®] 20	0,05%

Sonstige Puffer und Lösungen

Boraxpuffer, pH 8,5

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$	6 mM
---	------

Extraktionsmittel

H_2SO_4	50 mM
-------------------------	-------

Tuning-Lösung

NH_4COOH	5 mM	in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (50/50, v/v)
--------------------------	------	---

5.2. Methoden

5.2.1. Synthese von Retronecin-BSA-Konjugaten

Derivatisierung von Retronecin

Die Synthese des Retronecin-BSA-Konjugats erfolgte in Anlehnung an Sakamoto et al. 2017. Retronecin (5 mg) und CDI (5,22 mg) wurden äquimolar (jeweils 21 mM) in 1,5 ml wasserfreiem 1,4-Dioxan gelöst und bei 30°C unter Schutzgas (N₂) und ständigem Rühren für 3 h zur Reaktion gebracht.

Überprüfung der Derivatisierung

Der Reaktionsfortschritt wurde massenspektrometrisch überprüft. Zu diesem Zweck wurden der Reaktionslösung etwa 100 µl entnommen, das Dioxan unter N₂-Begasung abgedampft und der Rückstand in Tuning-Lösung auf eine Konzentration von 10 µg/ml rückgelöst. Anschließend erfolgte die direkte Injektion des Reaktionsgemischs über eine Spritzenpumpe in das ESI - Exactive™ Orbitrap Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific). Unter Verwendung eines geeigneten Tuning-files erfolgte die Massenanalyse. Vor jeder Messreihe wurde das Massenspektrometer über eine Spritzenpumpe mit einem Kalibrierstandard in positivem und negativem Modus bei einer Flussrate von 10 µl/min kalibriert. Der Standard enthielt ein MRFA-Peptid¹³, SDS, Natrium-Taurocholsäure und Ultramark® 1621 gelöst in H₂O/MeOH (50/50, v/v). PA und PANO wurden im positiven Ionisierungsmodus bei einer Auflösung von 50.000 (2 Hz) und einer maximalen Injektionszeit von 30 ms gemessen. Die *automatic gain control* (AGC) war auf 1x10⁶ (*balanced*), das Vernebelungs- und Hilfsgas auf eine Flussrate von 20 l/h beziehungsweise 5 l/h eingestellt. Der erfasste Massenbereich lag bei 50 - 1000 m/z und die kollisionsinduzierte Dissoziation war deaktiviert. Die angelegte Spannung betrug 3,5 kV, die Kapillartemperatur 300°C, die Kapillarspannung 60 V, die Tubuslinsenspannung 95 V und die Skimmerspannung 18 V. Die automatische Datenerfassung sowie die Datenauswertung erfolgten über die Instrumentensoftware Xcalibur 2.1. Die Identifizierung der Edukte Retronecin, CDI beziehungsweise Imidazol sowie des Reaktionsprodukts Bis-Retronecinyl-Carbonat erfolgte über ihre exakten

¹³ Bestehend aus den Aminosäuren Methionin (Met, M), Arginin (Arg, A), Phenylalanin (Phe, F) und Alanin (Ala, A).

Massen von $[M+H^+]$ m/z 156,10213 für Retronecin, $[M+H^+]$ m/z 69,04567 für Imidazol sowie $[M+H^+]$ m/z 337,17554 für Bis-Retronecinyll-Carbonat.

Kopplung an Proteinträger

Nach erfolgreicher Derivatisierung wurde der Reaktionsansatz tropfenweise in eine BSA-Lösung (10 mg/ml in Borax-Puffer, pH 8,5) gegeben und 4 h bei RT und unter Ausschluss von Licht gerührt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend unter Verwendung von VivaSpin[®]20 (MWCO 10 kDa) Ultrafiltrationseinheiten filtriert und aufkonzentriert. Zu diesem Zweck wurde das Reaktionsgemisch in den Diafiltrationsbecher gefüllt und verbleibendes Restvolumen mit Borax-Puffer auf 20 ml aufgefüllt. Die Ultrafiltrationseinheit wurde für 25 min bei 4°C und 4500 x g zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Der Diafiltrationsbecher wurde anschließend mit 20 ml Milli-Q[®] Reinstwasser befüllt und die Ultrafiltrationseinheit erneut für 25 min bei 4°C und 4500 x g zentrifugiert. Das im Diafiltrationsbecher verbleibende Konzentrat wurde in ein Rollrandglas überführt und nach Einfrieren in flüssigem N₂ lyophilisiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Konjugat bei 4°C aufbewahrt. Die Überprüfung der erfolgreichen Kopplung des Retronecins an BSA erfolgte mittels indirektem ELISA und MALDI-TOF-MS.

5.2.2. Charakterisierung von Retronecin-BSA-Konjugaten

Alle ELISAs wurden, wenn nicht anders beschrieben, in MTP mit 96-Kavitäten (transparent, aus Polystyrol, hochbindend) durchgeführt. Um während der Inkubationszeiten eine Verdunstung von Flüssigkeit und damit eine Beeinflussung der Messergebnisse zu vermeiden, wurden die Platten mit Abdeckfolie luftdicht verschlossen. Mit Ausnahme des *Coatings* erfolgten alle Inkubationszeiten auf einem Horizontal-Schüttler bei 200 rpm und RT. Alle Messungen wurden in Triplikaten ($m=3$) durchgeführt. Das Auslesen der MTP und die Messung der Absorption bei 450 nm erfolgte mittels eines MTP-Lesers und der Datenanalyse-Software Gen5. Die Prozessierung und Auswertung der generierten Daten wurde mit Hilfe von MS Excel, die graphische Darstellung mit Origin[®] 2019 Grafik & Analyse-Software durchgeführt.

Für die qualitative Überprüfung des Kopplungserfolgs von Retronecin an verschiedene Proteinträger wurde ein von der Arbeitsgruppe Morimoto der Kyushu Universität Fukuoka, Japan, zur Verfügung gestellter muriner Monocrotalin-spezifischer mAk (mAk4B8) verwendet, der eine 0,11%ige KR gegenüber Retronecin zeigte. Es wurde ein nicht kompetitiver ELISA durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine MTP $\ddot{U}N$ bei 4°C mit 200 μ l einer Retronecin-Konjugat-Lösung (1 μ g/ml in *Coating*-Puffer) beschichtet. Als Negativ-Kontrolle erfolgte die Inkubation mit einer BSA- oder TG-Lösung (1 μ g/ml in PBS). Die Platte wurde 3x mit je

300 µl Waschpuffer-Lösung (8 mM PBS-T) pro Kavität gewaschen und unbesetzte Bindungsstellen der MTP mit Hilfe von 300 µl einer 1%igen Casein-Lösung (in PBS) für 1 h bei RT blockiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Zugabe von 200 µl einer Lösung des mAk4B8 (400 ng/ml in PBS-T). Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei RT wurde die MTP erneut gewaschen und 200 µl einer Lösung eines sekundären HRP-gekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörpers (200 ng/ml in PBS-T) in die Kavitäten gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei RT wurde ein finaler Waschschrift durchgeführt und die Bindung von Retronecin-spezifischen Antikörpern an die Retronecin-Konjugate durch Zugabe einer TMB/H₂O₂-Substratlösung sichtbar gemacht. Das Abstoppen der Reaktion mit 5% H₂SO₄-Lösung erfolgte sobald eine ausreichende Farbtintensität erreicht war.

5.2.3. MALDI-TOF-MS

Für die weitere Charakterisierung von Retronecin-Protein-Konjugaten sowie des mAk18H4 wurden MALDI-TOF-MS-Messungen durchgeführt. Alle Messungen erfolgten am Max von Pettenkofer Institut der LMU München (PD Dr. Andreas Wieser) unter Verwendung eines autoflexTM speed MALDI-TOF(/TOF) Massenspektrometers (Bruker Daltonik GmbH). Hierzu wurden die Retronecin-Protein-Konjugate in einer Konzentration von 1 mg/ml in Milli-Q[®] Reinstwasser gelöst. Lag das Konjugat wie der mAk18H4 bereits in Pufferlösung vor, wurde die Lösung zunächst unter Verwendung von Ultrafiltrationseinheiten (Amicon[®], MWCO 30 kDa) entsalzt. Zu diesem Zweck wurde eine geeignete Menge des Proteins in den Diafiltrationsbecher überführt und das verbleibende Restvolumen mit Milli-Q[®] Reinstwasser auf 500 µl aufgefüllt. Die Filtrationseinheit wurde anschließend bei 8000 x g und 20°C für 25 min zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Der Diafiltrationsbecher wurde mit 500 µl Milli-Q[®] Reinstwasser aufgefüllt und die Zentrifugation wiederholt. Im Anschluss wurde der Diafiltrationsbecher für 2 min bei 8000 x g und 20°C invers zentrifugiert und die Proteinlösung somit in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinlösung wurde anschließend in einer Konzentration von 1 mg/ml in Milli-Q[®] Reinstwasser aufgenommen. Für die Charakterisierung von Retronecin-BSA-Konjugaten wurden je 0,7 µl der Proteinlösung auf ein MTP 384 *ground steal target* pipettiert und nach vollständiger Trocknung mit 0,7 µl HCCA (10 mg/ml in 50% ACN, 47.5% Milli-Q[®] Reinstwasser und 2.5% Trifluoressigsäure (TFA), v/v) überschichtet. Für die Charakterisierung des mAk18H4 wurde das MTP 384 *ground steal target* mit 0,7 µl einer gesättigten Lösung aus SA (engl. *trans-3,5-dimethoxy-4-hydroxy cinnamic acid*, in EtOH) beschichtet. Nach erfolgter Auskristallisierung der Matrix, wurde die Antikörperlösung zu gleichen Teilen mit einer Lösung aus SA (in 30% ACN/H₂O, 0,1% TFA) vermischt und davon 0,5 µl auf das bereits mit SA beschichtete *target* pipettiert. Nach vollständiger Kristallisierung der Matrix erfolgte die Messung. Die Spektren wurden im linearen positiven Modus aufgenommen und die Parameter-Einstellungen für

einen Massenbereich von 30 - 210 kDa optimiert (Ionenquelle 1: 19.5 kV, Ionenquelle 2: 16.6 kV, gepulste Ionenextraktionszeit: 600 nm, *gain factor*: 10x). Die Kalibrierung des Geräts erfolgte mit einem externen Peptidstandard. Die Datenerfassung erfolgte automatisch über die Instrumentensoftware flexControl, die Datenauswertung mit Hilfe der Software flexAnalysis.

5.2.4. Herstellung monoklonaler anti-Retronecin-Antikörper

Die Herstellung von mAk erfolgte in Zusammenarbeit mit der MAB *Monoclonal Antibody Core Facility*, Helmholtz Zentrum München. Zu diesem Zweck wurden Wistar-Ratten mit TG-konjugiertem Retronecin immunisiert und anschließend die Milzzellen der Ratten mit der Maus-Myelomazelllinie P3X63-Ag8.653 zu Hybridomzellen fusioniert. Die Immunisierung und die Herstellung von Hybridomen wurden gemäß nachfolgendem Schema durchgeführt:

Phase 1 - Immunisierung und Herstellung von Hybridomen

Die Immunisierung der Ratten erfolgte mit 50 µg Retronecin-TG-Konjugat und 5 nmol CpG 2006 (Bauer et al., 2001; Krieg et al., 1995; Krug et al., 2001; Marshall et al., 2005) (TIB MOLBIO, Berlin) gelöst in 1 ml IFA/PBS (inkomplettes Freund-Adjuvans) (50%, v/v). Eine erste Booster-Immunisierung mit 50 µg Konjugat und 5 nmol CpG 2006 in 750 µl IFA/PBS (33,3%, v/v) erfolgte sechs Wochen nach der Primärimmunisierung, eine zweite Booster-Immunisierung nach weiteren vier Wochen. Drei Tage nach der letzten Immunisierung wurde die Milz entnommen und aus dem Organ die Antikörper-produzierenden B-Zellen isoliert. Diese wurden anschließend mit murinen Myelomazellen fusioniert. Die Zellen wurden für 10 Tage bei 37°C auf 96-Loch-Zellkulturplatten kultiviert und positive Hybridome mit Hilfe eines Selektionsmediums, dem sogenannte HAT (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin)-Medium (Köhler et al., 1975), identifiziert. Eine Testung der ZKÜ auf geeignete sekretierte mAk erfolgte mit dem heterologen Retronecin-BSA-Konjugat sowie mit dem Protein-carrier (TG) des Immunogens im indirekt nicht kompetitiven ELISA (s. Abschnitt 5.2.5).

Phase 2 - Expansion positiver Hybridom-Zellklone und Bestimmung der IgG-Subklasse

Positiv getestete Zellklone (Bindung der sekretierten Antikörper nur an das Retronecin-BSA-Konjugat) wurden expandiert und kryokonserviert. Die IgG-Subklasse wurde mittels direktem ELISA und HRP-konjugierten mAk gegen verschiedene IgG-Subklassen/Isotypen aus der Ratte bestimmt (anti-Ratte TIB173 IgG2a, anti-Ratte TIB174 IgG2b, anti-Ratte TIB170 IgG1 von ATCC, anti-Ratte IgG2c, von MAB *Monoclonal Antibody Core Facility*). Nach einer Reaktivierung erfolgte die Revalidierung der mAk mittels indirekt nicht kompetitivem ELISA.

