

A. ostenfeldii und Salinität: Untersuchung von Toxinprofilen zur Bewertung der Hypothese der Salinitätsabhängigkeit von Toxinprofilen

Bachelor-Abschlussarbeit

Durchgeführt beim
Alfred-Wegener-Institut für
Polar- und Meeresforschung
2016

Verfasser: Torben Krohn
Betreuerin: Frau Prof. Dr. Hellwig
Zweitbetreuer: Dr. Krock (AWI)
Datum der Abgabe:

Inhaltsverzeichnis:

Tabellenverzeichnis:	2
Abbildungsverzeichnis:	2
Erklärung zur Bachelor-Abschlussarbeit	5
Danksagung:	6
1. Kurzdarstellung:	7
2. Abkürzungsverzeichnis:	8
3. Einleitung:	9
3.1 Toxische Algenarten:	9
3.2 Die Gattung Alexandrium:	9
3.3 Alexandrium ostenfeldii:	10
4. Ziel der Arbeit:	11
5. Theoretischer Teil:	13
5.1 Salinitätsskala:	13
5.2 Paralytic Shellfish Toxins (PST):	13
5.3 Cycloimin-Toxine:	15
5.3.1 Spirolide:	15
5.3.2 Gymnodimine:	17
5.4 Verwendete Geräte:	18
5.4.1 High Performance Liquid Chromatographie (HPLC):	18
5.4.2 Massenspektrometrie:	20
5.4.3 Elektrospray Ionisierung mit Triple Quadrupol Massenspektrometer:	22
6. Vorgehensweise:	26
7. Material und Methoden:	27
7.1 Probennahmeorte:	27
7.2 Bestimmung der Toxine:	29
7.2.1 Probennahme der Uthörnausfahrt:	29
7.2.2 Extraktion der PSP-Toxine:	29
7.2.3 Analyse der PSP-Toxine:	30
7.2.4 Extraktion der Cycloimin-Toxine:	31
7.2.5 Analyse der Cycloimin-Toxine:	32
8. Ergebnis und Diskussion:	33
8.1 Strukturelle Charakterisierung der bisher unbekanntenen Toxine:	33
8.1.1 Gymnodimine:	33
8.1.2 Spirolide:	36
8.2 Qualitative Darstellung der Toxinprofile:	54
8.3 Ergebnis der PSP-Toxin Analyse:	56
8.4 Ergebnis der Uthörn Expedition:	58
8.5 Ergebnis der Cycloimin-Toxin Analyse, der kultivierten Stämme:	61
9. Fazit:	71

10. Ausblick:	71
11. Quellen:	73
12. Anhang:	76

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Darstellung des Gradienten der PSP-Methode	30
Tabelle 2: Darstellung des Gradienten der Cycloimin-Multimethode	32
Tabelle 3: Vergleichende qualitative Darstellung der detektierten Toxine, ND = nicht detektiert	55
Tabelle 4: Vergleichende Darstellung der detektierten PSP-Toxine	57
Tabelle 5: Vergleichende, quantitative Darstellung der detektierten Gymnodiminen	62
Tabelle 6: Darstellung des Spirolid-Toxinprofils der <i>A. ostenfeldii</i> Kulturen aus Chile	65
Tabelle 7: Darstellung des Spirolid-Toxinprofils der <i>A. ostenfeldii</i> Kulturen aus Argentinien	66
Tabelle 8: Darstellung des Spirolid-Toxinprofils der <i>A. ostenfeldii</i> Kulturen aus den Niederlanden	68
Tabelle 9: Darstellung des Spirolid-Toxinprofils der <i>A. ostenfeldii</i> Kulturen aus Norwegen	69
Tabelle 10: Stationsprotokoll Uthörn-Expedition 2016	76
Tabelle 11: Darstellung des in der Cycloiminmultimethode verwendeten Massenübergänge	78
Tabelle 12: MS-Parameter der Cycloiminmultimethode (Turbo Spray)	79
Tabelle 13: Darstellung der Toxindaten aller Stationen der Uthörn-Expedition	79

