



This is a postprint of an article published in
Bilitewski, Ursula
Biochemische Methoden in der Wasseranalytik - Stand der Technik und
Perspektiven - Teil. I: Molekulare Tests
Vom Wasser-das Journal , 104 (3) pp.7-19.

Biochemische Methoden in der Wasseranalytik – Stand der Technik und Perspektiven,

Teil I: Molekulare Tests

FA „Biochemische Arbeitsmethoden“ im HA III der Wasserchemischen Gesellschaft in der GDCh

Kontakt: Ursula Bilitewski*, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Mascheroder Weg 1, 38124 Braunschweig, ursula.bilitewski@gbf.de

Zusammenfassung

Biochemische Analysenmethoden beruhen auf der Wechselwirkung zwischen biologischen Materialien und Bestandteilen einer Probe. Als biologische Materialien werden definierte, isolierte biologische Makromoleküle, zum Beispiel spezifische Proteine, eingesetzt, aber auch ganze Organismen, wie Bakterien, Pilze, Zellkulturen oder Krebse, Fische, Mäuse oder Ratten. Im vorliegenden Beitrag wurden nur molekulare Methoden berücksichtigt, während die organismischen Tests separat diskutiert werden.

Die Wechselwirkung mit Bestandteilen der Probe kann bei molekularen Tests in der Regel eindeutig und quantitativ erfasst werden, wobei die Testprotokolle von der Art des biologischen Moleküls abhängig sind. In der Wasseranalytik werden diese Tests vor allem zur spezifischen, quantitativen Bestimmung von einzelnen Substanzen, aber auch zur Erfassung bestimmter biologischer Wirkungen einer Probe eingesetzt. Quantitative Bestimmungen werden vor allem mit immunanalytischen Methoden durchgeführt, wobei Tests für Pestizide oder Industriechemikalien, aber auch für (pathogene) Mikroorganismen oder mikrobielle Toxine existieren. Mikroorganismen lassen sich alternativ auch über genanalytische Methoden nachweisen, wobei die ausgewählten Nukleinsäuresequenzen typisch für einen einzelnen Organismus, eine Organismengruppe, aber auch für Organismeneigenschaften, wie Antibiotikaresistenz oder Potential zum Schadstoffabbau, sein können.

Die biologische Wirkung einer Probe kann mit molekularen Tests erfasst werden, wenn die Biomoleküle bekannt sind, die mit Bestandteilen einer Probe direkte Wechselwirkungen eingehen und diese Wechselwirkungen die Ursache für den beobachteten biologischen Effekt sind. Beispiele sind Rezeptortests zur Erfassung hormoneller Wirkungen, oder Enzymhemmtests mit Enzymen physiologischer Relevanz, wie der Acetylcholinesterase (neurotoxische Wirkung), Aromatase (hormonelle Wirkung) oder Proteinphosphatase (Leber- und Neurotoxicität).

Biochemical methods for water analysis – state of the art and perspectives, part I:

molecular assays

Summary

Biochemical analytical methods are based on the interaction between a biological component and constituents of a sample. Suitable biological materials are defined isolated macromolecules, such as specific proteins, but also whole organisms, such as bacteria, fungi, animal or human cell cultures and even animals. In the present contribution only molecular tests were considered, organismic tests are discussed in an accompanying article.

In molecular tests the interaction of the biological macromolecule with constituents of a sample can be detected unambiguously and quantitatively, with the test protocol being dependent on the type of the biological molecule. In water analysis these tests are used mainly for the quantitative determination of single compounds, but there are also examples in which they are used to detect the biological effect of a sample. Quantitative analysis is usually done by immunoanalytical methods, and tests were described for the determination of pesticides or industrial chemicals, but also of (pathogenic) microorganisms or microbial toxins. Microorganisms can alternatively be detected by gene analysis, in which the chosen sequence

of nucleic acids can be characteristic for a single organism, a group of organisms or properties of organisms, such as resistance to antibiotics or potential for degradation of pollutants.

The biological effect of a sample can be detected by molecular tests, if the biomolecule is known and available, which is the molecular target for compounds, for which an adverse effect in the whole organism is observed. The direct interaction between the target biomolecule and the compound has to be at least one of the reasons for this adverse effect. Examples are receptor assays, which detect the interaction of sample constituents to hormone receptors, as these interactions lead to endocrine effects. The detection of the inhibition of enzymes with physiological relevance is also known to be one indicator for adverse effects, such as the inhibition of acetylcholinesterase for neurotoxic effects, of aromatase for endocrine effects and of protein phosphatase for hepatotoxic and neurotoxic effects.

Einleitung

Am 22.12.2000 trat die Wasserrahmenrichtlinie der Europäischen Gemeinschaft in Kraft. Wesentliches Ziel dieser Richtlinie ist der Schutz und die Verbesserung des Zustandes aquatischer Ökosysteme und des Grundwassers und von Landökosystemen, die direkt vom Wasser abhängen [1]. Der Zustand des Wassers setzt sich aus dem „ökologischen Zustand“ und dem „chemischen Zustand“ zusammen. Der „ökologische Zustand“ eines Gewässers wird über die Struktur und Funktionsfähigkeit des aquatischen Ökosystems beschrieben und umfasst eine Kombination aus abiotischen Daten (u.a. morphologische Bedingungen, Temperatur, Sauerstoffgehalt) und biologischen Befunden, wie der biologischen Vielfalt im Ökosystem. Zur Erreichung des "guten chemischen Zustands" fordert Artikel 16 der Wasserrahmenrichtlinie spezifische Maßnahmen gegen die Gewässerverschmutzung durch einzelne Schadstoffe oder Schadstoffgruppen, die ein erhebliches Risiko für die aquatische Umwelt und durch die aquatische Umwelt (ggf. für den Menschen) darstellen. Die zu überwachenden Substanzen wurden in einer Liste der sogenannten prioritären Schadstoffe festgelegt. Bei der Auswahl dieser Stoffe sollte dem Grundsatz der Vorsorge Rechnung getragen und potentiell negative Auswirkungen der Substanzen auf der Basis einer wissenschaftlichen Bewertung des Risikos berücksichtigt werden.

Die Umsetzung der Wasserrahmenrichtlinie erfordert daher nach der Erfassung der Ist-Situation eine Routineüberwachung des Gewässerzustandes, wobei neben der quantitativen Beschreibung eine Beurteilung des Risikos einer kurz- aber auch einer langfristigen Beeinträchtigung des Zustandes der Ökosysteme erforderlich ist. Zu den langfristigen Beeinträchtigungen können zum Beispiel Populationsveränderungen im aquatischen Ökosystem gehören, aber auch Krankheiten, die auf eine chronische Exposition mit schädigenden Substanzen zurückzuführen sind.

Zusätzlich werden in neuerer Zeit aus Sorge vor einer Gefährdung der Bevölkerung durch beabsichtigte chemische oder biologische Kontaminationen des Trinkwassers, wie zum Beispiel

durch terroristische Aktivitäten, Anstrengungen zur Entwicklung von Frühwarnsystemen vor pathogenen Mikroorganismen und ihren Toxinen unternommen.