Phase 3 - Generierung stabiler Zellklone und Titerbestimmung

Um ein monoklonales Hybridom zu erhalten, wurden die positiv getesteten revalidierten Hybridomzellklone unter Berücksichtigung der IgG-Isotypen rekloniert. Dies erfolgte durch Einzelzellverteilung (*limited dilution*) so lange, bis alle ZKÜ eines Hybridoms auf einer 96-Loch-Zellkulturplatte positiv mit dem heterologen Antigen reagierten. Die Zellen des stabil etablierten Hybridoms wurden erneut expandiert und die ZKÜ für die Verwendung im Immunoassay und einer anschließenden Affinitätsaufreinigung gesammelt. Weiterhin wurde die IgG-Subklasse mittels direktem ELISA und unter Verwendung der HRP-konjugierten Subklassen-spezifischen mAk verifiziert und der Titer durch serielle Verdünnung der ZKÜ ermittelt.

Phase 4 - Affinitätsaufreinigung

Eine Aufreinigung der mAk erfolgte durch Protein G-basierte Affinitätschromatographie. Hierfür wurden 500 ml ZKÜ des mit IgG-abgereichertem fetalen Kälberserum (PAN; cat#: P30-2802) kultivierten Hybridoms mit 5 ml/min auf eine 5 ml HiTrap Protein G-HP-Säule (GE Healthcare; cat#: 17-0405-01) aufgegeben. Die Säule wurde anschließend mit etwa 15 ml PBS gewaschen bis die Leitfähigkeit einen Wert < 17 mS/cm zeigte. Die Elution des mAks erfolgte mit 0,1 M Citratpuffer (pH 2,7) und wurde mittels Messung der UV-Absorption überwacht. Die IgG-enthaltende Fraktion wurde in einem Superloop gesammelt und über eine Superdex 200 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) bei einer Flussrate von 5 ml/min gegen PBS dialysiert. Die Konzentration des mAks wurde anschließend mittels Thermo Scientific™ NanoDrop™ Spektralphotometer auf 1,3 mg/ml eingestellt.

5.2.5. Screening von ZKÜ

Für das Screening der von der MAB *Monoclonal Antibody Core Facility*, Helmholtz Zentrum München, zur Verfügung gestellten ZKÜ wurde ein indirekt kompetitiver ELISA durchgeführt. Dabei erfolgte die Konkurrenz zunächst mit einer Retronecin-Konzentration von 2 µg/ml in PBS und für die Testung der ZKÜ rekultivierter Zellklone über einen Konzentrationsbereich von 0,01 - 100 µg/ml verdünnt aus einer Retronecin-Stammlösung der Konzentration 1 mg/ml in PBS. MTP wurden ÜN bei 4°C mit 200 µl einer Retronecin-CDI-BSA-Konjugat-Lösung (1 µg/ml in *Coating*-Puffer) beschichtet. Die Platten wurde 3x mit Waschlösung (8 mM PBS+0,05% Tween®20) gewaschen und unbesetzte Bindungsstellen auf den Platten mit Hilfe von 300 µl einer 1%igen Casein-Lösung (in PBS) für 1 h bei RT blockiert. Nach einem weiteren Waschschriff wurden jeweils 50 µl einer Retronecin-Lösung oder PBS als Negativ-Kontrolle in Duplikaten in die Kavitäten der MTP vorgelegt und je

50 µl der zuvor im Verhältnis 1:2 (v/v) (1:500 bei der Testung von ZKÜ rekultivierter Zellklone) in PBS verdünnten ZKÜ zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei RT erfolgte ein Waschschrift und die Zugabe von 100 µl eines im Verhältnis 1:400 (v/v) in PBS-T verdünnten Subklassen-spezifischen HRP-konjugierten sekundären anti-Ratte-Antikörpers. Die Inkubationszeit bei RT betrug 1 h. Die Farbreaktion erfolgte nach einem finalen Waschschrift durch Zugabe einer TMB/H₂O₂-haltigen Substratlösung. Das Abstoppen der Farbreaktion mit 100 µl einer 5%igen H₂SO₄-Lösung erfolgte sobald eine ausreichende Farbbintensität erreicht war. Insgesamt wurden etwa 800 ZKÜ aus den Hybridomzellkulturen von drei immunisierten Ratten getestet.

5.2.6. Abschätzung der Dissoziationskonstanten aus dem IC₅₀-Wert

Für die Abschätzung der Affinität des mAk18H4 wurde ein indirekt kompetitiver ELISA durchgeführt. Dabei erfolgte die Kompetition mit Retronecin über einen Konzentrationsbereich von 0,001 - 100 µg/ml PBS. Die Verdünnungen wurden aus einer Retronecin-Stamm-lösung der Konzentration 1 mg/ml in PBS hergestellt. MTP wurden ÜN bei 4°C mit 200 µl einer Retronecin-CDI-BSA-Konjugat-Lösung (1 µg/ml in *Coating*-Puffer) beschichtet. Die Platten wurde 3x mit Waschpuffer-Lösung (8 mM PBS+0,05% Tween[®]20) gewaschen und unbesetzte Bindungsstellen auf den Platten mit Hilfe von 300 µl einer 1%igen Casein-Lösung (in PBS) für 1 h bei RT blockiert. Nach einem Waschschrift wurden jeweils 100 µl einer Retronecin-Lösung oder PBS als Negativ-Kontrolle in Triplikaten in die Kavitäten der MTP vorgelegt und je 100 µl des im Verhältnis 1:5000 oder 1:2500 (v/v) in PBS verdünnten mAk18H4 (260 ng/ml bzw. 520 ng/ml) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei RT erfolgte ein weiterer Waschschrift und die Zugabe von 200 µl eines im Verhältnis 1:5000 (v/v) in PBS-T verdünnten HRP-konjugierten sekundären Anti-Ratte-IgG-Antikörpers (180 ng/ml). Die Inkubationszeit bei RT betrug 1 h. Die Farbreaktion erfolgte nach einem finalen Waschschrift durch Zugabe einer TMB/H₂O₂-haltigen Substratlösung. Das Abstoppen der Farbreaktion mit 100 µl 5% H₂SO₄ erfolgte sobald eine ausreichende Farbbintensität erreicht war, idealerweise jedoch nach maximal 10 min.

5.2.7. Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Für die thermodynamische Charakterisierung und Bestimmung der Bindungskonstanten der Interaktion des mAk18H4 mit Retronecin wurden ITC-Messungen durchgeführt. Alle Messungen wurden am Lehrstuhl für Biomolekulare NMR-Spektroskopie (TUM, Prof. Sattler) unter Verwendung eines MICROCAL PEAQ-ITC Kalorimeters (Malvern Panalytical GmbH) durchgeführt. Hierzu wurden 300 µl der mAk18H4-Lösung (8,8 µM in PBS, Bio-Chrom GmbH) in die Messzelle sowie 60 µl eines Titranten (Retronecin 176 µM, 132 µM bzw. 99 µM und BSA 90 µM in PBS) in die Spritze gegeben. Die Referenzzelle enthielt PBS. Mess- und Referenzzelle wurden bei einer Temperatur von 25°C betrieben und der

Titrant kontinuierlich bei 500 rpm gerührt. Nach einer 60-sekündigen Äquilibrierphase und einer initialen Injektion von 0,2 μl wurde der Titrant schrittweise mit einem Volumen von je 1,5 μl in die Messzelle titriert (Injektionsdauer: 3 s, Äquilibrierphase zwischen den Injektionen: 120 s, Anzahl der Injektionen: 25). Die für die Kompensation der Wärmemengenänderung zwischen Referenz- und Messzelle aufzubringende Leistung (DP, [$\mu\text{mol/s}$]) wurde gegen die Zeit aufgetragen. Anschließend wurden die Signalspitzen integriert (ΔH [kcal/mol]) und gegen das molare Verhältnis von mAk18H4 zu Retronecin oder BSA aufgetragen. Die resultierende Isotherme wurde anschließend in einem Bindungsmodell (1:1) angepasst und die Bindungskonstante (K_d), die Bindungsstöchiometrie N sowie weitere thermodynamische Größen (ΔH , ΔS , ΔG) für die Charakterisierung der bimolekularen Reaktion von mAk18H4 und Retronecin beziehungsweise BSA ermittelt. Die Datenerfassung erfolgte über die MicroCal PEAQ-ITC-Gerätesteuerungssoftware, die Auswertung der Daten unter Verwendung der MicroCal PEAQ-ITC-Analysesoftware.

5.2.8. Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie)

Für die thermodynamische Charakterisierung und Bestimmung der Bindungskonstanten der Interaktion des mAk18H4 mit Retronecin wurden SPR-Messungen durchgeführt. Die SPR-Spektroskopie wurde im *antibody-capture* Format unter Verwendung eines Biacore™ X100 (GE Healthcare Europe GmbH) durchgeführt. Die Flusszelle wurde konstant auf 25°C temperiert und die Messung, wenn nicht anders beschrieben, bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchgeführt. Der verwendete Laufpuffer (HPS EP+, pH 7,4) wurde zusätzlich mit 0,5% BSA versetzt und sowohl für die Messungen, also auch die Verdünnung des mAks sowie der Probenlösungen verwendet.

Immobilisierung des mAk18H4

Die nichtkovalente Immobilisierung des mAk18H4 erfolgte über einen Protein G-Chip. Dieser wurde in Flusszelle 2 mit dem mAk18H4 bei einer Konzentration von 8,8 nM (Verdünnung in Laufpuffer) und einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ für 80 s auf eine RU von etwa 1000 gespült. Anschließend wurde der Sensorchip noch weitere 15 min mit Laufpuffer äquilibriert und schließlich für die Messung der Kinetik verwendet.

Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_d)

Die Ratenkonstanten k_a und k_d sowie die Dissoziationskonstante K_d wurden mit Hilfe einer *single-cycle* Kinetik (SCK) bestimmt. Retronecin-BSA wurde in Laufpuffer zu einer Konzentration von 30 μM gelöst, für 15 min bei 10.000 x g und 4°C zentrifugiert und entsprechend in Laufpuffer verdünnt. Der Sensorchip wurde pro Zyklus für je 120 s, beginnend mit der

niedrigsten von fünf Analytkonzentrationen (1,88 μM , 3,75 μM , 7,5 μM , 15 μM , 30 μM) und anschließend für 180 s mit Laufpuffer ohne zwischenzeitliche Regenerierung gespült. Blankzyklen vor und nach der Messung sollten die Baseline-Drift durch Dissoziation des Liganden von der Sensorchipoberfläche abbilden. Für die Regenerierung des Protein G-Chips wurde dieser für 60 s mit einer Glycin-Lösung (pH 2,0) gespült und anschließend in Laufpuffer bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Datenerfassung erfolgte über die Biacore X100 Control Software, die Auswertung der Sensorgramme unter Verwendung des Fitting-Modells für heterogene Liganden und der Biacore X100 Evaluation Software.

5.2.9. Bestimmung der Kreuzreaktivitäten

Für die Bestimmung der KR wurden in PBS verdünnte, nicht aufgereinigte ZKÜ des gefrierstabilen Zellklons 18H4 verwendet. Einen Überblick über die für die Testung eingesetzten 25 PA (Retronecin-, Heliotridin- und Otonecin-basierte PA, Mono- oder Diester, offenkettig oder makrozyklisch) sind in Tabelle 9 (Anhang, S. 137) zusammengefasst. Zusätzlich wurden die N-Oxide (PANO) der PA Retronecin, Seneciphyllin, Integerrimin und Intermedin einbezogen. Alle PA lagen in Stammlösungen (in 100% ACN oder 50/50, v/v, ACN/H₂O) einer Konzentration von 1 mg/ml vor. Die Kalibrierstandards wurden in PBS über einen Konzentrationsbereich von 0,01 - 100 $\mu\text{g/ml}$ hergestellt. MTP wurden ÜN bei 4°C mit 200 μl einer Retronecin-CDI-BSA-Konjugat-Lösung (1 $\mu\text{g/ml}$ in *Coating*-Puffer) beschichtet. Die Platten wurde 3x mit Waschpuffer-Lösung (8 mM PBS+0,05% Tween[®]20) gewaschen und unbesetzte Bindungsstellen auf den Platten mit Hilfe von 300 μl einer 1%igen Casein-Lösung (in PBS) für 1 h bei RT blockiert. Nach einem Waschschrift wurden jeweils 100 μl einer Retronecin-Lösung oder PBS als Negativ-Kontrolle in Triplikaten in die Kavitäten der MTP vorgelegt und je 100 μl des im Verhältnis 1:50 beziehungsweise 1:100 (v/v) in PBS (+0,5% Casein) verdünnten ZKÜ zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei RT erfolgte ein Waschschrift und die Zugabe von 200 μl eines im Verhältnis 1:5000 (v/v) in PBS-T verdünnten HRP-konjugierten sekundären Anti-Ratte-IgG-Antikörpers (180 ng/ml). Die Inkubationszeit bei RT betrug 1 h. Die Farbreaktion erfolgte nach einem finalen Waschschrift durch Zugabe einer TMB/H₂O₂-haltigen Substratlösung. Das Abstoppen der Farbreaktion mit 5% H₂SO₄ erfolgte sobald eine ausreichende Farbintensität erreicht war nach maximal 25 min. Die Berechnung der KR erfolgte nach Formel 5.