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Darstellung der Strukturen bekannter PST, Abbildung analog erstellt zu (Wang, 2008, Abbildung 2).....	14
Abbildung 2: Darstellung der Struktur bisher in der Literatur beschriebener Spirolide. Strukturen von Spirolid A-G sowie die Derivate 13-desMe-C, 13, 19-didesMe-C und 20-Me-G wurden analog zu (Christian et al., 2008 Abbildung 1.) erstellt. Die Informationen für die Struktur von 27-hydroxy-13-desMe-C, 27-hydroxy-13, 19-didesMe-C & 27-oxo-13, 19-didesMe-C stammen von (Ciminello et al., 2010). Die Struktur von Spirolid H & I wurden analog erstellt zu (Roach et al., 2009, Abbildung 1.) ...	16
Abbildung 3: Darstellung der Struktur in der Literatur beschriebener Gymnodimine, Strukturen wurden analog der Darstellung in (Miles et al., 2003, Abbildung 1) erstellt. Die Modifizierung für die Darstellung von 20-Me-A wurde analog der in (Molgó et al., 2014, Abbildung 33.1) durchgeführt. Die Struktur von Gymnodimin D wurde entsprechend (Harju et al., 2016, Abbildung 1 (1)) erstellt.	17
Abbildung 4: Fotografie eines ausgebauten Quadrupols, Jörg Hildebrandt, AB SCIEX.....	23
Abbildung 5: Fotografie eines ausgebauten Triple-Quadrupols, Jörg Hildebrandt, AB SCIEX	23
Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Full Scan Messung.....	24
Abbildung 7: Schematische Darstellung einer SRM-Methode	24
Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Precursor Scans	25
Abbildung 9: Schematische Darstellung einer CID-Methode	25
Abbildung 10: Darstellung der Probennahmeorte: a) Weltkarte mit Markierungen der Probennahmeorte; b) Herkunft der Probe aus Kanada; c) Herkunft der Proben aus Südamerika; d) Herkunft der Proben aus Nordeuropa	27
Abbildung 11: Darstellung der Probennahmeorte der Uthörnexpedition 2016, ein genaues Stationsprotokoll ist im Anhang Nr. 1 zu entnehmen	27
Abbildung 12: Schematische Darstellung einer Retro-Diels-Alder-Reaktion	33
Abbildung 13: links: Fragmentierungsschema für Gymnodimin A nach Retro-Diels-Alder-Reaktion, analog dargestellt zu Van Wagoner et al., (2011), Abbildung 4; rechts: CID-Spektrum von Gymnodimin A aus Stamm NX 56-07, Norwegen, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS	34
Abbildung 14: CID-Spektrum m/z 494 in Stamm NX 56-07, Norwegen, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS	34
Abbildung 15: Strukturvorschlag für m/z 494 in Stamm NX 56-07, Norwegen, 15-desmethyl Gymnodimin A	35
Abbildung 16: CID-Spektrum m/z 510 in Stamm NX 56-10, Norwegen, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS	35

Abbildung 17: Strukturvorschlag für m/z 510 in Stamm NX 56-10, Norwegen, Gymnodimin E	36
Abbildung 18: a) Spektrum von SPX1, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS, b) Struktur von SPX 1, 13-desmethyl Spirolid C [erstellt mit ChemDraw Pro 7.0].....	37
Abbildung 19: Schematische Darstellung des Fragmentierungsschema von Spiroliden anhand von SPX 1, gemäß (Sleno et al., 2004, Abbildung 4B)	37
Abbildung 20: Darstellung bekannter Vorläufermassen für Spirolide, a) m/z 164, b) m/z 150, c) m/z 180	38
Abbildung 21: Spektrum von 20-methyl Spirolid G, detektiert in AOSH 2, Kanada, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS.....	38
Abbildung 22: Fragmentierungsschema für die mittleren Fragmente von Spirolid G, analog zu Aasen et al., 2005, Abbildung 5.....	39
Abbildung 23: CID-Spektrum von Spirolid H, detektiert in AOSH 2, Kanada, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS	39
Abbildung 24: Struktur von Spirolid H	40
Abbildung 25: links: CID-Spektrum von m/z 722 in AOSH 2; Kanada, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS rechts: Vergleichsspektrum von Spirolid C in AOSH 2, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS	40
Abbildung 26: Strukturvorschlag für m/z 722 in Stamm AOSH 2, Kanada, 27-hydroxy Spirolid C.....	41
Abbildung 27: CID-Spektrum von m/z 696 in Stamm NX 56-07, Norwegen, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS	41
Abbildung 28: Strukturvorschlag für m/z 696 in Stamm NX 56-07, Norwegen, Spirolid K.....	42
Abbildung 29: links: CID-Spektrum von m/z 678 in H2-A4, Argentinien, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS; rechts: CID-Spektrum von 13,19-didesmethyl-Spirolid C in NX 56-07, Norwegen, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS.....	43
Abbildung 30: Strukturvorschlag für m/z 678 in Stamm H2-A4, Argentinien, Für R1 und R2 gilt hier jeweils H oder CH ₃	43
Abbildung 31: CID-Spektrum von m/z 666 in Stamm NX 56-10, Norwegen, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS	44
Abbildung 32: Strukturvorschlag für m/z 666 in Stamm NX 56-10, Norwegen, Spirolid L	45
Abbildung 33: links: CID-Spektrum von 666 in Stamm AOSH 2, Kanada, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS; rechts: CID-Spektrum Spirolid H detektiert in AOSH 2, Kanada, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS	45
Abbildung 34: Strukturvorschlag für m/z 666 in Stamm AOSH 2, Kanada, 27-hydroxy Spirolid H.....	46
Abbildung 35: CID-Spektrum von m/z 592 in Stamm H1-G8, Argentinien, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS	46
Abbildung 36: Strukturvorschlag für m/z 592 in Stamm H1-G8, Argentinien, Spirolid M.....	47
Abbildung 37: CID-Spektrum von m/z 720 in Stamm AOSH 2, Kanada, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS	48
Abbildung 38: CID-Spektrum m/z 720 in Stamm AOICW, Chile, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS	48
Abbildung 39: CID-Spektrum von m/z 718 in H1-G8, Argentinien, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS	49
Abbildung 40: CID-Spektrum von m/z 718 in Stamm AOICW, Chile, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS	50
Abbildung 41: CID-Spektrum m/z 710 in Stamm H3_D4, Argentinien, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS	50
Abbildung 42: CID-Spektrum von m/z 692 in Stamm AOSH2, Kanada, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS	51
Abbildung 43: CID-Spektrum m/z 618 in Stamm H1_G8, Argentinien, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS	52
Abbildung 44: CID-Spektrum m/z 658 in Stamm AOSH 2, Kanada, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS	52
Abbildung 45: Abbildung 46: CID-Spektrum m/z 658 in Stamm AOSH 2, Kanada, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS.....	53
Abbildung 47: Darstellung des Chromatogramms des chilenischen A. ostensfeldii Stamms AOICW oben und unten das Chromatogramm des PSP-Mischstandards, aufgenommen mittels HPLC-FLD, Ionenpaarchromatographie	56