Biochemische Analysemethoden sind in verschiedenen Anwendungsbereichen etabliert. Sie beruhen grundsätzlich auf der Wechselwirkung zwischen einer biologischen Komponente und Bestandteilen der zu untersuchenden Probe. Dabei werden biologische Komponenten unterschiedlicher Komplexität eingesetzt, da es sich sowohl um isolierte, gut definierte Makromoleküle, wie Proteine oder Nukleinsäuren, handeln kann, aber auch um ganze Organismen, wie Bakterien, Pilze, Zellkulturen, Tiere oder Pflanzen. Die konkreten Testformate und Detektionsprinzipien hängen vor allem von der Art der biologischen Komponente ab und reichen von einfachen Inkubationsreaktionen, komplexeren Testabläufen, homogenen und heterogenen Tests bis hin zu Sensoren und Mikrochips. Auch die Interpretation der Ergebnisse hängt von der Art der biologischen Komponente ab: Mit zunehmender Komplexität nehmen die Möglichkeiten zu, einen Effekt auf die biologische Komponente zu untersuchen, es steigt aber auch die Zahl der möglichen, nicht immer im Detail bekannten Einflussfaktoren auf das Ergebnis. So lassen sich Wechselwirkungen zu biologischen Makromolekülen in der Regel gut charakterisieren und auch quantifizieren, während bei der Interpretation der Ergebnisse von organismischen Tests zum Beispiel die Komplexität der physiologischen Reaktionen des Organismus zu berücksichtigen ist. Dementsprechend ist es mit molekularen Tests prinzipiell möglich, Einzelsubstanzen quantitativ zu bestimmen, während mit organismischen Tests vor allem Summenparameter ermittelt werden [2, 3].

Im vorliegenden Beitrag werden die Möglichkeiten und Einsatzgebiete von molekularen Tests diskutiert, während die organismischen Tests separat beschrieben werden.

Voraussetzung für die Entwicklung molekularer biochemischer Tests ist eine ausreichende Verfügbarkeit der zugrundeliegenden Biomoleküle. Diese wurde in den letzten 20 – 30 Jahren durch die Entwicklung industrieller Bioproduktionsprozesse zur Herstellung von Enzymen und Antikörpern deutlich verbessert, so dass enzymatische und immunanalytische Tests zum

Beispiel aus der klinischen Diagnostik oder der Lebensmittelanalytik nicht mehr wegzudenken sind [4]. Dabei werden Enzyme oder Antikörper verwendet, die selbst in komplexen Proben (Lebensmittel, Blut, Serum, Urin) spezifisch mit einzelnen Substanzen reagieren. Dadurch sind quantitative Bestimmungen der jeweiligen Analyte (z.B. Glukose, Hormone, Antikörper) möglich. Auch für die Wasseranalytik wurden entsprechende Systeme zur quantitativen Bestimmung von Substanzen entwickelt [5 - 8], wobei immunanalytische Methoden die größte Bedeutung erlangt haben, und daher im vorliegenden Beitrag vorrangig beschrieben werden. Sie werden zum quantitativen Nachweis nicht nur von niedermolekularen organischen Substanzen, wie Pestiziden, eingesetzt, sondern auch von mikrobiellen Toxinen und, als Alternative zu klassischen mikrobiologischen Tests, von pathogenen Mikroorganismen. Durch die zunehmende Kenntnis von Sequenzen mikrobieller Gene lassen sich Mikroorganismen darüberhinaus auch über genanalytische Methoden spezifisch nachweisen, wobei die Untersuchung der mikrobiellen Vielfalt und der Nachweis definierter Eigenschaften, wie Pathogenität, Antibiotikaresistenz, Potential zum Abbau von Schadstoffen, von besondere Bedeutung sind. Von den verschiedenen denkbaren Formaten werden hier nur die neueren Entwicklungen der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), sowie der DNA-Chips berücksichtigt.

Die Formate dieser molekularen Tests sind in der Regel gut etabliert und wenigstens zum Teil automatisierbar, die Tests oft einfach durchführbar und die Ergebnisse eindeutig und quantitativ interpretierbar. Daher wäre es wünschenswert, auch zur Beurteilung der biologischen Wirkung von Proben, im Hinblick auf eine Risikobewertung, entsprechende molekulare Tests zur Verfügung zu haben. Dafür ist es jedoch erforderlich, dass die biologischen Makromoleküle oder biologischen Reaktionen, die durch die Schadstoffe beeinflusst werden und so zu einem unerwünschten Effekt führen, bekannt sind und als Reagenzien zur Verfügung stehen. Dies ist bislang nur in einzelnen Fällen gegeben. Beispiele sind die Hemmung von Enzymen mit physiologischer Relevanz, wie zum Beispiel die Hemmung der Acetylcholinesterase, oder die

Wechselwirkung mit Rezeptoren, wie den Östrogenrezeptoren, die zur Auslösung von Folge-reaktionen führt. Hier könnten die Erkenntnisse über molekulare toxikologische Mechanismen, die man sich vom Einsatz neuer analytischer Methoden, wie DNA-Chips, verspricht, zur Entwicklung weiterer Tests beitragen.

Immunanalytische Methoden

Immunanalytische Methoden beruhen auf der selektiven Erkennung eines Analyten, des Antigens oder Haptens, durch einen Antikörper, wobei der Anteil gebildeter Antigen-Antikörper-Komplexe von der Antigenkonzentration abhängig ist. Die Antikörper werden als Reagenzien zur selektiven Erkennung des Analyten selektioniert und haben daher für die physiologische Wirkung des Analyten keine Relevanz, so dass diese Methoden ausschließlich zur quantitativen Bestimmung von Analyten verwendet werden. Die Grundlagen und Konzepte der verschiedenen Testformate sind in Übersichtsartikeln [z. B. 4, 7, 9 - 12] und Lehrbüchern beschrieben, so dass hier auf eine ausführliche Darstellung verzichtet wird. Das Prinzip ist in Abb. 1 schematisch dargestellt. Zur Bestimmung niedermolekularer Substanzen werden vor allem die kompetitiven Formate (Abbn. 1b und c) eingesetzt, für hochmolekulare Analyte, wie z.B. Mikroorganismen oder mikrobielle Toxine, sind auch direkte Nachweise (Abb. 1a) oder das „Sandwich“-Format (Abb. 1d) geeignet.

Das am besten etablierte Testformat ist der ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), bei dem als Marker ein Enzym verwendet wird, das eine Farbreaktion katalysiert. Diese Tests werden überwiegend in Mikrotiterplatten durchgeführt, so dass die parallele, gegebenenfalls automatisierte Untersuchung mehrerer Proben möglich ist. Sie bilden aber auch die Grundlage für Röhrchentests auf Pestizide oder Industriechemikalien, die bei Stichprobenanalysen als Feldtests vor Ort einsetzbar sind, und für automatisierte Durchflusssysteme, die für eine kontinuierliche On-line-Überwachung [6, 13] oder aber als portable vor-Ort-Geräte [14] konzipiert wurden. Werden in einem System, bzw. auf einer Mikrotiterplatte, mehrere Antikörper

miteinander kombiniert, ist auch die simultane Bestimmung mehrerer Analyte in einer Probe möglich [10, 15].