5.2.10. Untersuchungen zur Strukturaufklärung der antigenen Determinante mittels molekularer *Alignments*

Für die Untersuchungen zur Strukturaufklärung der antigenen Determinante für die Interaktion von PA und mAk18H4 wurden die Strukturen von PA mittels ChemDraw 18.1 gezeichnet und anschließend in Chem3D 18.1 in ihre dreidimensionale Struktur umgewandelt. An-

schließlich erfolgte unter Verwendung eines MM2 Kraftfelds (Allinger, 1977) die Minimierung der potentiellen Energie durch Optimierung von Bindungslänge und Torsionswinkel innerhalb der Moleküle. Ausgehend von optimierten Konformationen wurde ein dreidimensionales *Alignment* mittels FlexS 2.1.3 (Lemmen et al., 1998) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde als struktureller Anker des *Alignments* auf einem steifen Referenz-Molekül sowie auf dem Test-Molekül ein Basisfragment ausgewählt (*selbas*). Das Basisfragment bestand aus drei Atomen des PA-Grundkörpers Retronecin, C9, N sowie dem Sauerstoffatom der tertiären OH-Gruppe an Position C7. Das Alignment erfolgte nach Platzierung (*placebas*) des Basisfragments. Die Moleküle wurden basierend auf einem Konstruktionsalgorithmus unter Berücksichtigung physikochemischer Eigenschaften strukturell *aligned*. Die Visualisierung der *Alignments* erfolgte mit SeeSAR 9.2.

5.2.11. Stabilitätsuntersuchungen in organischen Lösungsmitteln

Für die Charakterisierung der Stabilität des mAk18H4 in den organischen Lösungsmitteln EtOH, MeOH und ACN wurden Retronecin-Kalibrierstandards in PBS, sowie jeweils in 10% oder 20% (v/v) organischem Lösungsmittel hergestellt. Die Kalibrierung erfolgte über einen Konzentrationsbereich von 0,01 - 100 µg/ml, die Herstellung der Kalibrierstandards aus einer Retronecin-Stammlösung der Konzentration 2 mg/ml in PBS. Die Durchführung des indirekt kompetitiven ELISAs ist unter Abschnitt 5.2.6 beschrieben.

5.2.12. Stabilitätsuntersuchungen bei verschiedenen pH-Werten

Für die Charakterisierung der Stabilität des mAk18H4 bei verschiedenen pH-Werten wurden Retronecin-Kalibrierstandards in PBS (pH 7,6), sowie jeweils in wässrigen Lösungen mit pH-Werten von pH 1,35, pH 4,68 und pH 9,96 hergestellt. Die Einstellung der pH-Werte erfolgte unter Verwendung von H₂SO₄ (50 mM) oder NaOH (32%). Die Kalibrierung erfolgte über einen Konzentrationsbereich von 0,01 - 100 µg/ml, die Herstellung der Kalibrierstandards aus einer Retronecin-Stammlösung der Konzentration 2 mg/ml in PBS. Die Durchführung des indirekt kompetitiven ELISAs ist unter Abschnitt 5.2.6 beschrieben. Die Stabilität bei pH 1,35 wurde in 1:100 (v/v) in PBS (+0,5% Casein) verdünntem ZKÜ, Farbreaktion maximal 25 min, ermittelt.

5.2.13. Herstellung von Rohextrakten

Die Herstellung der pflanzlichen Extrakte mittels Fest-Flüssig-Extraktion erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit der LMU München. Hierfür wurde ausschließlich nachweislich PA-freies Material verwendet. Gefriergetrocknetes pflanzliches Material (Pfefferminze, Kamille, Fenchel) und Honig wurden eingewogen und mit 20 ml/g einer wässrigen 0,05 M Schwefelsäurelösung versetzt. Die Proben wurden durch Vortexen

für 5-10 s homogenisiert und anschließend für 10 min ins Ultraschallbad überführt. Die Extraktion erfolgte für 20 min auf einem Horizontalschüttler bei 500 rpm. Die Abtrennung des flüssigen Extrakts von der festen Phase erfolgte durch 10-minütige Zentrifugation bei 5000 x g. Die Extrakte wurden mit Hilfe eines Faltenfilter sowie eines Spritzenfilters (0,45 µm, PVDF) filtriert und anschließend bis zur weiteren Verwendung noch 14 Tage bei 4°C gelagert. Für die Herstellung von Retronecin-dotierten Kalibrierstandards wurden die Extrakte unverdünnt oder in PBS verdünnt verwendet.

5.2.14. Untersuchung von Matrixeffekten in Rohextrakten

Die Untersuchung von Matrixeffekten in Rohextrakten aus Pfefferminze, Fenchel, Kamille und Honig erfolgte mit Hilfe eines indirekt kompetitiven ELISAs (s. Abschnitt 5.2.6). Zu diesem Zweck wurden je 1 ml des filtrierten Rohextrakts mit 9,26 µl NaOH (32%) neutralisiert. Retronecin-Kalibrierstandards wurden in unverdünnten oder im Verhältnis 1:10 (v/v) in PBS verdünnten neutralisierten Rohextrakten hergestellt. Die Kalibrierung erfolgte über einen Konzentrationsbereich von 0,01 - 100 µg/ml aus einer Retronecin-Stammlösung der Konzentration 2 mg/ml.

5.2.15. Festphasenextraktion (SPE) für eine Aufreinigung von Rohextrakten

Die Aufreinigung pflanzlicher Extrakte durch SPE erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit der LMU München. Für die SPE wurden Säulen mit kationischer Festphase (Bond Elut Plexa PCX, Agilent) zunächst mit 5 ml MeOH und anschließend mit 5 ml des verwendeten Extraktionsmittels (0,05 M H₂SO₄) konditioniert. Eine Fließgeschwindigkeit von einem Tropfen/s wurde dabei nicht überschritten. 2 x 5 ml des faltengefilterten Rohextrakts wurden aufgegeben und die Säulen mit je 6 ml H₂O und MeOH gewaschen. Die Elution erfolgte mit Hilfe von 2 x 5 ml Ammoniak-haltigem MeOH (5%). Anschließend wurde das MeOH unter Stickstoff bei 50°C abgedampft. Die getrockneten Eluate wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert und für eine Herstellung von mit Retronecin-dotierten Kalibrierstandards in PBS rückgelöst.

5.2.16. Untersuchung von Matrixeffekten in SPE-Eluaten

Die Untersuchung von Matrixeffekten in SPE-Eluaten aus Rohextrakten von Pfefferminze, Fenchel, Kamille und Honig erfolgte mit Hilfe eines indirekt kompetitiven ELISAs (s. Abschnitt 5.2.6). Zu diesem Zweck wurden Retronecin-Kalibrierstandards in 1 ml PBS rückgelöst und im Verhältnis 1:10 oder 1:100 (v/v) in PBS verdünnten SPE-Eluaten hergestellt. Die Kalibrierung erfolgte über einen Konzentrationsbereich von 0,01 - 100 µg/ml aus einer Retronecin-Stammlösung der Konzentration 2 mg/ml.

5.2.17. Reduktion von PANO zu PA

Für die Reduktion von PANO zu PA wurden reines Extraktionsmittel (5 mM H₂SO₄) oder pflanzliche Rohextrakte aus Fenchel und Honig mit Retronecin (1 µg/ml) dotiert. Die Extrakte wurden anschließend mit je 100 mg/ml (Extraktionsmittel, 5 mM H₂SO₄), 200 mg/ml (Rohextrakte aus Fenchel) sowie 500 mg/ml (Rohextrakt aus Honig) Zinkstaub versetzt, welcher durch Invertieren in Suspension gebracht wurde. Die Reduktion der PANO zu PA erfolgte bei RT und 500 rpm für 30 min. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 20°C und 4300 x g, wurde der Überstand für die ELISA-basierte Quantifizierung des PA-Grundkörpers Retronecin verwendet. Außerdem erfolgte eine HPLC-MS-gestützte quantitative Analyse des Reduktionserfolgs.

Quantifizierung reduzierter PANO mittels indirekt kompetitivem ELISA

Für die Quantifizierung der reduzierten PANO wurde unter anderem ein indirekt kompetitiver ELISA (s. Abschnitt 5.2.6) eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden je 1 ml Überstand nach der Reduktion mit 9,26 µl NaOH (32%) neutralisiert und durch einen Spritzenfilter (PVDF, 0,45 µm) filtriert. Der neutralisierte Überstand wurde im Verhältnis 1:10 (v/v) in PBS verdünnt. Retronecin-Kalibrierstandards wurden über einen Konzentrationsbereich von 0,01 - 100 µg/ml aus einer Stammlösung der Konzentration 2 mg/ml in PBS hergestellt. Die Quantifizierung von Retronecin erfolgte durch Normierung auf einen Blindwert (Matrix und Zink, ohne PANO) und Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor.

5.2.18. HPLC-ESI-MS

Die massenspektrometrische quantitative Bestimmung von Retronecin und Retronecin-N-Oxid wurde mit HPLC-ESI-MS durchgeführt. Jeweils 20 µl einer in Laufmittel A (H₂O, 5 mM Ammoniumformiat, 0,1% FA) aufgenommenen und verdünnten Probe, wurde mit dem Autosampler injiziert. Für die chromatographische Auftrennung der PA und PANO wurde eine HPLC-Selektivitätssäule des Typs Accucore™ Polar premium (100 x 2,1 mm, Partikelgröße 2,6 µm) mit passender Vorsäule Accucore™ Polar premium (10 x 2,1 mm, Partikelgröße 2,6 µm) verwendet, welche vor einer Bestimmung mit Laufmittel A ausreichend konditioniert wurde. Die Flussrate lag bei 200 µl/min. Die Temperatur des Säulenofens war auf 40°C eingestellt. Das verwendete Gradientenprogramm mit Laufmittel A und Laufmittel B (MeOH, 5 mM Ammoniumformiat, 0,1% FA) ist in Tabelle 8 zusammengefasst.

Als Detektor wurde ein ESI-Exactive™-Orbitrap-Massenspektrometer verwendet. Die Kalibrierung des Massenspektrometers sowie die verwendeten Einstellungsparameter für die Massendetektion sind bereits beschrieben (s. Abschnitt 5.2.2).

Tabelle 8: Übersicht über das für die Bestimmung von PA und PANO verwendete Gradientenprogramm für die HPLC-Methode.

Zeit [min]	Laufmittel A	Laufmittel B
	H ₂ O 5 mM Ammoniumformiat 0,1% FA	MeOH 5 mM Ammoniumformiat 0,1% FA
0	95	5
5	95	5
10	75	25
14	75	25
22	5	95
25	5	95
33	95	5

Auswertung von HPLC-ESI-MS Messungen für die Reduktion von PANO zu PA

Für die Quantifizierung von PA und PANO wurde eine Kalibrierung in Laufmittel A oder Rohextrakten aus Fenchel und Honig über einen Konzentrationsbereich von 2,5 - 500 ng/ml PA und PANO durchgeführt. Alle Messungen erfolgten in Triplikaten. Zwischen den einzelnen Messungen erfolgten Blank-Messungen mit Laufmittel A. Die Identifizierung von Retronecin-N-Oxid und Retronecin erfolgte über ihre exakten Massen von $[M+H^+]$ m/z 172,09682 und $[M+H^+]$ m/z 156,10191. Ihre Retentionszeiten lagen bei 1,16 und 1,1 min. Eine Massengenauigkeit von ± 10 ppm wurde akzeptiert. Die prozentuale Umsetzung von PANO zu PA wurde durch die Bildung des Quotienten der ermittelten Konzentration des PA und PANO dargestellt.