Abbildung 48: Darstellung des Cycloiminprofils in der Nordsee	58
Abbildung 49: Darstellung des Cycloiminprofils im Limfjord, Dänemark.....	59
Abbildung 50: Darstellung des Cycloiminprofils im Kattegat.....	60
Abbildung 51: Vergleichende, prozentuale Darstellung der Gymnodiminprofile der <i>A. ostentfeldii</i> Stämme aus Norwegen und den Niederlanden, 100 % entsprechen der Summe aller in dem jeweiligen Stamm detektierten Cycloimine.....	63
Abbildung 52: Graphische, prozentuale Darstellung des Toxinprofils von AOSH 2, Kanada, 100 % entsprechen der Summe aller in dem jeweiligen Stamm detektierten Cycloimine	64
Abbildung 53: Graphische Darstellung des Spirolidtoxinprofils der chilenischen Proben, 100 % entsprechen der Summe aller in dem jeweiligen Stamm detektierten Cycloimine	65
Abbildung 54: Graphische, prozentuale Darstellung des Spirolidtoxinprofils der argentinischen Proben, 100 % entsprechen der Summe aller in dem jeweiligen Stamm detektierten Cycloimine	67
Abbildung 55: Graphische, prozentuale Darstellung des Spirolidtoxinprofils von OKNL 42, Niederlande, 100 % entsprechen der Summe aller in dem jeweiligen Stamm detektierten Cycloimine.....	68
Abbildung 56: Graphische, prozentuale Darstellung des Spirolidtoxinprofils der norwegischen Isolate, 100 % entsprechen der Summe aller in dem jeweiligen Stamm detektierten Cycloimine	70

Erklärung zur Bachelor-Abschlussarbeit

Ich versichere, dass ich die Arbeit selbstständig, ohne fremde Hilfe verfasst habe.

Bei der Abfassung der Arbeit sind nur die angegebenen Quellen benutzt worden. Wörtlich oder dem Sinne nach entnommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Lübeck, den

Unterschrift

Ich bin damit einverstanden, dass meine Arbeit veröffentlicht wird insbesondere, dass die Arbeit Dritten zur Einsichtnahme vorgelegt wird oder Kopien der Arbeit zur Weitergabe an Dritte angefertigt werden.

Lübeck, den

Unterschrift

Danksagung:

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich im Rahmen meiner Bachelorarbeit begleitet haben.

Ganz besonders möchte ich Herrn Dr. Bernd Krock danken, der mir bei meiner Arbeit jederzeit durch seine fachliche und persönliche Unterstützung zur Seite stand.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Dr. Urban Tillmann für die Bereitstellung von umfangreicher Literatur sowie eine Vielzahl von Anregungen, durch die meine Arbeit verbessert wurde, bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Veronika Hellwig für die umfangreiche Betreuung meiner Arbeit.

1. Kurzdarstellung:

Alexandrium ostenfeldii ist ein wichtiger Vertreter mariner planktischer Dinoflagellaten. Von dieser Art ist bekannt, dass sie in der Lage ist, drei verschiedene Arten von Algentoxinen zu produzieren. Dabei handelt es sich um Paralytic Shellfish Toxins (PST) (vgl. Kapitel 5.2), Spirolide (vgl. Kapitel 5.3.1) und die strukturell verwandten Gymnodimine (vgl. Kapitel 5.3.2). Die Toxinprofile unterschiedlicher Populationen unterscheiden sich je nach geographischer Region in Zusammensetzung und produzierter Menge der Toxine. PST sind sehr gut untersucht, da sie potente Neurotoxine sind und mehrfach Vergiftungen beim Menschen verursacht haben, von denen einige zu Todesfällen geführt haben. Diese Dinoflagellaten treten normalerweise in geringen Konzentrationen zusammen mit anderen dominanten Spezies auf und haben deswegen bisher eine geringe Bedrohung für Aquakulturen oder Ähnliches dargestellt. In den letzten Jahren wurden vermehrt dichte monospezifische Blüten von *A. ostenfeldii* beobachtet. Diese treten hauptsächlich in Brackwassersystemen mit geringeren Salinitäten als im offenen Ozean auf. Dies ist ein Grund, warum bisher relativ wenig über die von *A. ostenfeldii* produzierten Toxine und deren Zusammenhänge untereinander bekannt ist und in den letzten Jahren vermehrt Forschungsinteresse aufgekommen ist. Dabei gibt es erste Hinweise, dass die Toxinvariabilität weit größer ist als bisher bekannt. Die Ursache für das Vorkommen variabler Toxinprofile und ob eine Korrelation zwischen den drei Toxingruppen besteht, ist unklar. Es gibt Stämme, die lediglich eine Toxinart produzieren und wiederum Stämme welche alle drei Arten produzieren. Die dieser Arbeit zugrunde liegende Hypothese besagt, dass *A. ostenfeldii* Kulturen in Brackwassersystemen mit geringeren Salinitäten als im offenen Ozean ein komplexeres Toxinprofil mit Toxinen aller drei Toxingruppen ausbilden. Kulturen aus marinen Bedingungen produzieren im Vergleich dazu nur Toxine einer Gruppe, der Spirolide. Zusätzlich soll eine weitere Hypothese überprüft werden, wonach ein Zusammenhang zwischen der Produktion von Gymnodiminen und PST besteht.