Neben den von ELISAs abgeleiteten Formaten gibt es noch die Entwicklung von Immunsensoren [6, 9], bei denen Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen über Fluoreszenzfarbstoffkonjugate [11], Chemilumineszenz oder aber direkt, ohne zusätzliche Marker, detektiert werden. Erfolgt die Fluoreszenzmessung über planare Wellenleiter als Sensorchips, ist bei einer räumlich strukturierten Immobilisierung die simultane Detektion mehrerer Analyte möglich [16, 17]. Für den direkten Nachweis von Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen (Abb. 1a) sind Systeme geeignet, bei denen über physikalische Phänomene, wie die Oberflächenplasmonenresonanz (surface plasmon resonance, SPR) [18] oder den piezoelektrischen Effekt, die Massenbelegung auf der Sensoroberfläche detektiert wird. Bei der Bestimmung von niedermolekularen Analyten wird in der Regel ein Analyt-Derivat auf der Sensoroberfläche immobilisiert, die Probe mit dem Antikörper inkubiert und die Anlagerung der nicht-komplexierten Antikörper an die Sensoroberfläche detektiert (indirekt kompetitives Format) (Abb. 1c). Auch für diese Methoden gibt es Ansätze, die Einzelsubstanzeanalytik auf mehrere Analyte durch die Entwicklung entsprechender Arrays zu erweitern.

Für den Bereich der Wasseranalytik, und insbesondere der Trinkwasseranalytik, sind neben den Immunassays und -sensoren zum Nachweis von Pestiziden und Industriechemikalien auch Tests und Sensoren zur Bestimmung hormonell wirksamer Substanzen [12], pathogener Mikroorganismen oder ihrer Toxine beschrieben [19]. Für den Nachweis von bakteriellen Toxinen, sind sie die am häufigsten eingesetzten Methoden. Beim quantitativen Nachweis von Pestiziden oder Industriechemikalien werden dagegen häufig chromatographische Verfahren (LC, GC) bevorzugt, obwohl immunanalytisch niedrigere Konzentrationen (ng/L) bestimmt werden könnten, ohne dass eine Aufkonzentrierung der Probe notwendig wäre. Die Ursachen für den eingeschränkten Einsatz sind vielfältig und liegen zum Teil im zugrundeliegenden Prinzip: Antikörper können sehr selektiv sein, d. h. sie erkennen im wesentlichen einen einzi-

gen Analyten. Für jeden Analyten wird dementsprechend ein eigener Antikörper benötigt [14, 20]. Die Selektivität von Antikörpern wird auch in der Immunaффinitätschromatographie ausgenutzt, die als Probenvorbereitung anderen chromatographischen Methoden vorgeschaltet werden kann [12]. Werden Arrays benutzt, können allerdings mit Antikörpern auch chemisch sehr unterschiedliche Analyte, für die es zum Beispiel keine einheitliche chromatographische Methode gibt, gleichzeitig in einer Probe bestimmt werden. Andere Antikörper sind eher gruppenspezifisch, erkennen also chemisch verwandte Verbindungen. Dann ist jedoch nicht mehr die quantitative Bestimmung einer Einzelsubstanz, sondern nur die Angabe von „Substanzäquivalenten“ möglich. Wenn jedoch ein Antikörper gegenüber einer Substanzklasse ein sehr gleichmäßiges Kreuzreaktionsmuster aufweist, ist ein echter Summenwert bestimmbar [21]. Daraus ergibt sich, dass die Analyse von Substanzgemischen unbekannter Zusammensetzung mit chromatographischen Methoden umfassender möglich ist, da auch die Einzelkomponenten quantitativ bestimmt werden können.

Wesentliches Einsatzgebiet immunanalytischer Methoden kann also die quantitative Bestimmung ausgewählter prioritärer Substanzen sein, sowie die Erfassung von Toxinen oder pathogenen Keimen in Frühwarnsystemen.

Genanalytische Methoden

Genanalytische Methoden haben den Nachweis definierter Nukleinsäuresequenzen zum Ziel. Dabei geht es um den Nachweis definierter Mikroorganismen, die Analyse der Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften [22, 23], aber auch um Untersuchungen auf Genfunktionen, wie StoffwechsellLeistungen [22] oder antimikrobielle Resistenzen [24]. Grundlage aller Methoden ist die spezifische Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Basen der Nukleinsäuren (DNA bzw. RNA), Adenin (A) und Thymin (T) bzw. Guanin (G) und Cytosin (C), die zur Hybridisierung einer Sonde an ihre Zielgenesequenz führt.

Hier soll nicht auf die verschiedenen Testprinzipien und Formate eingegangen werden, die zum Nachweis definierter Nukleinsäuresequenzen beschrieben und etabliert sind [25], sondern nur auf die neueren Entwicklungen der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und der DNA-Chips oder DNA-Mikroarrays. Beide können auf die Analyse mikrobieller Gemeinschaften als Beitrag zur Beschreibung des ökologischen Zustandes angewandt werden, ohne dass eine Kultivierung der Mikroorganismen notwendig ist, und dienen in der hier beschriebenen Form nicht der Analyse der Wirkung einer Probe auf einen Organismus. Allerdings finden DNA-Chips gerade auch in diesem Bereich breite Anwendung (s. Teil III dieser Fachbeiträge).

Die FISH beruht auf der Analyse der Sequenzen von mikrobieller ribosomaler RNA (rRNA). Dazu werden Sonden verwendet, d.h. Oligonukleotide vorgegebener Sequenz mit einer typischen Länge von etwa 20 – 50 Nukleotiden, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Die Sequenz der Sonde ist komplementär zur nachzuweisenden Sequenz, so dass eine Bindung der Sonde an die rRNA, d. h. eine Hybridisierung, erfolgt, wenn die gesuchte Sequenz in der rRNA vorhanden ist. Je nach Spezifität der ausgewählten Nukleotidsequenz werden nur einzelne Bakterienarten, größere Gruppen verwandter Bakterien oder aber nahezu alle Bakterien erkannt [26]. Die rRNA hat sich als eine für diese Analysen geeignete Zielstruktur erwiesen, weil sie verschiedene Sequenzabschnitte besitzt, die im Verlauf der Evolution unterschiedlich hoch konserviert wurden, also eine Analyse auf unterschiedlichen taxonomischen Ebenen ermöglichen. Außerdem ist sie für eine Analyse leicht zugänglich und liegt in relativ hohen Kopienzahlen in einer einzelnen Zelle vor. Die Organismen in der Probe müssen nicht isoliert werden, sondern können direkt in der Probenmatrix mit der Sonde bzw. dem Sondenmisch inkubiert werden. Durch Verwendung unterschiedlicher Farbstoffe können bis zu 7 Sonden simultan eingesetzt und getrennt über Fluoreszenzmikroskope (Epifluoreszenzmikroskope oder Laser-Scanning Mikroskope) detektiert werden (Information von Zeiss).