Literaturverzeichnis

- Abad, A., & Montoya, A. (1995). Application of a Monoclonal Antibody-Based ELISA to the Determination of Carbaryl in Apple and Grape Juices. *Anal. Chim. Acta*, 311(3), 365-370.
- Allen, J. R., & Chesney, C. F. (1972). Effect of Age on Development of Cor Pulmonale in Nonhuman Primates Following Pyrrolizidine Alkaloid Intoxication. *Exp. Mol. Med.*, 17(2), 220-232.
- Allinger, N. L. (1977). Conformational Analysis. 130. MM2. A Hydrocarbon Force Field Utilizing V1 and V2 Torsional Terms. *J. Am. Chem. Soc.*, 99(25), 8127-8134.
- Altaee, M. Y. (1998). An Outbreak of Veno-Occlusive Disease of the Liver in Northern Iraq. *East. Mediterr. Health J.*, 4(1), 142-148.
- Altamirano, J. C., Gratz, S. R., & Wolnik, K. A. (2005). Investigation of Pyrrolizidine Alkaloids and Their N-Oxides in Commercial Comfrey-Containing Products and Botanical Materials by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. AOAC Int.*, 88(2), 406-412.
- Anderson, D. E., Bechtel, W. J., & Dahlquist, F. W. (1990). pH-Induced Denaturation of Proteins: A Single Salt Bridge Contributes 3-5 kcal/mol to the Free Energy of Folding of T4 Lysozyme. *Biochemistry*, 29(9), 2403-2408.
- Anjos, B. L., Nobre, V. M., Dantas, A. F., Medeiros, R. M., Oliveira Neto, T. S., Molyneux, R. J., & Riet-Correa, F. (2010). Poisoning of Sheep by Seeds of *Crotalaria Retusa*: Acquired Resistance by Continuous Administration of Low Doses. *Toxicon*, 55(1), 28-32.
- Arakawa, H., Maeda, M., & Tsuji, A. (1985). Chemiluminescence Enzyme Immunoassay for Thyroxin with Use of Glucose Oxidase and a Bis(2,4,6-Trichlorophenyl)Oxalate-Fluorescent Dye System. *Clin. Chem.*, 31(3), 430-434.
- Azadbakht, M., & Talavaki, M. (2010). Qualitative and Quantitative Determination of Pyrrolizidine Alkaloids of Wheat and Flour Contaminated with Senecio in Mazandaran Province Farms. *Iranian J. Pharm. Res.*, 2(3), 179-183.

Bauer, S., Kirschning, C. J., Häcker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H., & Lipford, G. B. (2001). Human TLR9 Confers Responsiveness to Bacterial DNA Via Species-Specific CpG Motif Recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98(16), 9237-9242.

Berkson, J. (1944). Application of the Logistic Function to Bio-Assay. *Biometrics*, 39(227), 357-365.

Betteridge, K., Cao, Y., & Colegate, S. M. (2005). Improved Method for Extraction and LC–MS Analysis of Pyrrolizidine Alkaloids and Their N-Oxides in Honey: Application to Echium Vulgare Honeys. *J. Agr. Food Chem.*, 53(6), 1894-1902.

BfR. (2007). Salatmischung mit Pyrrolizidinalkaloid-haltigem Greiskraut verunreinigt, Stellungnahme Nr.028/2007 des BfR vom 10. Januar 2007. 1-23.

BfR. (2011). Analytik und Toxizität von Pyrrolizidinalkaloiden sowie eine Einschätzung des gesundheitlichen Risikos durch deren Vorkommen in Honig, Stellungnahme Nr. 038/2011 des BfR vom 11. August 2011, ergänzt am 21. Januar 2013. 1-37.

BfR. (2013). Pyrrolizidinalkaloide in Kräutertees und Tees, Stellungnahme 018/2013 des BfR vom 5. Juli 2013. 1-31.

BfR. (2016). Pyrrolizidinalkaloide: Gehalte in Lebensmitteln sollen nach wie vor so weit wie möglich gesenkt werden, Stellungnahme Nr. 030/2016 des BfR vom 28. September 2016. 1-53.

BfR. (2018). Aktualisierte Risikobewertung zu Gehalten an 1,2-ungesättigten Pyrrolizidinalkaloiden (PA) in Lebensmitteln: Stellungnahme Nr. 020/2018 des BfR vom 14. Juni 2018. 1-13.

BfR. (2019). Pyrrolizidinalkaloidgehalt in getrockneten und tiefgefrorenen Gewürzen und Kräutern zu hoch: Stellungnahme Nr. 017/2019 des BfR vom 13. Mai 2019. 1-16.

Bird, L., & Herdes, C. (2018). The Porogen Effect on the Complexation Step of Trinitrotoluene–Methacrylic Acid: Towards Efficient Imprinted Polymer Sensors. *Mol. Syst. Des. Eng.*, 3(1), 89-95.

- Birecka, H., Catalfamo, J. L., & Eisen, R. N. (1981). A Sensitive Method for Detection and Quantitative Determination of Pyrrolizidine Alkaloids. *Phytochemistry*, *20*(2), 343-344.
- Bjorck, L., & Kronvall, G. (1984). Purification and Some Properties of Streptococcal Protein G, a Novel IgG-Binding Reagent. *J. Immunol.*, *133*(2), 969-974.
- Blattman, J. N., & Greenberg, P. D. (2004). Cancer Immunotherapy: A Treatment for the Masses. *Science*, *305*(5681), 200-205.
- Bober, M. A., Milco, L. A., Miller, R. B., Mount, M., Wicks, B., & Kurth, M. J. (1989). A Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to Detect Retronecine and Monocrotaline in Vitro. *Toxicol.*, *27*(9), 1059-1064.
- Bodi, D., Ronczka, S., Gottschalk, C., Behr, N., Skibba, A., Wagner, M., Lahrssen-Wiederholt, M., Preiss-Weigert, A., & These, A. (2014). Determination of Pyrrolizidine Alkaloids in Tea, Herbal Drugs and Honey. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, *31*(11), 1886-1895.
- Boppré, M., Colegate, S. M., & Edgar, J. A. (2005). Pyrrolizidine Alkaloids of Echimium Vulgare Honey Found in Pure Pollen. *J. Agr. Food Chem.*, *53*(3), 594-600.
- Böttcher, F., Adolph, R.-D., & Hartmann, T. (1993). Homospermidine Synthase, the First Pathway-Specific Enzyme in Pyrrolizidine Alkaloid Biosynthesis. *Phytochemistry*, *32*(3), 679-689.
- Bredenkamp, M. W., Wiechers, A., & van Rooyen, P. H. (1985). A New Pyrrolizidine Alkaloid N-Oxide and the Revised Structure of Sceleratine. *Tetrahedron Lett.*, *26*(46), 5721-5724.
- Brunauer, S., Emmett, P. H., & Teller, E. (1938). Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J. Am. Chem. Soc.*, *60*(2), 309-319.
- Candrian, U., Lüthy, J., & Schlatter, C. (1985). In Vivo Covalent Binding of Retronecine-Labelled [3H]Seneciphylline and [3H]Senecionine to DNA of Rat Liver, Lung and Kidney. *Chem.-Biol. Interact.*, *54*, 57-69.
- Chauvin, P., Dillon, J. C., & Moren, A. (1994). An Outbreak of Heliotrope Food Poisoning, Tadjikistan, November 1992-March 1993. *Sante*, *4*(4), 263-268.

Cheeke, P. R. (1998). *Natural Toxicants in Feeds, Forages, and Poisonous Plants* (2 ed.). Danville, IL: Interstate Publishers, Inc.

Chen, L., Mulder, P. P. J., Louisse, J., Peijnenburg, A., Wesseling, S., & Rietjens, I. M. C. M. (2017). Risk Assessment for Pyrrolizidine Alkaloids Detected in (Herbal) Teas and Plant Food Supplements. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, *86*, 292-302.

Chen, L., Wang, X., Lu, W., Wu, X., & Li, J. (2016a). Molecular Imprinting: Perspectives and Applications. *Chem. Soc. Rev.*, *45*(8), 2137-2211.

Chen, M., Li, L., Zhong, D., Shen, S., Zheng, J., & Chen, X. (2016b). 9-Glutathionyl-6,7-Dihydro-1-Hydroxymethyl-5H-Pyrrolizine Is the Major Pyrrolic Glutathione Conjugate of Retronecine-Type Pyrrolizidine Alkaloids in Liver Microsomes and in Rats. *Chem. Res. Toxicol.*, *29*(2), 180-189.

Chen, T., Mei, N., & Fu, P. P. (2010a). Genotoxicity of Pyrrolizidine Alkaloids. *J. Appl. Toxicol.*, *30*(3), 183-196.

Chen, Z., & Huo, J. R. (2010b). Hepatic Veno-Occlusive Disease Associated with Toxicity of Pyrrolizidine Alkaloids in Herbal Preparations. *Neth. J. Med.*, *68*(6), 252-260.

Cheng, Y., & Prusoff, W. H. (1973). Relationship between the Inhibition Constant (K₁) and the Concentration of Inhibitor Which Causes 50 Per Cent Inhibition (I₅₀) of an Enzymatic Reaction. *Biochem. Pharmacol.*, *22*(23), 3099-3108.

Chu, J., Fang, S., Xin, P., & Guo, Z. (2017). Quantitative Analysis of Plant Hormones Based on LC-MS/MS. In J. Li, C. Li, & S. M. Smith (Eds.), *Hormone Metabolism and Signaling in Plants* (pp. 471-537). Cambridge, USA: Academic Press.

Chung, S. W. C., & Lam, C.-H. (2018). Development of an Analytical Method for Analyzing Pyrrolizidine Alkaloids in Different Groups of Food by UPLC-MS/MS. *J. Agr. Food Chem.*, *66*(11), 3009-3018.

Clark, M. F., & Adams, A. N. (1977). Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *J. Gen. Virol.*, *34*(3), 475-483.

- Cramer, L., Schiebel, H. M., Ernst, L., & Beuerle, T. (2013). Pyrrolizidine Alkaloids in the Food Chain: Development, Validation, and Application of a New HPLC-ESI-MS/MS Sum Parameter Method. *J. Agr. Food Chem.*, *61*(47), 11382-11391.
- Crews, C. (2013). Methods for Analysis of Pyrrolizidine Alkaloids. In K. G. Ramawat & J.-M. Mérillon (Eds.), *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* (pp. 1049-1068). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Crews, C., Berthiller, F., & Krska, R. (2010). Update on Analytical Methods for Toxic Pyrrolizidine Alkaloids. *Anal. Bioanal. Chem.*, *396*(1), 327-338.
- Culvenor, C. C. J., Edgar, J. A., & Smith, L. W. (1981). Pyrrolizidine Alkaloids in Honey from *Echium Plantagineum* L. *J. Agr. Food Chem.*, *29*(5), 958-960.
- De Bolster, M. W. G. (1997). Glossary of Terms Used in Bioinorganic Chemistry (IUPAC Recommendations 1997). *Pure Appl. Chem.*, *69*(6), 1251-1303.
- De Waal, H. L., & Crous, A. (1948). South African Senecio Alkaloids : Part 7. The Structure of Sceleranecic Acid. *S. Afr. J. Chem.*, *1*(1), 23-34.
- DeLeve, L. D., McCuskey, R. S., Wang, X., Hu, L., McCuskey, M. K., Epstein, R. B., & Kanel, G. C. (1999). Characterization of a Reproducible Rat Model of Hepatic Venooclusive Disease. *Hepatology*, *29*(6), 1779-1791.
- DeLeve, L. D., Wang, X., Kuhlenkamp, J. F., & Kaplowitz, N. (1996). Toxicity of Azathioprine and Monocrotaline in Murine Sinusoidal Endothelial Cells and Hepatocytes: The Role of Glutathione and Relevance to Hepatic Venooclusive Disease. *Hepatology*, *23*(3), 589-599.
- Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R., & Roitt, I. M. (2017). *Roitt's Essential Immunology* (13 ed.). Chichester, West Sussex; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.
- Drewes, S. E., & Emslie, N. D. (1982). Necic Acid Synthons. Part 1. Total Synthesis of Integerrineic Acid. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2079-2083.
- Edgar, J. A., Molyneux, R. J., & Colegate, S. M. (2015). Pyrrolizidine Alkaloids: Potential Role in the Etiology of Cancers, Pulmonary Hypertension, Congenital Anomalies, and Liver Disease. *Chem. Res. Toxicol.*, *28*, 4-20.

efsa. (2011). Scientific Opinion on Pyrrolizidine Alkaloids in Food and Feed. *EFSA Journal*, 9(11), 1-134.

efsa. (2016). Dietary Exposure Assessment to Pyrrolizidine Alkaloids in the European Population. *EFSA Journal* 14(8), 1-50.

efsa. (2017). Risks for Human Health Related to the Presence of Pyrrolizidine Alkaloids in Honey, Tea, Herbal Infusions and Food Supplements - EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (Contam). *EFSA Journal* 15(7), 1-34.

Ehmke, A., von Borstel, K., & Hartmann, T. (1988). Alkaloid N-Oxides as Transport and Vacuolar Storage Compounds of Pyrrolizidine Alkaloids in *Senecio Vulgaris* L. *Planta*, 176(1), 83-90.

El-Shazly, A., Abdel-Ghani, A., & Wink, M. (2003). Pyrrolizidine Alkaloids from *Onosma Arenaria* (Boraginaceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, 31(5), 477-485.

El-Shazly, A., El-Domiaty, M., Witte, L., & Wink, M. (1998). Pyrrolizidine Alkaloids in Members of the Boraginaceae from Sinai (Egypt). *Biochem. Syst. Ecol.*, 26(6), 619-636.

Engelberts, I., Möller, A., Schoen, G. J., van der Linden, C. J., & Buurman, W. A. (1991). Evaluation of Measurement of Human TNF in Plasma by ELISA. *Lymphokine Cytokine Res.*, 10(1-2), 69-76.

Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Quantitative Assay of Immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871-874.

Engvall, E., & Perlmann, P. (1972). Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme-Labeled Anti-Immunoglobulin in Antigen-Coated Tubes. *J. Immunol.*, 109(1), 129-135.

Findlay, J. W. A., & Dillard, R. F. (2007). Appropriate Calibration Curve Fitting in Ligand Binding Assays. *AAPS J.*, 9(2), 260-267.

Findlay, J. W. A., Smith, W. C., Lee, J. W., Nordblom, G. D., Das, I., DeSilva, B. S., Khan, M. N., & Bowsher, R. R. (2000). Validation of Immunoassays for Bioanalysis: A Pharmaceutical Industry Perspective. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 21(6), 1249-1273.

- Fojtíková, L., Šuláková, A., Blažková, M., Holubová, B., Kuchař, M., Mikšátková, P., Lapčík, O., & Fukal, L. (2017). Lateral Flow Immunoassay and Enzyme Linked Immunosorbent Assay as Effective Immunomethods for the Detection of Synthetic Cannabinoid JWH-200 Based on the Newly Synthesized Hapten. *Toxicol. Rep.*, 5, 65-75.
- Frasca, V. (2016). Biophysical Characterization of Antibodies with Isothermal Titration Calorimetry. *J. Appl. Bioanal.*, 2(3), 90-102.
- Frei, H., Luthy, J., Brauchli, J., Zweifel, U., Wurgler, F. E., & Schlatter, C. (1992). Structure/Activity Relationships of the Genotoxic Potencies of Sixteen Pyrrolizidine Alkaloids Assayed for the Induction of Somatic Mutation and Recombination in Wing Cells of *Drosophila Melanogaster*. *Chem.-Biol. Interact.*, 83(1), 1-22.
- Friguet, B., Chaffotte, A. F., Djavadi-Ohanian, L., & Goldberg, M. E. (1985). Measurements of the True Affinity Constant in Solution of Antigen-Antibody Complexes by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Immunol. Methods*, 77(2), 305-319.
- Frölich, C., Hartmann, T., & Ober, D. (2006). Tissue Distribution and Biosynthesis of 1,2-Saturated Pyrrolizidine Alkaloids in *Phalaenopsis* Hybrids (Orchidaceae). *Phytochemistry*, 67(14), 1493-1502.
- Frostell, Å., Vinterbäck, L., & Sjöbom, H. (2013). Protein–Ligand Interactions Using SPR Systems. In M. A. Williams & T. Daviter (Eds.), *Protein-Ligand Interactions: Methods and Applications* (pp. 139-165). Totowa, NJ: Humana Press.
- Fu, P. P. (2017). Pyrrolizidine Alkaloids: Metabolic Activation Pathways Leading to Liver Tumor Initiation. *Chem. Res. Toxicol.*, 30(1), 81-93.
- Fu, P. P., Xia, Q., Lin, G., & Chou, M. W. (2004). Pyrrolizidine Alkaloids - Genotoxicity, Metabolism Enzymes, Metabolic Activation, and Mechanisms. *Drug Metab. Rev.*, 36(1), 1-55.
- Gama, M. R., & Bottoli, C. B. G. (2017). Molecularly Imprinted Polymers for Bioanalytical Sample Preparation. *J. Chromatogr. B*, 1043, 107-121.

Ghai, R., Falconer, R. J., & Collins, B. M. (2012). Applications of Isothermal Titration Calorimetry in Pure and Applied Research—Survey of the Literature from 2010. *J. Mol. Recognit.*, 25(1), 32-52.

Ghosh, R., Roy, S., & Bagchi, B. (2013). Solvent Sensitivity of Protein Unfolding: Dynamical Study of Chicken Villin Headpiece Subdomain in Water–Ethanol Binary Mixture. *J. Phys. Chem. B*, 117(49), 15625-15638.

Glüsenkamp, K. H., Drosdziok, W., Eberle, G., Jähde, E., & Rajewsky, M. F. (1991). Squaric Acid Diethylester: A Simple and Convenient Coupling Reagent. *Z. Naturforsch. C*, 46(5-6), 498-501.

Gomes Costa Silva, R., Rosa Morais Vigna, C., Bottoli, C. B. G., Collins, C. H., & Augusto, F. (2010). Molecularly Imprinted Silica as a Selective SPE Sorbent for Triazine Herbicides. *J. Sep. Sci.*, 33(9), 1319-1324.

Gottschalk, C., Huckauf, A., Dübecke, A., Kaltner, F., Zimmermann, M., Rahaus, I., & Beuerle, T. (2018). Uncertainties in the Determination of Pyrrolizidine Alkaloid Levels in Naturally Contaminated Honeys and Comparison of Results Obtained by Different Analytical Approaches. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, 35(7), 1366-1383.

Gottschalk, C., Ronczka, S., Preiß-Weigert, A., Ostertag, J., Klaffke, H., Schafft, H., & Lahrssen-Wiederholt, M. (2015). Pyrrolizidine Alkaloids in Natural and Experimental Grass Silages and Implications for Feed Safety. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 207, 253-261.

Gray, D. E., Porter, A., O'Neill, T., Harris, R. K., & Rottinghaus, G. E. (2004). A Rapid Cleanup Method for the Isolation and Concentration of Pyrrolizidine Alkaloids in Comfrey Root. *J. AOAC Int.*, 87(5), 1049-1057.

Gressner, A. M., & Arndt, T. (2019). *Lexikon der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (Vol. 3). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag

Griebenow, K., & Klibanov, A. M. (1996). On Protein Denaturation in Aqueous–Organic Mixtures but Not in Pure Organic Solvents. *J. Am. Chem. Soc.*, 118(47), 11695-11700.

- Guo, X. (2012). Surface Plasmon Resonance Based Biosensor Technique: A Review. *J. Biophotonics*, 5(7), 483-501.
- Gyss, C., & Bourdillon, C. (1987). Enzymic Electrocatalysis as a Strategy for Electrochemical Detection in Heterogeneous Immunoassays. *Anal. Chem.*, 59(19), 2350-2355.
- Hartmann, T. (1999). Chemical Ecology of Pyrrolizidine Alkaloids. *Planta*, 207(4), 483-495.
- Hartmann, T., & Toppel, G. (1987). Senecionine N-Oxide, the Primary Product of Pyrrolizidine Alkaloid Biosynthesis in Root Cultures of *Senecio Vulgaris*. *Phytochemistry*, 26(6), 1639-1643.
- Hartmann, T., & Witte, L. (1995). Chemistry, Biology and Chemoecology of the Pyrrolizidine Alkaloids. In S. W. Pelletier (Ed.), *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives* (Vol. 9, pp. 155-233). New York: Springer-Verlag
- Haupt, K. (2003). Imprinted Polymers - Tailor-Made Mimics of Antibodies and Receptors. *Chem. Commun.*(2), 171-178.
- Haupt, K., & Mosbach, K. (2000). Molecularly Imprinted Polymers and Their Use in Biomimetic Sensors. *Chem. Rev.*, 100(7), 2495-2504.
- Helle, M., Boeije, L., de Groot, E., de Vos, A., & Aarden, L. (1991). Sensitive ELISA for Interleukin-6: Detection of IL-6 in Biological Fluids: Synovial Fluids and Sera. *J. Immunol. Methods*, 138(1), 47-56.
- Herskovits, T. T., Gadegbeku, B., & Jaillet, H. (1970). On the Structural Stability and Solvent Denaturation of Proteins. I. Denaturation by the Alcohols and Glycols. *J. Biol. Chem.*, 245(10), 2588-2598.
- Hesse, M. (2000). *Alkaloide - Fluch oder Segen der Natur?* (1 ed.). Weinheim Wiley-VCH.
- Hill, B. D., Gaul, K. L., & Noble, J. W. (1997). Poisoning of Feedlot Cattle by Seeds of *Heliotropium Europaeum*. *Aust. Vet. J.*, 75(5), 360-361.

Hong, H. L., Ton, T. V., Devereux, T. R., Moomaw, C., Clayton, N., Chan, P., Dunnick, J. K., & Sills, R. C. (2003). Chemical-Specific Alterations in Ras, P53, and Beta-Catenin Genes in Hemangiosarcomas from B6C3F1 Mice Exposed to O-Nitrotoluene or Riddelliine for 2 Years. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 191(3), 227-234.

Hornbeck, P., Fleisher, T. A., & Papadopoulos, N. M. (2017). Isotype Determination of Antibodies. *Curr. Protoc. Immunol.*, 116(1), 2.2.1-2.2.7.

Hovermale, J. T., & Craig, A. M. (2002). Metabolism of Pyrrolizidine Alkaloids by *Peptostreptococcus Heliotrinreducens* and a Mixed Culture Derived from Ovine Ruminal Fluid. *Biophys. Chem.*, 101-102, 387-399.

Huan, J.-Y., Miranda, C. L., Buhler, D. R., & Cheeke, P. R. (1998). Species Differences in the Hepatic Microsomal Enzyme Metabolism of the Pyrrolizidine Alkaloids. *Toxicol. Lett.*, 99(2), 127-137.

Huang, S., Zhou, X.-L., Wang, C.-J., Wang, Y.-S., Xiao, F., Shan, L.-H., Guo, Z.-Y., & Weng, J. (2013). Pyrrolizidine Alkaloids from *Liparis Nervosa* with Inhibitory Activities against LPS-Induced NO Production in RAW64.7 Macrophages. *Phytochemistry*, 93, 154-161.

Hübner, M., Weber, E., Niessner, R., Boujday, S., & Knopp, D. (2015). Rapid Analysis of Diclofenac in Freshwater and Wastewater by a Monoclonal Antibody-Based Highly Sensitive ELISA. *Anal. Bioanal. Chem.*, 407(29), 8873-8882.

Huxtable, R. J. (1990). Activation and Pulmonary Toxicity of Pyrrolizidine Alkaloids. *Pharmacol. Ther.*, 47(3), 371-389.

Imagawa, M., Hashida, S., Ishikawa, E., Mori, H., Nakai, C., Ichioka, Y., & Nakajima, K. (1983). A Highly Sensitive Sandwich Enzyme Immunoassay for Insulin in Human Serum Developed Using Capybara Anti-Insulin Fab' -Horseradish Peroxidase Conjugate. *Anal. Lett.*, 16(19), 1509-1523.

Johnson, A. E., Molyneux, R. J., & Merrill, G. B. (1985). Chemistry of Toxic Range Plants. Variation in Pyrrolizidine Alkaloid Content of *Senecio*, *Amsinckia*, and *Crotalaria* Species. *J. Agr. Food Chem.*, 33(1), 50-55.

Jones, A. J., Culvenor, C. C. J., & Smith, L. W. (1982). Pyrrolizidine Alkaloids: A Carbon-13 NMR Study. *Austr. J. Chem.*, 35(6), 1173-1184.

Jorgelina C. A. Wuilloud, S. R. G., Bryan M. Gamble and Karen A. Wolnik. (2004). Simultaneous Analysis of Hepatotoxic Pyrrolizidine Alkaloids and N-Oxides in Comfrey Root by LC-Ion Trap Mass Spectrometry. *Analyst*, 129, 150-156.

Josephy, P. D., Eling, T., & Mason, R. P. (1982). The Horseradish Peroxidase-Catalyzed Oxidation of 3,5,3',5'-Tetramethylbenzidine. Free Radical and Charge-Transfer Complex Intermediates. *J. Biol. Chem.*, 257(7), 3669-3675.

Kakar, F., Akbarian, Z., Leslie, T., Mustafa, M. L., Watson, J., Van Egmond, H. P., Omar, M. F., & Mofleh, J. (2010). An Outbreak of Hepatic Veno-Occlusive Disease in Western Afghanistan Associated with Exposure to Wheat Flour Contaminated with Pyrrolizidine Alkaloids. *J. Toxicol.*, 2010, 1-7.

Kaltner, F., Rychlik, M., Gareis, M., & Gottschalk, C. (2018). Influence of Storage on the Stability of Toxic Pyrrolizidine Alkaloids and Their N-Oxides in Peppermint Tea, Hay, and Honey. *J. Agr. Food Chem.*, 66(20), 5221-5228.

Karlsson, R. (2004). SPR for Molecular Interaction Analysis: A Review of Emerging Application Areas. *J. Mol. Recognit.*, 17(3), 151-161.

Karlsson, R., Michaelsson, A., & Mattsson, L. (1991). Kinetic Analysis of Monoclonal Antibody-Antigen Interactions with a New Biosensor Based Analytical System. *J. Immunol. Methods*, 145(1), 229-240.

Kempf, M., Beuerle, T., Buhringer, M., Denner, M., Trost, D., von der Ohe, K., Bhavanam, V. B., & Schreier, P. (2008). Pyrrolizidine Alkaloids in Honey: Risk Analysis by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Mol. Nutr. Food. Res.*, 52(10), 1193-1200.