In dieser Arbeit werden dazu die Toxinprofile verschiedener bisher nicht untersuchter Stämme aus Chile, Argentinien, Kanada, dem Limfjord (Dänemark), der Nordsee, dem Kattgat, Norwegen und den Niederlanden mittels Tandem-Massenspektrometrie und HPLC-FLD analysiert. Um weitere Informationen über das Toxinprofil zu erhalten, werden diese Stämme neben den bekannten Toxinen auf bisher unbekannte Toxine untersucht. Darüber hinaus sollen weitere Informationen über den Zusammenhang der unterschiedlichen Toxingruppen gewonnen werden und durch den Vergleich der Ergebnisse eventuelle Zusammenhänge in den Toxinprofilen aufgeklärt werden.

Die durchgeführte Analyse ergab zwei bisher unbekannte Gymnodimine, sechs zusätzliche Spirolide sowie zehn weitere Verbindungen, bei denen es sich ebenfalls um Spirolide handelt, für die jedoch keine Struktur mit ausreichender Sicherheit erklärt werden konnte (vgl. Kapitel 8.1).

2. Abkürzungsverzeichnis:

ACN = Acetonitril
ASP = Amnestic Shellfish Poisoning
AZP = Azaspirazide
CFP = Ciguatera Shellfish Poisoning
CI = Chemische Ionisierung
CID = Collision Induced Dissociation
DSP = Diarrhetic Shellfish Poisoning
CTD = Conductivity, Temperature, Depth
ESI = Elektrospray Ionisierung
FAB = Fast Atom Bombardement
FLD = Fluoreszenz Detektor
GC = Gaschromatographie
GTX = Gonyautoxine
GYM = Gymnodimine
HAB = Harmful Algal Blooms
HPLC = High Performance Liquid Chromatographie
LC = Liquidchromatographie
MALDI = Matrix Assited Laser Desorption Ionisation
MS = Massenspektroskopie
m/z = Masse- zu Ladungsverhältnis
NEO = *neo*-Saxitoxin
NP = Normal Phase
NSP = Neurotoxic Shellfish Poisoning
PFA = Paraformaldehyd
PSP = Paralytic Shellfish Poisoning
PST = Paralytic Shellfish Toxins
PSU = Practical Salinity Unit
Prec = Precursor Scan
RP = Reversed Phase
Rt = Retentionszeit
STX = Saxitoxin
SPX 1 = 13-desmethyl Spirolid C
SPX = Spirolide
SRM = Selected Reaction Monitoring
THF = Tetrahydrofuran
TOF = Time Of Flight
UV/VIS = Ultraviolett/Visible

3. Einleitung:

3.1 Toxische Algenarten:

Bei den Produzenten mariner Phycotoxine handelt es sich meistens um Dinoflagellaten oder Cyanobakterien. Dinoflagellaten gehören zu einer vielfältigen Gruppe von eukaryotischen, einzelligen Mikroalgen. Sie bilden eine erdgeschichtlich alte Abteilung, welche bereits im Mesozoikum aufgetreten ist. Als Primärproduzenten und als einzellige Räuber haben sie eine wichtige Rolle im marinen Ökosystem.

Viele der Dinoflagellatenarten sind Verursacher von Harmful Algal Blooms (HAB). (Holmes et al., 2014) Die produzierten Toxine werden in Gruppen, nach den Symptomen welche sie verursachen, unterteilt: Paralytic Shellfish Poisoning (PSP), Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP), Amnestic Shellfish Poisoning (ASP), Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) und Ciguatera Fish Poisoning (CFP). Des Weiteren gibt es Vergiftungen verursacht von Azaspiraziden (AZP). Bei den Toxinen handelt es sich mit Ausnahme von PSP- und ASP-Toxinen um fettlösliche Polyether. Die jeweiligen Vergiftungen werden in der Regel durch den Verzehr von kontaminierten Fischen oder Meeresfrüchten verursacht. Die Toxine sind für eine Reihe von Fischen und Schalentieren wenig oder nicht toxisch und können so durch die marine Nahrungskette in den Tieren akkumulieren.

Bei PSP-Toxinen handelt es sich um Saxitoxin und seine Derivate (vgl. Abb. 1). Diese Toxine sind wasserlöslich und hitzestabil. Die Symptome bei einer leichten Vergiftung sind Magen-Darm Probleme, allerdings können bei schweren Vergiftungen Paralyse und Tod die Folge sein.