DNA-Mikroarrays, auch DNA-Chips genannt, nutzen ebenfalls aus, dass Sequenzabschnitte in Nukleinsäuren spezifisch für bestimmte Bakterien, Bakteriengruppen, aber auch Genfunktionen sein können. Wie bei der FISH wird auf die Anwesenheit dieser Sequenzen durch Hybridisierung geeigneter Sonden geprüft. Im Unterschied zur FISH sind bei den DNA-Chips die Sonden auf einem Träger immobilisiert, wobei als Sonden entweder ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von bis zu 50 Nukleotiden oder aber PCR-Produkte mit einer Länge von mehreren hundert Nukleotiden verwendet werden [22, 24] (Abb. 2).

Als Träger für die Sonden setzen sich Glaschips zunehmend gegenüber Nylonmembranen durch. Zur Analyse muß die DNA aus der Probe, zum Beispiel Boden oder Wasser, extrahiert und in einer Folgereaktion markiert werden. Zur Markierung werden ebenfalls Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, aber es sind auch komplexere Nachweisreaktionen, wie z.B. Enzymverstärkungen über Wechselwirkungen zwischen Biotin und Streptavidin-Enzymkonjugaten, möglich [24].

Der Nachteil dieser Methode im Vergleich zur FISH ist die Extraktion der DNA aus der Probe und die nachfolgende Markierungsreaktion, der Vorteil die hohe Parallelität, mit der auf spezifische Gensequenzen analysiert werden kann. So wurden Chips mit 19 bzw. 50 Sonden zur Untersuchung bakterieller Isolate auf Tetrazyklin- bzw. β -Lactamase-Resistenzgene [24, 27] eingesetzt. Chips mit 36 bzw. 50 verschiedenen Sonden wurden entwickelt, um verschiedene pathogene Keime simultan nachweisen zu können [28, 29]. Mit Arrays mit 132 Sonden wurde das Spektrum sulfatreduzierender Bakterien in verschiedenen Umweltproben [30, 31], und mit 1662 Sonden das Potential zum Abbau organischer Substanzen in Bodenproben analysiert [32]. Außerdem liegen mittlerweile DNA-Chips vor, auf denen Sonden für alle vermuteten Gene eines Organismus abgebildet sind, so dass sich Unterschiede zwischen einzelnen Stämmen detektieren lassen [22]. Dementsprechend haben DNA-Chips das Potential, sowohl in der mikrobiellen Ökologie eingesetzt zu werden, als auch als Schnelltest- oder Frühwarnsysteme

zur Erkennung von Mikroorganismen mit unerwünschten Eigenschaften (z.B. pathogene oder antibiotikaresistente Keime).

Molekulare *in vitro* Tests zum Nachweis biologischer Wirkungen

Molekulare Tests zur Beschreibung biologischer Wirkungen von Substanzen können nur entwickelt werden, wenn bekannt ist, welches biologische Molekül eine direkte Wechselwirkung mit möglichen Wasserinhaltsstoffen eingeht. Diese Wechselwirkung sollte dann zu dem beobachteten biologischen Effekt führen. Beispiele sind die Hemmung physiologisch bedeutsamer Enzyme und Wechselwirkungen mit Rezeptoren.

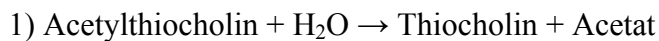
So findet zwar eine direkte Wechselwirkung auch zwischen Antikörpern und den entsprechenden Analyten (z.B. Pestiziden) statt, aber die Antikörper wurden in der Regel als selektive Reagenzien entwickelt und stehen in keinem Zusammenhang mit der physiologischen Reaktion auf den Analyten. Auch sind eine Reihe von Enzymhemmtests beschrieben, bei denen das Enzym unter dem Gesichtspunkt der guten Verfügbarkeit und Hemmbarkeit ausgewählt wurde, aber für die biologische Wirkung ohne Bedeutung ist, wie zum Beispiel die Hemmung des Enzyms Urease (katalysiert die Hydrolyse von Harnstoff) durch Schwermetalle. Dementsprechend werden im folgenden weder Hemmtests mit nicht physiologisch relevanten Enzymen noch Antikörpertests berücksichtigt.

Enzymhemmtests

Esterasen

Acetylcholinesterasen katalysieren den Abbau des Neurotransmitters Acetylcholin [33] und sind das molekulare Target für die neurotoxischen Organophosphat- und Carbamat-Insektizide, die zu einer Hemmung der Enzymaktivität führen. Symptome sind Schweißausbrüche und Sehstörungen, Muskelschwäche und -zittern, die auch zum Tod führen können. Acetylcholinesterasen aus verschiedenen Tieren, z. B. Rind (Erythrocyten), Zitteraal und Ro-

chen, sind als stabile, isolierte Proteine verfügbar. Ihre Aktivität ist mit einem einfachen photometrischen Test *in vitro* bestimmbar (DIN 38415-1) (Gl. 1).



(DTNB: 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure; TNB: 2-Nitro-5-mercaptobenzoat)

Zu beachten ist, dass die Sensitivität von Enzymen aus verschiedenen Quellen für verschiedene Substanzen unterschiedlich ist, dass also auch die verschiedenen Tiere unterschiedlich auf die jeweiligen Substanzen reagieren. Phosphorthionate führen in der Regel nicht zu einer Enzymhemmung, werden aber in Organismen metabolisch in die oxidierte Form überführt, die dann stark hemmende Effekte zeigt. Daher kann eine Behandlung der Probe mit Monoxygenasen notwendig sein [34], um das tatsächliche toxische Potential zu erfassen.

Die Exposition mit Organophosphaten induziert in anfälligen Lebewesen nach 2-4 Wochen ein neurologisches Syndrom, das mit sensorischen Störungen, Muskelkrämpfen und – schwäche verbunden ist (Organophosphate induced delayed neuropathy (OPIDN)). Diese Symptome sind auf eine Degeneration von Axonen zurückzuführen, die unabhängig von einer Hemmung der Acetylcholinesterasen und vermutlich irreversibel ist [35]. Als Ursache wird die Hemmung eines neuronalen Enzyms, der Neurotoxischen Esterase oder Neurotoxischen Esterase NTE, diskutiert [35, 36], deren Aktivität als Phenylvaleratesterase bestimmt wird (Gl. 2).



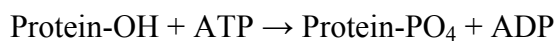
Phenol kann entweder photometrisch durch Reaktion mit Aminopyrin und Ferricyanid [37] oder aber mit Hilfe von Enzymelektroden [36] bestimmt werden. Das Enzym wird aus Gehirn oder Lymphozyten isoliert, wird aber auch im Blut nachgewiesen. Die Hemmung wird in der Regel auf den durch Paraoxon verursachten Effekt bezogen, da Paraoxon als NTE-resistent gilt.