Kempf, M., Wittig, M., Schonfeld, K., Cramer, L., Schreier, P., & Beuerle, T. (2011). Pyrrolizidine Alkaloids in Food: Downstream Contamination in the Food Chain Caused by Honey and Pollen. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, 28(3), 325-331.

Kim, E. K., Shon, D. H., Ryu, D., Park, J. W., Hwang, H. J., & Kim, Y. B. (2000). Occurrence of Aflatoxin M1 in Korean Dairy Products Determined by ELISA and HPLC. *Food Addit. Contam.*, 17(1), 59-64.

Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature*, 256(5517), 495-497.

Kowalczyk, E., Sieradzki, Z., & Kwiatek, K. (2018). Determination of Pyrrolizidine Alkaloids in Honey with Sensitive Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method. *Food Anal. Methods*, 11(5), 1345-1355.

Kramer, A., Keitel, T., Winkler, K., Stöcklein, W., Höhne, W., & Schneider-Mergener, J. (1997). Molecular Basis for the Binding Promiscuity of an Anti-P24 (HIV-1) Monoclonal Antibody. *Cell*, 91(6), 799-809.

Krieg, A. M., Yi, A.-K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A., & Klinman, D. M. (1995). CpG Motifs in Bacterial DNA Trigger Direct B-Cell Activation. *Nature*, 374(6522), 546-549.

Krug, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Jahrsdörfer, B., Blackwell, S., Ballas, Z. K., Endres, S., Krieg, A. M., & Hartmann, G. (2001). Identification of CpG Oligonucleotide Sequences with High Induction of IFN- α / β in Plasmacytoid Dendritic Cells. *Eur. J. Immunol.*, 31(7), 2154-2163.

Ladbury, J. E., & Chowdhry, B. Z. (1996). Sensing the Heat: The Application of Isothermal Titration Calorimetry to Thermodynamic Studies of Biomolecular Interactions. *Chem. Biol.*, 3(10), 791-801.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.

Lai, J.-P., Niessner, R., & Knopp, D. (2004). Benzo[a]pyrene Imprinted Polymers: Synthesis, Characterization and SPE Application in Water and Coffee Samples. *Anal. Chim. Acta*, 522(2), 137-144.

- Landry, J. P., Ke, Y., Yu, G.-L., & Zhu, X. D. (2015). Measuring Affinity Constants of 1450 Monoclonal Antibodies to Peptide Targets with a Microarray-Based Label-Free Assay Platform. *J. Immunol. Methods*, *417*, 86-96.
- Landsteiner, K. (1921). Über heterogenetisches Antigen und Hapten. *Biochem. Z.*, *119*, 294-306.
- Langel, D., Ober, D., & Pelsler, P. B. (2011). The Evolution of Pyrrolizidine Alkaloid Biosynthesis and Diversity in the Senecioneae. *Phytochem. Rev.*, *10*(1), 3-74.
- Langer, T., Mostl, E., Chizzola, R., & Gutleb, R. (1996). A Competitive Enzyme Immunoassay for the Pyrrolizidine Alkaloids of the Senecionine Type. *Planta Med.*, *62*(3), 267-271.
- Lebada, R., Schreier, A., Scherz, S., Resch, C., Krenn, L., & Kopp, B. (2000). Quantitative Analysis of the Pyrrolizidine Alkaloids Senkirkine and Senecionine in Tussilago Farfara L. By Capillary Electrophoresis. *Phytochem. Anal.*, *11*(6), 366-369.
- Lee, S. T., Schoch, T. K., Stegelmeier, B. L., Gardner, D. R., Than, K. A., & Molyneux, R. J. (2001). Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Hepatotoxic Alkaloids Riddelliine and Riddelliine N-Oxide. *J. Agr. Food Chem.*, *49*(8), 4144-4151.
- Leenaars, M., & Hendriksen, C. F. M. (2005). Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations. *ILAR J.*, *46*(3), 269-279.
- Lemmen, C., Lengauer, T., & Klebe, G. (1998). FlexS: A Method for Fast Flexible Ligand Superposition. *J. Med. Chem.*, *41*(23), 4502-4520.
- Lequin, R. M. (2005). Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clin. Chem.*, *51*(12), 2415-2418.
- Lewis, E. A., & Murphy, K. P. (2005). Isothermal Titration Calorimetry. In G. U. Nienhaus (Ed.), *Protein-Ligand Interactions: Methods and Applications* (1 ed., pp. 1-15). Totowa, NJ: Humana Press.
- Liedberg, B., Nylander, C., & Lunström, I. (1983). Surface Plasmon Resonance for Gas Detection and Biosensing. *Sens. Actuators*, *4*, 299-304.

Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., & Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR J.*, 46(3), 258-268.

Logie, C. G., Grue, M. R., & Liddell, J. R. (1994). Proton NMR Spectroscopy of Pyrrolizidine Alkaloids. *Phytochemistry*, 37(1), 43-109.

Lottspeich, F., & Engels, J. W. (2012). *Bioanalytik* (3 ed.). Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.

Lucchetti, M. A., Glauser, G., Kilchenmann, V., Dubecke, A., Beckh, G., Praz, C., & Kast, C. (2016). Pyrrolizidine Alkaloids from *Echium Vulgare* in Honey Originate Primarily from Floral Nectar. *J. Agr. Food Chem.*, 64(25), 5267.

Luckert, C., Hessel, S., Lenze, D., & Lampen, A. (2015). Disturbance of Gene Expression in Primary Human Hepatocytes by Hepatotoxic Pyrrolizidine Alkaloids: A Whole Genome Transcriptome Analysis. *Toxicol. In Vitro*, 29(7), 1669-1682.

Lüning, B., Tränkner, H., & Brandänge, S. (1966). Studies on Orchidaceae Alkaloids V. A New Alkaloid from *Phalaenopsis Amabilis* Bl. *Acta Chem. Scand.*, 20(7), 2011.

Ma, J., Xia, Q., Fu, P. P., & Lin, G. (2018). Pyrrole-Protein Adducts – a Biomarker of Pyrrolizidine Alkaloid-Induced Hepatotoxicity. *J. Food Drug Anal.*, 26(3), 965-972.

MacDougall, D., Crummett, W. B., & et al. (1980). Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry. *Anal. Chem.*, 52(14), 2242-2249.

Madea, B., & Brinkmann, B. (2003). *Handbuch gerichtliche Medizin* (1 ed. Vol. 2). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag

Malmqvist, M. (1993). Surface Plasmon Resonance for Detection and Measurement of Antibody-Antigen Affinity and Kinetics. *Curr. Opin. Immunol.*, 5(2), 282-286.

Marco, M.-P., Gee, S., & Hammock, B. D. (1995). Immunochemical Techniques for Environmental Analysis II. Antibody Production and Immunoassay Development. *Trends Anal. Chem.*, 14(8), 415-425.

- Mariuzza, R. A., & Poljak, R. J. (1993). The Basics of Binding: Mechanisms of Antigen Recognition and Mimicry by Antibodies. *Curr. Opin. Immunol.*, 5(1), 50-55.
- Marshall, J. D., Fearon, K. L., Higgins, D., Hessel, E. M., Kanzler, H., Abbate, C., Yee, P., Gregorio, J., Cruz, T. D., Lizcano, J. O., Zolotarev, A., McClure, H. M., Brasky, K. M., Murthy, K. K., Coffman, R. L., & Nest, G. V. (2005). Superior Activity of the Type C Class of ISS in Vitro and in Vivo across Multiple Species. *DNA Cell Biol.*, 24(2), 63-72.
- Mathon, C., Edder, P., Bieri, S., & Christen, P. (2014). Survey of Pyrrolizidine Alkaloids in Teas and Herbal Teas on the Swiss Market Using HPLC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, 406(28), 7345-7354.
- Mattocks, A. R. (1967). Detection of Pyrrolizidine Alkaloids on Thin-Layer Chromatograms. *J. Chromatogr. A*, 27, 505-508.
- Mattocks, A. R. (1968). Spectrophotometric Determination of Pyrrolizidine Alkaloids-Some Improvements. *Anal. Chem.*, 40(11), 1749-1750.
- Mattocks, A. R. (1971). Hepatotoxic Effects Due to Pyrrolizidine Alkaloid N-Oxides. *Xenobiotica*, 1(4-5), 563-565.
- Mattocks, A. R. (1986). *Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids*. Cambridge, MA: Academic Press
- Mattocks, A. R., & Jukes, R. (1987). Improved Field Tests for Toxic Pyrrolizidine Alkaloids. *J. Nat. Prod.*, 50(2), 161-166.
- Mattocks, A. R., & Jukes, R. (1990). Recovery of the Pyrrolic Nucleus of Pyrrolizidine Alkaloid Metabolites from Sulphur Conjugates in Tissues and Body Fluids. *Chem.-Biol. Interact.*, 75(2), 225-239.
- Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.*, 52(1), 711-760.
- Molyneux, R. J., Gardner, D. L., Colegate, S. M., & Edgar, J. A. (2011). Pyrrolizidine Alkaloid Toxicity in Livestock: A Paradigm for Human Poisoning? *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, 28(3), 293-307.

Molyneux, R. J., Johnson, A. E., Roitman, J. N., & Benson, M. E. (1979). Chemistry of Toxic Range Plants. Determination of Pyrrolizidine Alkaloid Content and Composition in Senecio Species by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Agr. Food Chem.*, 27(3), 494-499.

Molyneux, R. J., Roitman, J. N., Benson, M., & Lundin, R. E. (1982). ¹³C NMR Spectroscopy of Pyrrolizidine Alkaloids. *Phytochemistry*, 21(2), 439-443.

Moniatte, M., van der Goot, F. G., Buckley, J. T., Pattus, F., & van Dorsselaer, A. (1996). Characterisation of the Heptameric Pore-Forming Complex of the *Aeromonas* Toxin Aerolysin Using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *FEBS Lett.*, 384(3), 269-272.

Moreira, R., Pereira, M. D., Valentão, P., & Andrade, B. P. (2018). Pyrrolizidine Alkaloids: Chemistry, Pharmacology, Toxicology and Food Safety. *Int. J. Mol. Sci.*, 19(6).

Mroczek, T., Widelski, J., & Glowniak, K. (2006). Optimization of Extraction of Pyrrolizidine Alkaloids from Plant Material. *Chem. Anal. (Warsaw)*, 51, 567-580.

Mulder, P. P. J., Lopez, P., Castellari, M., Bodi, D., Ronczka, S., Preiss-Weigert, A., & These, A. (2018). Occurrence of Pyrrolizidine Alkaloids in Animal- and Plant-Derived Food: Results of a Survey across Europe. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, 35(1), 118-133.

Mulder, P. P. J., Sánchez, P. L., These, A., Preiss-Weigert, A., & Castellari, M. (2015). Occurrence of Pyrrolizidine Alkaloids in Food. *EFSA Supp. Pub.*, 12(8), 859E.

Muller, P. (1994). Glossary of Terms Used in Physical Organic Chemistry (IUPAC Recommendations 1994). *Pure Appl. Chem.*, 66(5), 1077-1184.

Muluneh, F., Häkkinen, M. R., El-Dairi, R., Pasanen, M., & Juvonen, R. O. (2018). New Glutathione Conjugate of Pyrrolizidine Alkaloids Produced by Human Cytosolic Enzyme-Dependent Reactions in Vitro. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 32(16), 1344-1352.

Neurath, H., Greenstein, J. P., Putnam, F. W., & Erickson, J. A. (1944). The Chemistry of Protein Denaturation. *Chem. Rev.*, 34(2), 157-265.

- Nilson, B., Bjorck, L., & Akerstrom, B. (1988). Enzyme Linked Immunosorbent Assay Using Alkaline Phosphatase Conjugated with Streptococcal Protein G. *J. Immunoassay*, 9(2), 207-225.
- Nowak, R. (2003). Separation and Quantification of Tiliroside from Plant Extracts by SPE/RP-HPLC. *Pharm. Biol.*, 41(8), 627-630.
- Olcer, Y. A., Demirkurt, M., Demir, M. M., & Eroglu, A. E. (2017). Development of Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) as a Solid Phase Extraction (SPE) Sorbent for the Determination of Ibuprofen in Water. *RSC Adv.*, 7(50), 31441-31447.
- Oplatowska, M., Elliott, C. T., Huet, A.-C., McCarthy, M., Mulder, P. P. J., von Holst, C., Delahaut, P., Van Egmond, H. P., & Campbell, K. (2014). Development and Validation of a Rapid Multiplex ELISA for Pyrrolizidine Alkaloids and Their N-Oxides in Honey and Feed. *Anal. Bioanal. Chem.*, 406(3), 757-770.
- Pavlica, D., & Samuel, I. (1970). Primary Carcinoma of the Liver in Ethiopia. A Study of 38 Cases Proved at Post-Mortem Examination. *Br. J. Cancer*, 24(1), 22-29.
- Peterson, J. E., & Jago, M. V. (1980). Comparison of the Toxic Effects of Dehydroheliotridine and Heliotrine in Pregnant Rats and Their Embryos. *J. Pathol.*, 131(4), 339-355.
- Pieters, L. A. C., & Vlietinck, A. J. (1985). Quantitative ¹H Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Analysis of Mixtures of Pyrrolizidine Alkaloids from *Senecio Vulgaris*. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 321(4), 355-358.
- Porstmann, B., Porstmann, T., & Nugel, E. (1981). Comparison of Chromogens for the Determination of Horseradish Peroxidase as a Marker in Enzyme Immunoassay. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 19(7), 435.
- Prakash, A. S., Pereira, T. N., Reilly, P. E. B., & Seawright, A. A. (1999). Pyrrolizidine Alkaloids in Human Diet. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 443(1), 53-67.
- Pukalskas, A., van Beek, T. A., & de Waard, P. (2005). Development of a Triple Hyphenated HPLC-Radical Scavenging Detection-DAD-SPE-NMR System for the Rapid Identification of Antioxidants in Complex Plant Extracts. *J. Chromatogr. A*, 1074(1), 81-88.