Unter NSP-Toxinen werden Brevetoxine zusammengefasst. Die Vergiftungen sind in der Regel nicht tödlich und die Symptome sind: Übelkeit, Bauchschmerzen und Kribbeln der Extremitäten.

Bei ASP-Toxinen handelt es sich um Domoinsäure. Die Symptome sind ebenfalls Magen-Darm Probleme, allerdings können diese Toxine zusätzlich Amnesie verursachen.

Unter DSP-Toxine werden Okadasäure und Strukturanaloga, welche auch als Dinophysistoxine bezeichnet werden zusammengefasst. Symptome sind Magen-Darm Probleme. (Molgó et al., 2014)

CFP-Toxine, hierbei handelt es sich um eine in den Tropen weitverbreitete Vergiftungserscheinung, verursacht durch den Verzehr von karnivoren Fischen (Holmes et al., 2014), die ebenfalls in Deutschland durch importierten Fisch aufgetreten ist. (Mattei et al., 2014)

AZP-Toxine, Azaspirazid-Vergiftungen zeigen ähnliche Symptome wie bei einer Vergiftung mit DSP-Toxinen, hauptsächlich Magen-Darm Probleme. (Molgó et al., 2014)

3.2 Die Gattung *Alexandrium*:

Spezies der Dinoflagellaten-Gattung *Alexandrium*, zählen zu den Hauptverursachern von toxischen Algenblüten (HAB, Harmful Algal Blooms). Von *Alexandrium* verursachte Blüten treten global auf und sind besonders häufig. Dabei sind die Blüten häufig nicht monospezifisch, sondern treten in Kombination mit anderen Spezies auf. Die Dauer solcher Blüten kann Tage bis Wochen betragen. (Anderson et al., 2012)

Unter der Gattung *Alexandrium* werden ca. 30 Spezies zusammengefasst, von denen mindestens die Hälfte toxisch ist. Besonders untersucht wurden Saxitoxin und seine

Derivate, da sie für Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) verantwortlich sind und somit eine bekannte Vergiftungserscheinung darstellen. Die Toxine können sich in der marinen Nahrungskette akkumulieren, da sie für einige Tiere selbst nur gering toxisch sind und so zu Fischsterben oder Vergiftungen beim Menschen führen. Neben ökologischen Schäden können zusätzlich wirtschaftliche Schäden durch den Verlust von Aquakulturen oder Einschränkungen im Tourismus entstehen. (Anderson et al., 2012)

Der bis jetzt einzige bekannte Produzent von Spiroliden ist *Alexandrium ostenfeldii*. Diese direkte Zuordnung fand das erste Mal durch die Analyse von Planktonproben in Kanada statt. Bei dem damaligen Test der Proben im Maus-Bioassay (vgl. Kapitel 3.3), wurde eine schnelle Wirkung in Verbindung mit typischen Symptomen von Nervengiften beobachtet. Diese Vergiftungserscheinungen konnten Spiroliden zugeordnet werden (Cembella et al., 2000; 2001) Bisher sind noch keine Vergiftungen mit Spiroliden beim Menschen bekannt.

Das Toxinprofil, welches sich aus den drei Toxingruppen zusammensetzen kann, ist für die jeweiligen Stämme der einzelnen Spezies unterschiedlich und kann sich in Menge und Zusammensetzung der Toxine unterscheiden.

Das Auftreten der Spezies ist global und nicht auf bestimmte Lebensräume beschränkt. So tauchen sie beispielsweise in Südamerika, der Arktis, Europa, in der Ost- und Nordsee auf. Die größte Anzahl erscheint in Gebieten, in denen die Wassertemperatur zwischen 5 – 15 °C liegt.

3.3 *Alexandrium ostenfeldii*:

Bei *A. ostenfeldii* handelt es sich um eine mittelgroße Spezies, die Zellen weisen eine Größe zwischen 30-50 µm auf. Die Identifizierung der Spezies kann durch Vergleich der Größe, Form und Anordnung der unterschiedlichen Zellplatten und Zellbestandteile erfolgen. Ebenso kann die Bestimmung über genetische Marker erfolgen. (Tillmann et al., 2014) Neben *A. ostenfeldii* wurde *A. peruvianum* als eigene Art beschrieben, allerdings legen neue detaillierte Untersuchungen nahe, dass es sich um die gleiche Spezies handelt. (Kremp et al., 2014)

Allgemein gilt *A. ostenfeldii* als Spezies, welche eher in geringen Konzentrationen im Hintergrund zusammen mit anderen Spezies aufzufinden ist. Erst in den letzten Jahren sind vermehrt dichte und toxische Algenblüten dieser Art aufgetreten, besonders in Brackwassersystemen mit geringen Salinitäten im Spätsommer. In diesen Blüten sind sehr hohe Konzentrationen mit bis zu 3×10^6 Zellen/L aufgetreten. Es wurden Blüten in der Ostsee, einer Flussmündung in den Niederlanden, der Ostküste der USA und Italien beobachtet. (Kremp et al., 2009; Van de Waal et al., 2015)