Beide Esterase-Aktivitäten im Plasma oder Blut dienen auch als Biomarker für eine Exposition mit inhibierenden Substanzen (*in vivo* Aktivität).

Proteinphosphatasen

Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von Proteinen gehören zu den wichtigsten kovalenten Proteinmodifikationen, mit denen in Zellen die Aktivitäten von Enzymen reguliert werden. Proteinkinasen katalysieren die Phosphorylierung, Proteinphosphatasen die Dephosphorylierung:

3) Proteinkinase:



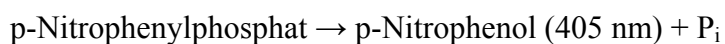
4) Proteinphosphatase



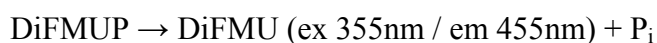
Von den im Wasser gefundenen Substanzen ist die Proteinphosphatase-hemmende Wirkung der Microcystine und anderer Algentoxine bekannt, die zu Leberschädigungen, aber auch zu neurotoxischen Effekten (Kopfschmerzen, Krämpfen, Übelkeit) führt, wobei die genauen Signaltransduktionskaskaden von der Proteinphosphatase-Hemmung zur Leberschädigung noch nicht bekannt sind.

Phosphatase-Hemmtests lassen sich als *in-vitro*-Tests in Mikrotiterplatten durchführen, da Enzymsubstrate verwendet werden können, deren Absorptions- bzw. Fluoreszenzeigenschaften sich durch die Dephosphorylierung ändern (Gl. 5, 6).

5) photometrischer Nachweis der Phosphatase-Aktivität:



6) fluorimetrischer Nachweis der Phosphatase-Aktivität:



(DiFMUP: 6,8-Difluoro-4-methylumbelliferylphosphat)

Diese Tests wurden bereits eingesetzt, um die Toxine in Muscheln [38] oder Seen [39] nachzuweisen. Sie sind auch geeignet, die *in vivo*-Aktivität der Proteinphosphatase zu detektieren, da diese auch als Biomarker für eine Exposition mit Algengiften dient.

Aromatase

Das Enzym Aromatase gehört zur Klasse der CytochromP450-Enzyme und ist für die Synthese von Östrogenen aus Androgenen essentiell. Es katalysiert die Umwandlung von Androstendion bzw. Testosteron in Östradiol. Die Hemmung dieses Enzyms wird als Ursache einiger Störungen des Sexualhormonsystems durch Umweltsubstanzen betrachtet (endokrine Wirkungen) [40 - 42].

Die Umwandlung von Androstendion in Östradiol wird auch beim Nachweis der Enzymaktivität eingesetzt. So werden Nierenzelllinien, die mit dem Aromatase-Gen transfiziert wurden, oder Plazentazelllinien mit Tritium-markiertem Androstendion inkubiert, und anschließend wird die Bildung des resultierenden Tritium-markierten Östrons mit Radioimmunoassays detektiert [40, 41]. Alternativ kann die Bildung von Tritium-markiertem Wasser detektiert werden, wenn die Aromatase aus Mikrosomen der menschlichen Plazenta sowie [1β - ^3H]-Androstendion als Substrat verwendet wird.

Trotz des Einsatzes radioaktiv markierter Verbindungen wurden in umfangreicheren Studien verschiedene Pestizide und Herbizide auf ihre Effekte auf die Aromatase-Aktivität untersucht, wobei inhibierende Wirkungen zum Teil bereits bei Konzentrationen unterhalb der für die Anwendung empfohlenen Konzentration beobachtet wurden [40, 42, 43].

Rezeptor-Tests

Photosynthetisches Reaktionszentrum

Einige Herbizide, wie zum Beispiel Triazine oder Phenylharnstoffe, binden an das Photoreaktionszentrum von Pflanzen und inhibieren durch Blockade des lichtgetriebenen Elektronen-

transfers die Photosynthese. Die Bindung erfolgt an der Chinon-Bindestelle (Q_B) des Photosystems II, so dass die natürlichen Elektronenakzeptoren verdrängt werden. Es wurde gezeigt, dass die relevanten Herbizide auch an die Photoreaktionszentren der Purpurbakterien *Rhodospirillum rubrum* und *Rhodospirillum rubrum* binden [44, 45]. Es handelt sich in allen Fällen um membranständige Proteinkomplexe, die jedoch aus Bakterien sehr viel leichter funktionell zu isolieren sind als aus Pflanzen. Deshalb wurden die bakteriellen Proteine als Grundlage für Tests auf Inhibitoren des photosynthetischen Elektronentransfers verwendet. Die Testformate ähnelten denen in Abbn. 1a [45] und 1c [44] für Immunassays beschriebenen, nur dass anstelle von Antikörpern die Photoreaktionszentren verwendet wurden [44, 45]. Beim indirekt kompetitiven Format war eine Markierung des Photoreaktionszentrums nicht notwendig, da die mit der Proteinbindung verbundene Änderung des Brechungsindex direkt optisch detektiert wurde [44].

Der Mechanismus der Inhibierung der Photosynthese durch Bindung ans Photoreaktionszentrum II liegt der Wirkung auch chemisch unterschiedlicher Herbizide zugrunde, was durch entsprechende Bindungstests nachgewiesen werden konnte.

Zytoplasmatische Rezeptoren - Steroidhormonrezeptoren

Steroidhormone induzieren die Expression hormonspezifischer Gene, indem sie mit einem zytoplasmatischen Rezeptorprotein einen Rezeptor - Hormon (Ligand) - Komplex bilden. Durch diese Komplexbildung wird der Rezeptor aktiviert, so dass er dimerisiert. Als Dimer wandert er in den Zellkern, lagert sich dort an spezifische Erkennungssequenzen auf der DNA an und führt in Kombination mit anderen Proteinen dann zur Expression der entsprechenden Gene und Bildung der Proteine (Abb. 3).

Dieser Mechanismus ist in ähnlicher Form bei allen Rezeptoren der Familie der zytoplasmatischen oder Kernrezeptoren zu finden. Zu dieser Familie gehören neben den bereits erwähnten Steroidhormonrezeptoren unter anderem der Rezeptor für Vitamin D, für Thyroidhormone,

für Corticoide, der sogenannte Dioxinrezeptor (auch Ah-Rezeptor genannt) und andere Rezeptoren für Xenobiotika [46].