Raem, A. M., & Rauch, P. (2007). *Immunoassays* (1 ed.). Berlin, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag

Rasenack, R., Müller, C., Kleinschmidt, M., Rasenack, J., & Wiedenfeld, H. (2003). Veno-Occlusive Disease in a Fetus Caused by Pyrrolizidine Alkaloids of Food Origin. *Fetal Diagn. Ther.*, 18(4), 223-225.

Ravi, S., Ravikumar, R., & Lakshmanan, A. J. (2008). Pyrrolizidine Alkaloids from *Cynoglossum Furcatum*. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 10(4), 307-310.

Reichert, J. M. (2011). Antibody-Based Therapeutics to Watch in 2011. *mAbs*, 3(1), 76-99.

Robertson, J., & Stevens, K. (2017). Pyrrolizidine Alkaloids: Occurrence, Biology, and Chemical Synthesis. *Nat. Prod. Rep.*, 34(1), 62-89.

Roeder, E. (1990). Carbon-13 NMR Spectroscopy of Pyrrolizidine Alkaloids. *Phytochemistry*, 29(1), 11-29.

Roeder, E. (1995). Medicinal Plants in Europe Containing Pyrrolizidine Alkaloids. *Pharmazie*, 50(2), 83-98.

Roeder, E. (2000). Medicinal Plants in China Sontaining Pyrrolizidine Alkaloids. *Pharmazie*, 55(10), 711-726.

Roeder, E., & Pflueger, T. (1995). Analysis of Pyrrolizidine Alkaloids: A Competitive Enzyme-Linked Immunoassay (ELISA) for the Quantitative Determination of Some Toxic Pyrrolizidine Alkaloids. *Nat. Toxins*, 3(4), 305-309.

Roeder, E., & Wiedenfeld, H. (2009). Pyrrolizidine Alkaloids in Medicinal Plants of Mongolia, Nepal and Tibet. *Pharmazie*, 64(11), 699-716.

Roeder, E., & Wiedenfeld, H. (2011). Pyrrolizidine Alkaloids in Plants Used in the Traditional Medicine of Madagascar and the Mascarene Islands. *Pharmazie*, 66(9), 637-647.

Roseman, D. M., Wu, X., & Kurth, M. J. (1996). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Detection of Pyrrolizidine Alkaloids: Immunogens Based on Quaternary Pyrrolizidinium Salts. *Bioconjugate Chem.*, 7(2), 187-195.

- Roseman, D. M., Xiying, W., Milco, L. A., Mary. Bober, R., Miller, B., & Kurth, M. J. (1992). Development of a Class-Specific Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Pyrrolizidine Alkaloids in Vitro. *J. Agr. Food Chem.*, 40(6), 1008–1014.
- Rubenstein, K. E., Schneider, R. S., & Ullman, E. F. (1972). "Homogeneous" Enzyme Immunoassay. A New Immunochemical Technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 47(4), 846-851.
- Sakamoto, S., Nagamitsu, R., Yusakul, G., Miyamoto, T., Tanaka, H., & Morimoto, S. (2017). Ultrasensitive Immunoassay for Monocrotaline Using Monoclonal Antibody Produced by N, N'-Carbonyldiimidazole Mediated Hapten-Carrier Protein Conjugates. *Talanta*, 168, 67-72.
- Sangster, A. W., & Stuart, K. L. (1965). Ultraviolet Spectra of Alkaloids. *Chem. Rev.*, 65(1), 69-130.
- Schlosser, G., Pocsfalvi, G., Malorni, A., Puerta, A., de Frutos, M., & Vékey, K. (2003). Detection of Immune Complexes by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17(24), 2741-2747.
- Schoental, R. (1968). Toxicology and Carcinogenic Action of Pyrrolizidine Alkaloids. *Cancer Res.*, 28(11), 2237-2246.
- Schramm, S., Köhler, N., & Rozhon, W. (2019). Pyrrolizidine Alkaloids: Biosynthesis, Biological Activities and Occurrence in Crop Plants. *Molecules*, 24(3).
- Schulz, M., Meins, J., Diemert, S., Zagermann-Muncke, P., Goebel, R., Schrenk, D., Schubert-Zsilavec, M., & Abdel-Tawab, M. (2015). Detection of Pyrrolizidine Alkaloids in German Licensed Herbal Medicinal Teas. *Phytomedicine*, 22(6), 648-656.
- Segall, H. J., & Dallas, J. L. (1983). ¹H NMR Spectroscopy of Pyrrolizidine Alkaloids. *Phytochemistry*, 22(5), 1271-1273.
- Segall, H. J., Wilson, D. W., Dallas, J. L., & Haddon, W. F. (1985). Trans-4-Hydroxy-2-Hexenal: A Reactive Metabolite from the Macrocyclic Pyrrolizidine Alkaloid Senecionine. *Science*, 229(4712), 472-475.

Senzolo, M., Germani, G., Cholongitas, E., Burra, P., & Burroughs, A. K. (2007). Venous Occlusive Disease: Update on Clinical Management. *World J. Gastroenterol.*, 13(29), 3918-3924.

Sikiti, P., Msagati, T. A., Mamba, B. B., & Mishra, A. K. (2014). Synthesis and Characterization of Molecularly Imprinted Polymers for the Remediation of PCBs and Dioxins in Aqueous Environments. *J. Environ. Health Sci. Eng.*, 12, 82-82.

Simonian, M. H. (2002). Spectrophotometric Determination of Protein Concentration. *Curr. Protoc. Cell Biol.*, 4(1), B1.3.1-B1.3.7.

Smith, L., & Culvenor, C. (1981). Plant Sources of Hepatotoxic Pyrrolizidine Alkaloids. *J. Nat. Prod.*, 44(2), 129-152.

Steenkamp, V., Stewart, M. J., & Zuckerman, M. (2000). Clinical and Analytical Aspects of Pyrrolizidine Poisoning Caused by South African Traditional Medicines. *Ther. Drug Monit.*, 22(3), 302-306.

Stegelmeier, B. L., Colegate, S. M., & Brown, A. W. (2016). Dehydropyrrolizidine Alkaloid Toxicity, Cytotoxicity, and Carcinogenicity. *Toxins*, 8(12), 356.

Stills, H. F. (2012). Chapter 11 - Polyclonal Antibody Production. In M. A. Suckow, K. A. Stevens, & R. P. Wilson (Eds.), *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents* (pp. 259-274). Cambridge, MA: Academic Press.

Stills, H. F., Jr. (2005). Adjuvants and Antibody Production: Dispelling the Myths Associated with Freund's Complete and Other Adjuvants. *ILAR J.*, 46(3), 280-293.

Stubenrauch, K., Wessels, U., Essig, U., Kowalewsky, F., Vogel, R., & Heinrich, J. (2013). Characterization of Murine Anti-Human Fab Antibodies for Use in an Immunoassay for Generic Quantification of Human Fab Fragments in Non-Human Serum Samples Including Cynomolgus Monkey Samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 72, 208-215.

Tamariz, J., Burgueño-Tapia, E., Vázquez, M. A., & Delgado, F. (2018). Chapter 1 - Pyrrolizidine Alkaloids. In H.-J. Knölker (Ed.), *The Alkaloids: Chemistry and Biology* (Vol. 80, pp. 1-314). Cambridge, MA: Academic Press.

- Tamayo, F. G., Turiel, E., & Martín-Esteban, A. (2007). Molecularly Imprinted Polymers for Solid-Phase Extraction and Solid-Phase Microextraction: Recent Developments and Future Trends. *J. Chromatogr. A*, *1152*(1), 32-40.
- Taylor, P. J. (2005). Matrix Effects: The Achilles Heel of Quantitative High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray–Tandem Mass Spectrometry. *Clin. Biochem.*, *38*(4), 328-334.
- Than, K. A., Stevens, V., Knill, A., Gallagher, P. F., Gaul, K. L., Edgar, J. A., & Colegate, S. M. (2005). Plant-Associated Toxins in Animal Feed: Screening and Confirmation Assay Development. *Anim. Feed Sci. Technol.*, *121*(1–2), 5-21.
- Tissot, B., Gonnet, F., Iborra, A., Berthou, C., Thielens, N., Arlaud, G. J., & Daniel, R. (2005). Mass Spectrometry Analysis of the Oligomeric C1q Protein Reveals the B Chain as the Target of Trypsin Cleavage and Interaction with Fucoidan. *Biochemistry*, *44*(7), 2602-2609.
- Valese, A. C., Molognoni, L., de Sá Ploêncio, L. A., de Lima, F. G., Gonzaga, L. V., Górnaiak, S. L., Daguer, H., Barreto, F., & Oliveira Costa, A. C. (2016). A Fast and Simple LC-ESI-MS/MS Method for Detecting Pyrrolizidine Alkaloids in Honey with Full Validation and Measurement Uncertainty. *Food Control*, *67*, 183-191.
- Van Regenmortel, M. H. (2009). What Is a B-Cell Epitope? *Methods Mol. Biol.*, *524*, 3-20.
- Van Weemen, B. K., & Schuurs, A. H. W. M. (1971). Immunoassay Using Antigen-Enzyme Conjugates. *FEBS Lett.*, *15*(3), 232-236.
- Velázquez-Campoy, A., Ohtaka, H., Nezami, A., Muzammil, S., & Freire, E. (2004). Isothermal Titration Calorimetry. *Curr. Protoc. Cell Biol.*, *23*(1), 17.18.11-17.18.24.
- Vial, S., & Wenger, J. (2017). Single-Step Homogeneous Immunoassay for Detecting Prostate-Specific Antigen Using Dual-Color Light Scattering of Metal Nanoparticles. *Analyst*, *142*(18), 3484-3491.
- Villanueva-Cañongo, C., Pérez-Hernández, N., Hernández-Carlos, B., Cedillo-Portugal, E., Joseph-Nathan, P., & Burgueño-Tapia, E. (2014). Complete ¹H NMR Assignments of

Pyrrolizidine Alkaloids and a New Eudesmanoid from *Senecio Polypodioides*. *Magn. Reson. Chem.*, 52(5), 251-257.

Vlatakis, G., Andersson, L. I., Müller, R., & Mosbach, K. (1993). Drug Assay Using Antibody Mimics Made by Molecular Imprinting. *Letters to Nature*, 361, 645-647.

Vu, B. K., Walsh, J., Dimitrov, D. S., & Ishima, R. (2009). Dynamics of Antibody Domains Studied by Solution NMR. *Methods Mol. Biol.*, 535, 533-543.

Wächter, M. (2012). *Tabellenbuch der Chemie - Daten zur Analytik, Laborpraxis und Theorie* (1 Ed.). Weinheim: Wiley-VCH.

Wang, T., Frandsen, H. L., Christiansson, N. R., Rosendal, S. E., Pedersen, M., & Smedsgaard, J. (2019). Pyrrolizidine Alkaloids in Honey: Quantification with and without Standards. *Food Control*, 98, 227-237.

Wang, Y.-P., Yan, J., Fu, P. P., & Chou, M. W. (2005). Human Liver Microsomal Reduction of Pyrrolizidine Alkaloid N-Oxides to Form the Corresponding Carcinogenic Parent Alkaloid. *Toxicol. Lett.*, 155(3), 411-420.

WHO. (1988). IPCS - Pyrrolizidine Alkaloids. *Environ. Health Crit.*, 80.

Wiedenfeld, H. (2013). Chapter 13 - Alkaloids Derived from Ornithine: Pyrrolizidine Alkaloids. In K. G. Ramawat & J.-M. Mérillon (Eds.), *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* (pp. 359-379). Berlin, Heidelberg: Springer Verlag

Wiedenfeld, H., Montes, C., Tawil, B., Contin, A., & Wynsma, R. (2006). Pyrrolizidine Alkaloid Level in *Senecio Bicolor* (Willd.) Tod, ssp. *cineraria* (DC.) from Middle Europe. *Pharmazie*, 61(6), 559-561.

Witte, L., Ernst, L., Adam, H., & Hartmann, T. (1992a). Chemotypes of Two Pyrrolizidine Alkaloid-Containing *Senecio* Species. *Phytochemistry*, 31(2), 559-565.