Es können drei verschiedene Gruppen von Toxinen von *A. ostenfeldii* produziert werden, darunter Saxitoxin und seine Derivate (PSP-Toxine; vgl. Abb. 1), sowie zwei Arten von Cycloimin-Toxinen: Spirolide (vgl. Abb. 2) und Gymnodimine (vgl. Abb. 3). Diese Vielfalt ist ein Alleinstellungsmerkmal, da in der Regel nur eine Art von Toxinen von einer Spezies produziert wird. Durch die Biosynthese für drei verschiedene Toxingruppen muss ein deutlich größerer Aufwand beispielsweise durch die Bereitstellung der notwendigen Enzyme, von der Spezies aufgebracht werden. (Anderson et al., 2012)

Die *A. ostentfeldii* Isolate, welche aus den Blüten in den Niederlanden isoliert worden sind, sind in der Lage Toxine jeder der drei Gruppen zu produzieren. (Van de Waal et al., 2015) Ebenso produzieren die Isolate aus den USA (River Estuary, North Carolina) Toxine aller drei Gruppen. (Tomas et al., 2012) Die Isolate, die in Finnland gewonnen werden konnten, produzieren PSP-Toxine und Gymnodimine. (Kremp et al., 2009) Für Isolate, aus dem Limfjord in Dänemark ist bekannt, dass sie PSP-Toxine und Spirolide produzieren können. (Hansen et al., 1992; MacKinnon et al., 2006) Das PSP-Toxinprofil setzte sich aus B2, C1/2 und Spuren von GTX 2/3 zusammen. B2 ist das dominanteste Toxin. (Hansen et al., 1992) Eine Analyse eines Stamms aus einem chilenischen Fjordsystem hat ergeben, dass dieser lediglich in der Lage ist, PSP-Toxine zu produzieren. Dies ist der bisher einzige Befund eines Stammes mit einem solchen Toxinprofil. Des Weiteren wurde eine Population von der südlichen Spitze Südamerikas (Beagle Kanal, Argentinien) untersucht, diese zeigt, dass *A. ostentfeldii* aus dem Beagle Kanal keine PSP-Toxine, sondern lediglich Spirolide produziert. (Almandoz et al., 2014)

An den vorhandenen Daten ist zu erkennen, dass *A. ostentfeldii* ein sehr variantenreiches Toxinprofil ausbilden kann und es bisher nicht bekannt ist worin die Gründe dafür liegen.

Bis dato ist wenig über die Produktion der Cycloimine bekannt, da *A. ostentfeldii*, bisher aufgrund der eher geringen Abundanz und der Tatsache, dass bisher keine Vergiftungen von Menschen auf diese Substanzklasse zurückgeführt werden konnten, von untergeordnetem Interesse war. Durch die auftretenden Blüten besteht nun Forschungsinteresse. Dies liegt in erster Linie daran, dass die Analyse erst seit einigen Jahren mittels Tandemmassenspektrometrie und Flüssigkeitschromatographie durchgeführt wird. Davor erfolgte die Analyse über den Maus-Bioassay, bei dem Rohextrakte in Mäuse injiziert wurden und über die Lebensdauer der Mäuse und die auftretenden Symptome Rückschlüsse auf die vorhandenen Toxine gezogen wurden. Die neuen Analysenmethoden sind deutlich empfindlicher und ermöglichen eine genaue Aussage, um welche Toxine es sich in der Probe handelt. Der Maus-Bioassay wird auch aus ethischen Gründen in den letzten Jahren immer weniger eingesetzt, in einigen Regionen wie beispielsweise Europa ist er verboten, und durch hochempfindliche massenspektroskopische Methoden ersetzt. (Gerssen et al., 2009)

4. Ziel der Arbeit:

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Hypothese besagt, dass *A. ostentfeldii* in Brackwassersystemen mit geringeren Salinitäten im Vergleich zu marinen Populationen ein komplexeres Toxinprofil mit PSP-Toxinen, Gymnodiminen und Spiroliden aufweist. (unveröffentlichte Daten, AWI) Diese Hypothese basiert auf neuen Befunden aus der Oosterschelde in den Niederlanden (Van Wagoner et al., 2011) und Befunden aus einem Küstengebiet in North Carolina in den USA. (Tomas et al., 2012) Im Vergleich dazu produzieren Populationen aus marinen Systemen mit gleichbleibend hohem Salzgehalt nur Toxine einer dieser Gruppen, der Spirolide. (Cembella et al., 2000; 2001) Ein direkter Zusammenhang zwischen aktuellem Salzgehalt und Toxinprofil konnte allerdings durch Experimente, in denen marine *A. ostentfeldii* Stämme unter niedrig salinen Bedingungen und Stämme aus niedrig salinen

Bedingungen unter hohen salinen Bedingungen kultiviert wurden, ausgeschlossen werden. In den Versuchen war lediglich das Wachstum direkt vom Salzgehalt abhängig, aber es waren keine qualitativen Veränderungen im Toxinprofil festzustellen. (Suikkanen et al., 2013; Martens et al., 2016)

Des Weiteren lassen Forschungen der letzten Jahre am Alfred-Wegner-Institut (AWI) vermuten, dass eine Relation der Produktion von Gymnodiminen mit der von PSP-Toxinen besteht, da in einigen untersuchten Proben Gymnodimine als auch PSP-Toxine zusammen detektiert worden sind (unveröffentlichte Daten AWI). Diese beiden Hypothesen gilt es an Hand der unterschiedlichen *A. ostentfeldii* Stämme zu überprüfen.