Die Anlagerung eines Liganden an den Rezeptor, und damit der erste Schritt der entsprechenden Signalkaskade, kann auf verschiedene Arten detektiert werden. Gelingt es, die Rezeptoren aus der Leber zu isolieren [47] oder rekombinant herzustellen [48], so dass sie in ausreichenden Mengen zur Verfügung stehen, können proteinbasierte Tests aufgebaut werden, die ähnliche Formate besitzen, wie in Abb. 1 für Immunoassays dargestellt (anstelle der Antikörper werden die Rezeptoren eingesetzt). So wurden mit Östrogen-, Androgen- und Progesteron-Rezeptoren kompetitive Tests entwickelt, bei denen als Marker Tritium verwendet wurde, das heißt, dass die Verdrängung von ^3H -markiertem Östradiol, Progesteron bzw. Testosteron durch Bestandteile der Probe detektiert wurde (Format nach Abb. 1b) [47, 48]. Mit diesen Tests wurden Affinitäten verschiedener Insektizide, Fungizide, Herbizide und Industriechemikalien zu den jeweiligen Steroidhormonrezeptoren ermittelt. Im indirekt kompetitiven Format (analog zu Abb. 1c) wurde ein Östradiol-Protein-Konjugat durch Adsorption, bzw. ein Östradiol-Derivat kovalent an eine Oberfläche gebunden. Der Rezeptor wurde mit der zu untersuchenden Probe gemischt und die Bindung des nicht-komplexierten Rezeptorproteins wurde entweder mit einem spezifischen Antikörper [49, 50] oder direkt nachgewiesen [51].

Ohne die rekombinante Herstellung der Rezeptorproteine kommen Tests mit rekombinanten Mikroorganismen aus (Abb. 4). Dabei wird ausgenutzt, dass die Bindung des aktivierten Rezeptors an seine spezifische Erkennungssequenz auf der DNA die Aktivierung der Expression von Genen auslöst. Die Mikroorganismen (entweder Hefezellen oder tierische Zelllinien) werden genetisch so verändert, dass sie den Rezeptor als Fremdprotein bilden (z.B. Östrogenrezeptor in Hefezellen), und dass sie auf einem Plasmid die Erkennungssequenz für den aktivierten Rezeptor in Kombination mit dem Gen für ein leicht nachweisbares Protein (Reportergen bzw. Reporterprotein) besitzen. Die Bindung eines Liganden führt dann zur Aktivierung der Produktion dieses Reporterproteins. Etabliert sind Tests mit gentechnisch veränder-

ten Hefestämmen (YES-Test) bzw. tierischen oder menschlichen Zelllinien (ER-CALUX) (z.B. Brustkrebstzelllinie [52]; Nierenzellen (HEK293) [53], Leberzellen [54], Eierstockzelllinie (CHO) [55]). Reporterproteine sind Luziferase (Lichtentstehung), β -Galactosidase (Rot- bzw. Blaufärbung) oder das grün fluoreszierende Protein (GFP) [54].

In der überwiegenden Zahl der Berichte wurden als Rezeptoren die Steroidhormonrezeptoren eingesetzt. Das gleiche Prinzip ist aber auch auf Liganden der anderen zytosolischen bzw. Kernrezeptoren, wie den Dioxin-Rezeptor (Ah-Rezeptor) anwendbar [53].

Da die Tests einfach durchführbar und auswertbar sind, sind sie automatisierbar und für Screeningzwecke einsetzbar. Sie wurden bislang nicht nur zum Nachweis der hormonellen Wirkungen einer großen Zahl von Pestiziden oder der Bindung an den Ah-Rezeptor eingesetzt, sondern auch zur Analyse von Wasserproben [50] oder Fischgalle [52]. Bei den Untersuchungen mit dem Ah-Rezeptor ist zu beachten, dass zwar die krebsauslösende Wirkung seiner Liganden bzw. oxidierten Metabolite zum Teil bekannt ist, diese aber nicht notwendigerweise in ursächlichem Zusammenhang mit der Bindung an den Rezeptor steht.

Rezeptoren für Neurotransmitter

Oben war bereits der Neurotransmitter Acetylcholin erwähnt worden, der Nervenzellen über Wechselwirkungen mit dem zugehörigen Rezeptor, dem Acetylcholin-Rezeptor, stimuliert [33]. Bei diesem und anderen Neurotransmitter-Rezeptoren handelt es sich um integrale Membranproteine, die in der Regel aus mehreren Untereinheiten bestehen. Durch Bindung des Liganden, d.h. des Neurotransmitters, öffnet sich ein Ionenkanal, so dass Kationen, wie Na^+ oder Ca^{2+} , in die Zelle strömen und dadurch Folgereaktionen ausgelöst werden. Anstelle des natürlichen Liganden binden auch eine Reihe von Therapeutika und Neurotoxinen (z.B. Schlangengifte) an diese Rezeptoren [56]. Für Bindungsstudien muß vor allem die Funktionalität der Rezeptoren gewährleistet sein, was durch Einbettung in künstliche Lipidmembranen [56] oder aber durch zellbasierte Tests erreicht werden kann. Die Bindung von Liganden wur-

de bei Rezeptoren in artifiziellen Lipidschichten analog zum indirekt kompetitiven Immunoassayformat (Abb. 1c; Rezeptoren anstelle von Antikörpern) detektiert. Geeignet war auch hier zum Beispiel der Einsatz der SPR-Technik zur markierungsfreien Detektion der Affinitätsreaktion. Werden zelluläre Tests verwendet, kann zum Beispiel der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration detektiert werden [57].

Diese Tests wurden bislang nur für ausgewählte Substanzen mit therapeutischen Anwendungen und nicht als Routinetests in der Umweltanalytik eingesetzt, haben aber das Potential neurotoxische Effekte zu erfassen, die über Wechselwirkungen mit den Rezeptoren ausgelöst werden.

Diskussion und Perspektiven

Biochemische Methoden wurden in der Wasseranalytik traditionell als Toxizitätstests eingesetzt, haben aber in den letzten 15 Jahren auch an Bedeutung zur quantitativen Bestimmung von einzelnen Substanzen gewonnen. Hier sind vor allem die immunanalytischen Verfahren zu nennen, die im Bereich der Pestizidanalytik jedoch mit chromatographischen Methoden konkurrieren müssen. Für Frühwarnsysteme vor biologischen Toxinen gibt es in der Regel keine gute Alternative zu den Antikörper-basierten Tests, und auch für den raschen Nachweis pathogener Organismen werden häufig immunanalytische Methoden den langwierigeren klassischen mikrobiellen Methoden vorgezogen. In neuerer Zeit entwickeln sich hier jedoch genanalytische Methoden als Alternative, da zum Beispiel mit DNA-Chips die Anwesenheit einer Vielzahl von Organismen erfasst werden kann.