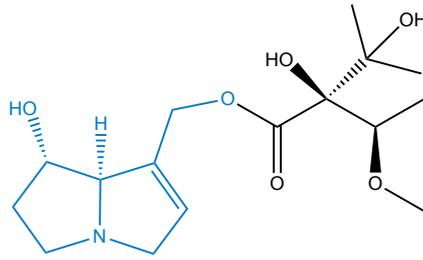
Witte, L., Rubiolo, P., Bicchi, C., & Hartmann, T. (1992b). Comparative Analysis of Pyrrolizidine Alkaloids from Natural Sources by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Phytochemistry*, 32(1), 187-196.

- Wretensjö, I., & Karlberg, B. (2003). Pyrrolizidine Alkaloid Content in Crude and Processed Borage Oil from Different Processing Stages. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, *80*(10), 963-970.
- Yalow, R. S., & Berson, S. A. (1960). Immunoassay of Endogenous Plasma Insulin in Man. *J. Clin. Invest.*, *39*(7), 1157-1175.
- Yang, H.-H., Zhou, W.-H., Guo, X.-C., Chen, F.-R., Zhao, H.-Q., Lin, L.-M., & Wang, X.-R. (2009). Molecularly Imprinted Polymer as SPE Sorbent for Selective Extraction of Melamine in Dairy Products. *Talanta*, *80*(2), 821-825.
- Yoshitake, S., Yamada, Y., Ishikawa, E., & Masseyeff, R. (1979). Conjugation of Glucose Oxidase from *Aspergillus Niger* and Rabbit Antibodies Using N-Hydroxysuccinimide Ester of N-(4-Carboxycyclohexylmethyl)-Maleimide. *Eur. J. Biochem.*, *101*(2), 395-399.
- Zhang, Z., Pan, H., & Chen, X. (2009). Mass Spectrometry for Structural Characterization of Therapeutic Antibodies. *Mass Spectrom. Rev.*, *28*(1), 147-176.
- Zhao, Y., Xia, Q., Gamboa da Costa, G., Yu, H., Cai, L., & Fu, P. P. (2012). Full Structure Assignments of Pyrrolizidine Alkaloid DNA Adducts and Mechanism of Tumor Initiation. *Chem. Res. Toxicol.*, *25*(9), 1985-1996.
- Zhou, W., Yang, S., & Wang, P. G. (2017). Matrix Effects and Application of Matrix Effect Factor. *Bioanalysis*, *9*(23), 1839-1844.
- Zhou, Y., Li, N., Choi, F. F.-K., Qiao, C.-F., Song, J.-Z., Li, S.-L., Liu, X., Cai, Z.-W., Fu, P. P., Lin, G., & Xu, H.-X. (2010). A New Approach for Simultaneous Screening and Quantification of Toxic Pyrrolizidine Alkaloids in Some Potential Pyrrolizidine Alkaloid-Containing Plants by Using Ultra Performance Liquid Chromatography–Tandem Quadrupole Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, *681*(1), 33-40.
- Zuckerman, M., Steenkamp, V., & Stewart, M. J. (2002). Hepatic Veno-Occlusive Disease as a Result of a Traditional Remedy: Confirmation of Toxic Pyrrolizidine Alkaloids as the Cause, Using an in Vitro Technique. *J. Clin. Pathol.*, *55*(9), 676-679.
- Zündorf, I., Wiedenfeld, H., Röder, E., & Dingermann, T. (1997). Generation and Characterization of Monoclonal Antibodies against the Pyrrolizidine Alkaloid Retrorsine. *Planta Medica*, *64*, 259-263.

Europin (Eu)

$C_{16}H_{27}NO_6$

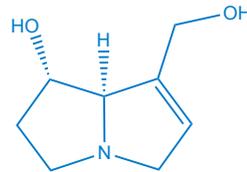
MW 329,18 g/mol



Heliotridin (Hd)

$C_8H_{13}NO_2$

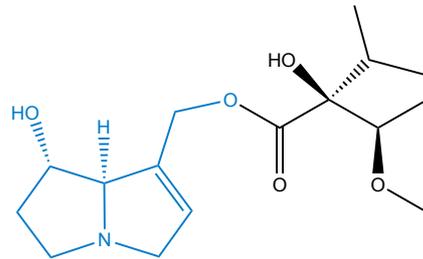
MW 155,09 g/mol



Heliotrin (Ht)

$C_{16}H_{27}NO_5$

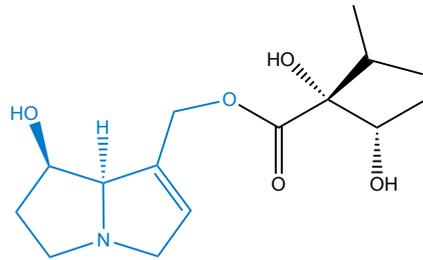
MW 313,19 g/mol



Indicin (Ic)

$C_{15}H_{25}NO_5$

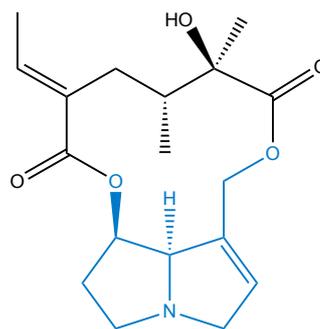
MW 299,17 g/mol



Integerrimin (Ig)

$C_{18}H_{25}NO_5$

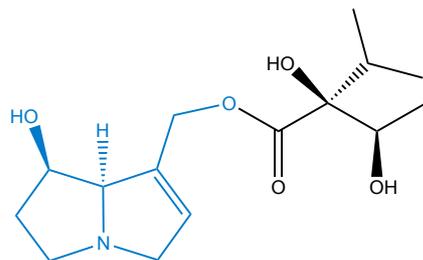
MW 335,17 g/mol



Intermedin (Im)

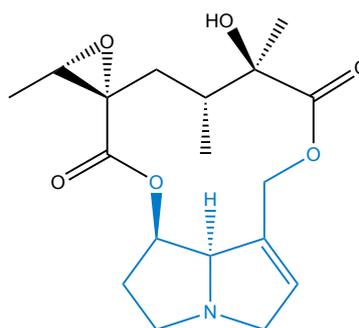
$C_{15}H_{25}NO_5$

MW 299,17 g/mol

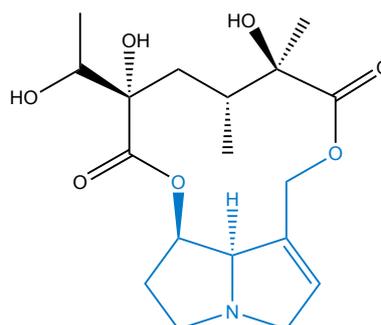


Jacobin (Jb) $C_{18}H_{25}NO_6$

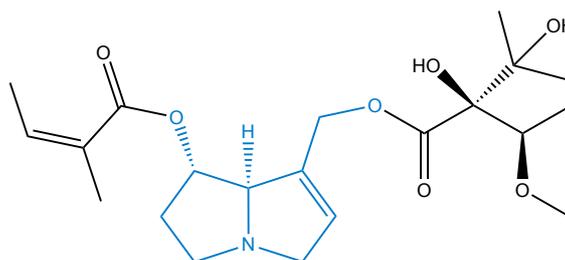
MW 351,17 g/mol

**Jacolin (Jl)** $C_{18}H_{27}NO_7$

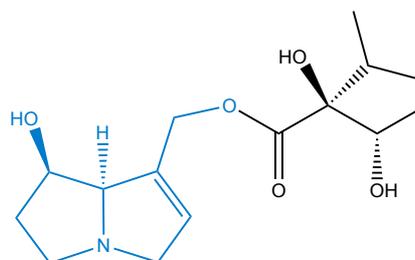
MW 369,18 g/mol

**Lasiocarpin (Lc)** $C_{21}H_{33}NO_7$

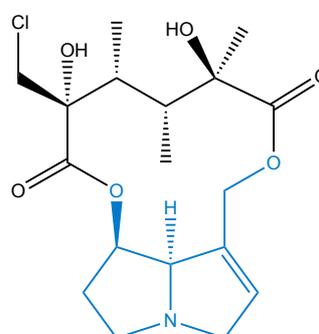
MW 411,23 g/mol

**Lycopsamin (Ly)** $C_{15}H_{25}NO_5$

MW 299,17 g/mol

**Merenskin (Mk)** $C_{18}H_{26}ClNO_6$

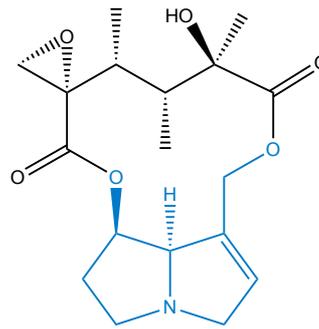
MW 387,14 g/mol



Merepoxin (Mx)

$C_{18}H_{25}NO_6$

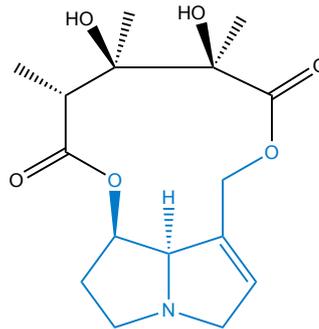
MW 351,17 g/mol



Monocrotalin (Mc)

$C_{16}H_{23}NO_6$

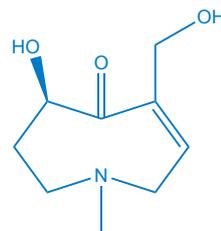
MW 325,15 g/mol



Otonecin (On)

$C_9H_{15}NO_3$

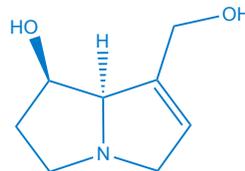
MW 185,11 g/mol



Retronecin (Rn)

$C_8H_{13}NO_2$

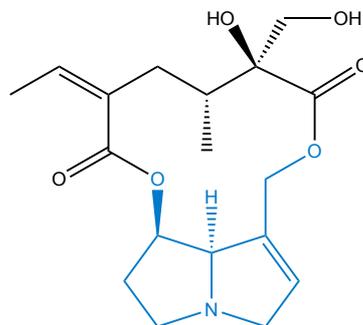
MW 155,09 g/mol



Retrorsin (Rs)

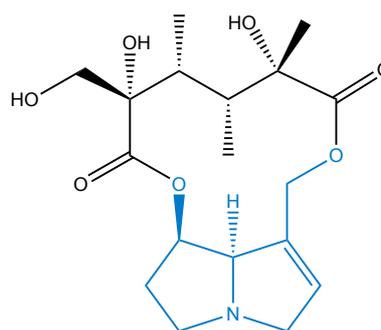
$C_{18}H_{25}NO_6$

MW 351,17 g/mol

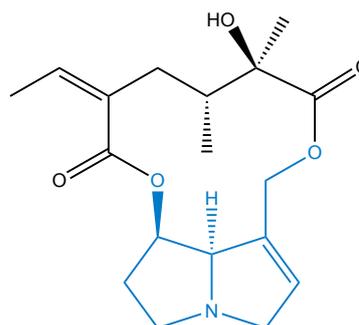


Sceleratin (Sl) $C_{18}H_{27}NO_7$

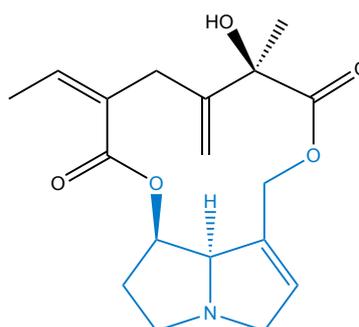
MW 369,18 g/mol

**Senecionin (Sc)** $C_{18}H_{25}NO_5$

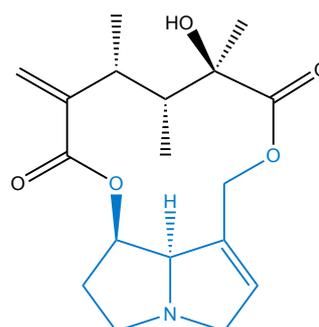
MW 335,17 g/mol

**Seneciphyllin (Sp)** $C_{18}H_{23}NO_5$

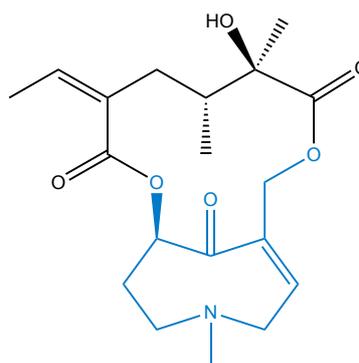
MW 333,16 g/mol

**Senecivernin (Sv)** $C_{18}H_{25}NO_5$

MW 335,17 g/mol

**Senkirkin (Sk)** $C_{19}H_{27}NO_6$

MW 365,43 g/mol



Anhang

Trichodesmin (Td)

$C_{18}H_{27}NO_6$

MW 353,18 g/mol