Zur Untersuchung dieser Hypothesen erfolgt die erneute Analyse eines Stamms aus Chile AOA32-2, welcher bereits von Salgado im Jahr 2015 analysiert wurde. Hierbei handelt es sich um einen Stamm aus den chilenischen Fjorden, welcher geringeren Salinitäten als im offenen Ozean unterliegt. Die Besonderheit der vorhergehenden Analysenergebnisse ist, dass dieser Stamm nur PSP-Toxine produziert und keine Cycloimine. (Salgado et al., 2015) Dieses Ergebnis ist sehr unerwartet, da es der erste Befund eines Stammes ist, welcher lediglich PSP-Toxine und keine Cycloimine produziert. Nach der zugrundeliegenden Hypothese wäre zu erwarten, dass sich das Toxinprofil dieses Stammes aus Toxinen aller drei Gruppen zusammensetzt. Da die Analyse im Wesentlichen auf bereits in der Literatur veröffentlichte Spirolide ausgerichtet war, wird in dieser Arbeit zusätzlich nach bisher unbekanntem Toxinen gesucht. Die Charakterisierung weiterer bisher unbekannter Toxine ist ein zusätzlicher Schwerpunkt dieser Arbeit.

Des Weiteren erfolgt die Analyse eines weiteren, bisher nicht untersuchten Stamms aus Chile, welcher dichter zum Pazifik gewonnen werden konnte und somit höheren Salinitäten unterlag als der andere Stamm aus Chile. Um eine bessere Aussage über die Gültigkeit der Hypothese treffen zu können werden zudem bisher nicht untersuchte Stämme, aus Argentinien, Norwegen und Kanada analysiert. Zusätzlich erfolgt der Vergleich mit einem Stamm aus den Niederlanden, welcher bereits am AWI analysiert wurde. (Manuskript in Arbeit, Helge Martens, AWI) Dabei soll ein möglichst großer geographischer Rahmen untersucht werden und zudem der Vergleich durch Stämmen aus marinen und niedersalinen Bedingungen durchgeführt werden. Bei den Stämmen aus Argentinien und Kanada handelt es sich um Stämme aus marinen Systemen und bei den Stämmen aus Norwegen und den Niederlanden um Stämme, welche an ihrem Herkunftsort niedrigeren Salinitäten unterlagen.

Ein weiterer Teil ist die Analyse von Feldproben aus Nordsee, dem Kattegat sowie dem Limfjord in Dänemark. Für die Populationen aus dem Limfjord ist bekannt, dass sie in der Lage sind PSP-Toxine und Spirolide zu produzieren. (Hansen et al., 1992; MacKinnon et al., 2006) Durch die Analyse kann die eventuell vorhandene Relation von Gymnodiminen mit PSP-Toxinen überprüft werden. Des Weiteren wäre nach der zu Grunde liegenden Hypothese zu erwarten, dass sich die detektierten Toxinprofile in den drei Regionen, durch die dort vorliegenden unterschiedlichen Salinitäten, unterscheiden.

5. Theoretischer Teil:

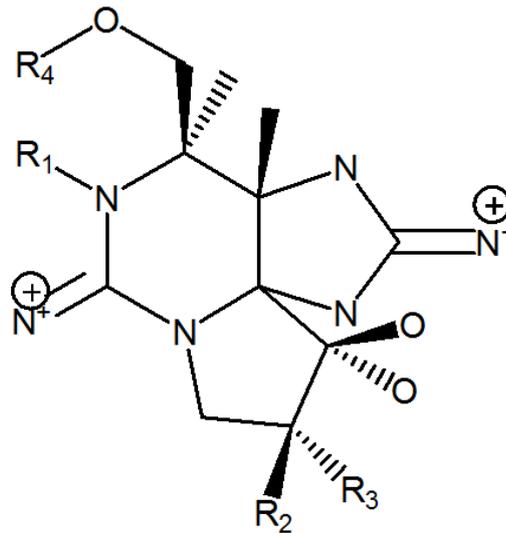
5.1 Salinitätsskala:

In dieser Arbeit wird die Practical Salinity Scale (PSS-78) von 1978 verwendet. Sie beruht auf der Proportionalität der elektrischen Leitfähigkeit des Wassers mit dem Salzgehalt. Die Angabe der Salinität erfolgt als PSU (Practical Salinity Units), die Salinität ist dimensionslos.

5.2 Paralytic Shellfish Toxins (PST):

Paralytic Shellfish Toxins werden von verschiedenen Dinoflagellatgattungen produziert *Pyrodinium*, *Gymnodinium* und *Alexandrium* spp., darunter *A. ostenfeldii*. (Vale, 2014) Die Aufnahme der Toxine durch den Menschen erfolgt beim Verzehr kontaminierter Schalentiere wie z.B. Muscheln. Diese ernähren sich unter anderem von den Dinoflagellaten und können so die Toxine in ihnen akkumulieren. Deswegen werden marine Algentoxine auch als Shellfish Poisoning Toxine bezeichnet.