Neben der Beschreibung des Zustandes einer Wasserprobe durch die Konzentrationsangabe von Einzelanalyten oder Substanzäquivalenten ist die Risikobewertung von zunehmender Bedeutung, was die Untersuchung auch auf komplexe biologische Wirkungen, wie Beeinträchtigungen der Fortpflanzungsfähigkeit, des Immunsystems oder des Nervensystems, erforderlich macht. Die diesen unerwünschten Wirkungen zugrunde liegenden Mechanismen sind vielfach

nicht bekannt, so dass bislang keine molekularen Tests zur Verfügung stehen, die diese Wirkungen komplett abbilden. In einzelnen Fällen sind molekulare Angriffspunkte und die folgenden Signaltransduktionskaskaden bekannt, und diese Kenntnisse wurden auch bereits zur Etablierung entsprechender molekularer Tests ausgenutzt. Aber es zeigt sich, dass diese Kenntnisse nur einen Ausschnitt aus der Komplexität der intra- und interzellulären Reaktionen darstellen. Deshalb sind hier noch umfangreiche weitere Untersuchungen erforderlich, da einfache, preiswerte Tests dringend benötigt werden, um den biologischen und chemischen Zustand von Gewässern so überwachen zu können, dass auch langfristig Schädigungen von aquatischen und angrenzenden terrestrischen Ökosystemen vermieden werden. Es wird erwartet, dass hier die modernen analytischen Methoden der molekularen Biologie Fortschritte bringen werden, da mit ihrer Hilfe die Kenntnisse über molekulare Mechanismen, die zu Störungen der Funktion physiologischer Systeme (z. B. Immunsystem, Nervenzellen, Organfunktionen, Tumorbildung) führen, zunehmen. Zusammen mit den Möglichkeiten der Mikrotechnik und Chipentwicklung sind dann auch komplexere *in vitro* Testsysteme denkbar, in denen diese Kenntnisse umfassend analytisch ausgenutzt werden und die trotzdem noch einfach durchführbar bleiben. Hier können vermutlich auch Testformate und Technologien aus dem Wirkstoffscreening übernommen bzw. angepasst werden.

Literatur

- [1] Europäische Wasserrahmenrichtlinie unter
<http://www.bmu.de/gewaesserschutz/doc/3063.php>
- [2] Hrsg.: K.G. Steinhäuser, P.D. Hansen: *Biologische Testverfahren*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, **1992**
- [3] K. Fent: *Ökotoxikologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2003**
- [4] E. Märtlbauer, Immunoassays in der Lebensmittelanalytik, in: *Analytiker-Taschenbuch 18*, Springer – Verlag, Berlin, **1998**, 223 - 250
- [5] Hrsg.: Fachgruppe Wasserchemie: *Biochemische Methoden zur Schadstoffeffassung im Wasser*, VCH, Weinheim, **1993**
- [6] Hrsg.: U. Bilitewski, A.P.F. Turner: *Biosensors for Environmental Monitoring*, harwood academic publishers, Amsterdam, **2000**
- [7] U. Obst, U. Bilitewski, B. Hock: Anwendung immunchemischer Methoden in der Wasseranalytik, in: *Analytiker-Taschenbuch 18*, Springer – Verlag, Berlin, **1998**, 251 – 309
- [8] U. Bilitewski, J. Fischer, U. Obst: Anwendung enzymatischer Methoden in der Wasseranalytik, in: *Analytiker-Taschenbuch 17*, Springer – Verlag, Berlin, **1998**, 263 – 291
- [9] C.R. Suri, M. Raje, G.C. Varshney: Immunosensors for pesticide analysis: antibody production and sensor development, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2002**, 22, 15 – 32
- [10] U. Bilitewski: Simultaneous Determination of Several Analytes Using Immunochemical Techniques – an Overview, *Food Technol. Biotechnol.* **1998**, 36, 135 – 144
- [11] M. Wortberg, M. Orban, R. Renneberg, K. Cammann: Fluorimetric Immunosensors, *Handbook ob Biosensors and Electronic Noses; Medicine, Food, and the Environment*, **1997**, 17, 369 – 405, CRC Press Inc., Boca Raton
- [12] M.C. Estévez-Alberola, M.P. Marco: Immunochemical determination of xenobiotics with endocrine disrupting effects, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 378, 563 – 575

- [13] S.R. Jain, E. Borowska, R. Davidsson, M. Tudorache, E. Pontén, J. Emnéus: A chemiluminescence flow immunosensor based on a porous monolithic metacrylate and polyethylene composite disc modified with protein G, *Biosens. Bioelectr.* **2004**, *19*, 795 – 803
- [14] I.M. Ciomasu, P.M. Krämer, C.M. Weber, G. Kolb, D. Tiemann, S. Windisch, I. Frese, A.A. Kettrup: A new, versatile field immunosensor for environmental pollutants. Development and proof of principle with TNT, diuron, and atrazine, *Biosens. Bioelectr.* **2005**, *21*, 354 - 364
- [15] Weller, M.G.; Schuetz, A.J.; Winklmaier, M. Niessner, R.: Highly parallel affinity sensor for the detection of environmental contaminants in water, *Anal Chim Acta* **1999**, *393*, 29-41
- [16] F.S.Ligler, C.R. Taitt, L.C. Shriver-Lake, K.E. Sapsford, Y. Shubin, J.P. Golden: Array biosensor for detection of toxins, *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 469-477
- [17] S. Rodriguez-Mozaz, S. Reder, M. Lopez de Alda, G. Gauglitz, D. Barceló: Simultaneous multi-analyte determination of estrone, isoproturon, and atrazine in natural waters by the RIVER ANALYser (RIANA), an optical immunosensor, *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19*, 633 – 640
- [18] W.M. Mullett, E.P.C. Lai, J.M. Yeung: Surface plasmon resonance-based immunoassays, *Methods* **2000**, *22*, 77 - 91
- [19] Paddle, B.M.: Biosensors for chemical and biological agents of defence interest, *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 1079 - 1113
- [20] Belleville, E, Dufa, M.; Aamand, J.; Bruun, L.; Clausen, L.; Christensen, C.B.V.: Quantitative microarray pesticide analysis, *J. Immunol. Meth.* **2004**, *286*, 219-229
- [21] A Zeck, MG Weller, D Bursill, R Niessner: Generic microcystin immunoassay based on monoclonal antibodies against Adda, *Analyst* **2001**, *126*, 2002-2007
- [22] J. Zhou: Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis, *Curr. Op. Microbiol.* **2003**, *6*, 288 – 294

- [23] R. Amann, W. Ludwig: Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology, *FEMS Microbiol. Rev.*, **2000**, *24*, 555 – 565
- [24] D.R. Call, M.K. Bakko, M.J. Krug, M.C. Roberts: Identifying antimicrobial resistance genes with DNA microarrays, *Antimicrob. Agents Chemotherap.*, **2003**, *47*, 3290 – 3295
- [25] F. Lottspeich, H. Zorbas, Bioanalytik, Spektrum Akad. Verlag Heidelberg, 1998
- [26] R. Amann, F.O. Glöckner, A. Neef: Modern methods in subsurface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes, *FEMS Microbiol. Rev.*, **1997**, *20*, 191 – 200
- [27] V. Grimm, S. Ezaki, M. Susa, C. Knabbe, R.D. Schmid, T.T. Bachmann, Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM beta-lactamases that confer resistance, *J. Clin. Microbiol.*, **2004**, *42*, 3766 - 3774
- [28] N. Sergeev, M. Distler, S. Courtney, S.F. Al-Khaldi, D. Volokhov, V. Chizhikov, A. Rasooly: Multipathogen oligonucleotide microarray for environmental and biodefense applications, *Biosens. & Bioelectr.*, **2004**, *20*, 684 – 698
- [29] D.M. Leinberger, U. Schumacher, I.B. Autenrieth, T.T. Bachmann, Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses, *J. Clin. Microbiol.*, **2005**, *43*, 4943 - 4953
- [30] A. Loy, A. Lehner, N. Lee, J. Adamczyk, H. Meier, J. Ernst, K.H. Schleifer, M. Wagner: Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2002**, *68*, 5064 - 5081
- [31] A. Loy, K. Küsel, A. Lehner, H.L. Drake, M. Wagner: Microarray and functional gene analyses of sulfate-reducing prokaryotes in low-sulfate, acidic fens reveal occurrence of recognized genera and novel lineages, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2004**, *70*, 6998 - 7009

- [32] S.K. Rhee, X. Liu, L. Wu, S.C. Chong, X. Wan, J. Zhou: Detection of genes involved in biodegradation and biotransformation in microbial communities by using 50-mer oligonucleotide microarrays, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2004**, *70*, 4303 – 4317
- [33] H. Soreq, S. Seidman: Acetylcholinesterase – new roles for an old actor, *Nature Reviews Neuroscience*, **2001**, *2*, 294 – 302
- [34] H. Schulze, R.D. Schmid, T.T. Bachmann: Activation of phosphorothionate pesticides based on a cytochrom P450 BM-3 (CYP102 A1) Mutant for expanded neurotoxin detection in food using acetylcholinesterase biosensors, *Anal. Chem.*, **2004**, *76*, 1720 – 1725
- [35] F. Kamel, J.A. Hoppin, Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease, *Environ Health Perspect*, **2004**, *112*, 950 – 958
- [36] L.V. Sigolaeva, A. Markower, A.V. Eremenko, G.F. Makhaeva, V.V. Malygin, I.N. Kurochkin, F.W. Scheller: Bioelectrochemical analysis of neuropathy target esterase activity in blood, *Anal. Biochem.*, **2001**, *290*, 1-9
- [37] M.A. Escudero, M.A. Sogorb, E. Vilanova: An automatable microassay for phenyl valerate esterase activities sensitive to organophosphorous compounds, *Toxicol. Lett.*, **1996**, *89*, 241 - 247
- [38] M.R. Vieyatas, O.I. Fontal, F. Leira, J.M.V. Baptista de Sousa, L.M. Botana : A fluorescent microplate assay for diarrheic shellfish toxins, *Anal. Biochem.*, **1997**, *248*, 258 – 264
- [39] A. Hotto, M. Satchwell, G. Boyer: Seasonal production and molecular characterization of microcystins in Oneida Lake, New York, USA, *Environ. Toxicol.*, **2005**, *20*, 243 – 248
- [40] S. Richard, S. Moslemi, H. Sipahutar, N. Benachour, G.-E. Seralini: Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase, *Environ. Health Perspect.*, **2005**, *113*, 716 – 720

- [41] C. Nativelle-Serpentini, S. Richard, G.E. Seralini, P. Sourdain: Aromatase activity modulation by lindane and bisphenol-A in human placental JEG-3 and transfected kidney E293 cells, *Toxicol. in vitro*, **2003**, *17*, 413 – 422
- [42] A.M. Vinggaard, C. Hnida, V. Breinholt, J.C. Larsen: Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro, *Toxicol. in vitro*, **2000**, *14*, 227 – 234
- [43] H.R. Andersen, A.M. Vinggaard, T.H. Rasmussen, I.M. Gjermansen, E.C. Bonefeld-Jorgensen: Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2002**, *179*, 1-12
- [44] R. Jockers, F.F. Bier, R.D. Schmid: Specific binding of photosynthetic reaction centres to herbicide-modified grating couplers, *Anal. Chim. Acta*, **1993**, *280*, 53 – 59
- [45] C. Nakamura, M. Hasegawa, N. Nakamura, J. Miyake: Rapid and specific detection of herbicides using a self-assembled photosynthetic reaction center from purple bacterium on an SPR chip, *Biosens. Bioelectr.*, **2003**, *18*, 599 - 603
- [46] H. Gronemeyer, J.A. Gustafsson, V. Laudet: Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily, *Nature Rev. Drug Disc.*, **2004**, *3*, 950 – 964
- [47] I. Lutz, W. Kloas: Amphibians as a model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding, *Sci. Total Environ.*, **1999**, *225*, 49 - 57
- [48] M.L. Scippo, C. Argiris, C. van de Weerd, M. Muller, P. Willemsen, J. Martial, G. Maghuin-Rogister: Recombinant human estrogen, androgen and progesterone receptors for detection of potential endocrine disruptors, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2004**, *378*, 664 – 669
- [49] M. Seifert, S. Haindl, B. Hock: Development of an enzyme linked receptor assay (ELRA) for estrogens and xenoestrogens, *Anal. Chim. Acta* **1999**, *386*, 191 – 199
- [50] M. Seifert: Luminescent enzyme-linked receptor assay for estrogenic compounds, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2004**, *378*, 684 – 687

- [51] M. Usami, K. Mitsunaga, Y. Ohno: Estrogen receptor binding assay of chemicals with a surface plasmon resonance biosensor, *J. Steroid Biochem Mol. Biol.*, **2002**, *81*, 47 – 55
- [52] C.J. Houtman, A.M. van Oostveen, A. Brouwer, M.A. Lamoree, J. Legler: Identification of estrogenic compounds in fish bile using bioassay-directed fractionation, *Environ. Sci. Toxicol.*, **2004**, *38*, 6415 – 6423
- [53] R.H.M.M. Schreurs, E. Sonneveld, P.T. van der Saag, B. van der Burg, W. Seinen: Examination of the in vitro (anti)estrogenic, (anti)androgenic and (anti)dioxin-like activities of tetralin, indane and isochroman derivatives using receptor-specific bioassays, *Toxicol. Lett.*, **2005**, *156*, 261 – 275
- [54] S.R. Nagy, J.R. Sanborn, B.D. Hammock, M.S. Denison: Development of a green fluorescent protein-based cell bioassay for the rapid and inexpensive detection and characterization of Ah receptor agonists, *Toxicol. Sci.*, **2002**, *65*, 200 – 210
- [55] H. Kojima, E. Katsura, S. Takeuchi, K. Niiyama, K. Kobayashi: Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using chinese hamster ovary cells, *Environ. Health Perspect.*, **2004**, *112*, 524 – 531
- [56] D. Kröger, F. Hucho, H. Vogel: Ligand binding to nicotinic acetylcholine receptor investigated by surface plasmon resonance, *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 3157 – 3165
- [57] K.M. Shaffer, H.J. Lin, D. Maric, J.J. Pancrazio, D.A. Stenger, J.L. Barker, W. Ma: The use of GABA_A receptors expressed in neural precursor cells for cell-based assays, *Biosens. Bioelectron.*, **2001**, *16*, 481 - 489