Die Grundstruktur der PST ist ein 3,4-propinoperhydro purin trizyklisches System (vgl. Abb. 1). Die Toxine können in vier Gruppen unterteilt werden, welche sich durch ihre Seitenketten unterscheiden: (1) Carbamoyl-Toxine (Saxitoxin (STX), *neo*-Saxitoxin (NEO) und Gonyautoxine (1-4)), (2) die *N*-sulfocarbamoyl-Toxine (B und C Toxine), (3) die Decarbamoyl-Toxine und (4) die Deoxydecarbamoyl-Toxine. Insgesamt wurden 21 verschiedene PSP-Toxine, welche von *Alexandrium* Spezies produziert werden, identifiziert. (Wang, 2008) Zusätzlich gibt es noch weitere Varianten, wie die Benzoyl-Varianten, welche allerdings bisher nicht in der Gattung *Alexandrium* gefunden wurden und daher in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt werden.



Spirolid	Toxin	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Carbamate	STX	H	H	H	OCONH ₂
	Neo STX	OH	H	H	OCONH ₂
	GTX1	OH	OSO ₃ ⁻	H	OCONH ₂
	GTX2	H	OSO ₃ ⁻	H	OCONH ₂
	GTX3	H	H	OSO ₃ ⁻	OCONH ₂
	GTX4	OH	H	OSO ₃ ⁻	OCONH ₂
N-sulfocarbamoyl	GTX5 (B1)	H	H	H	OCONHSO ₃ ⁻
	GTX6 (B2)	OH	H	H	OCONHSO ₃ ⁻
	C1	H	OSO ₃ ⁻	H	OCONHSO ₃ ⁻
	C2	H	H	OSO ₃ ⁻	OCONHSO ₃ ⁻
	C3	OH	OSO ₃ ⁻	H	OCONHSO ₃ ⁻
	C4	OH	H	OSO ₃ ⁻	OCONHSO ₃ ⁻
Decarbamoyl	dcSTX	H	H	H	OH
	dcNeoSTX	OH	H	H	OH
	dcGTX1	OH	OSO ₃ ⁻	H	OH
	dcGTX2	H	OSO ₃ ⁻	H	OH
	dcGTX3	H	H	OSO ₃ ⁻	OH
Deoxydecarbamoyl	doSTX	H	H	H	H
	doGTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	H
	doGTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	H

Abbildung 1: Darstellung der Strukturen bekannter PST, Abbildung analog erstellt zu (Wang, 2008, Abbildung 2)

Bei der Analyse dieser Toxine ist zu berücksichtigen, dass die jeweiligen Stereoisomere als Summe angegeben werden sollten, da sich diese mit der Zeit durch Keto-Enol Tautomerie in einander umwandeln, bis sich ein Gleichgewicht einstellt. Beispielsweise produzieren Dinoflagellaten wahrscheinlich nur GTX3. Dies wandelt sich mit der Zeit zu GTX2 um. Da nicht sichergestellt werden kann, dass das GTX2/3-Verhältnis sich während der Extraktion und Analyse nicht verändert, werden GTX2 und GTX3 als Summe angegeben. (Krock et al., 2007)

Bei Saxitoxin handelt es sich um das giftigste von allen bisher bekannten PST. Die Symptome bei einer Vergiftung sind bei geringer Dosis zum Beispiel ein Kribbeln in der Mundgegend und Taubheit der Extremitäten bis hin zu einer kompletten Lähmung bei schweren Vergiftungen. Die tödliche Dosis für STX beim Menschen liegt zwischen 1-4 mg je nach den körperlichen Begebenheiten des Menschen. (Wang, 2008) Es wurden bereits mehrfach Menschen beim Verzehr von kontaminierten Fischen oder Muscheln vergiftet. Um dies zu vermeiden, gibt es Monitoringprogramme, bei denen die Produkte, bevor sie in den Verkauf gelangen, analysiert werden. Dadurch kann die Gefahr einer Vergiftung minimiert werden. Ein erhöhtes Risiko besteht, wenn die Muscheln selbst gefangen werden und nicht getestet worden sind. (Vale, 2014)

5.3 Cycloimin-Toxine:

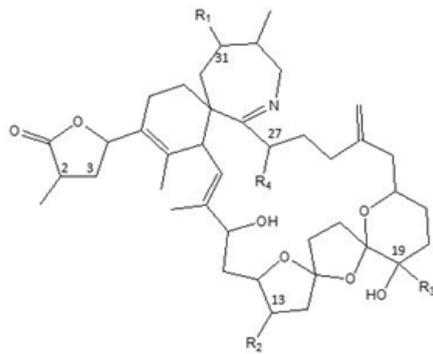
Zu dieser Gruppe gehören Spirolide, Gymnodimine, Pinnatoxine, Pteriatoxine und Prorocentrolide. Sie werden von Dinoflagellaten produziert. Die strukturelle Gemeinsamkeit liegt in den Etherringen und der Cycloimineinheit in den Makrozyklen (vgl. Abb. 2). Diese Strukturkomponente wird als verantwortlich für die Toxizität eingeschätzt. (Hu et al., 1996) Die jeweiligen Strukturen sind sehr variabel. (Molgó et al., 2014) Die größte Anzahl an Strukturvarianten weist die Gruppe der Spirolide auf.

5.3.1 Spirolide:

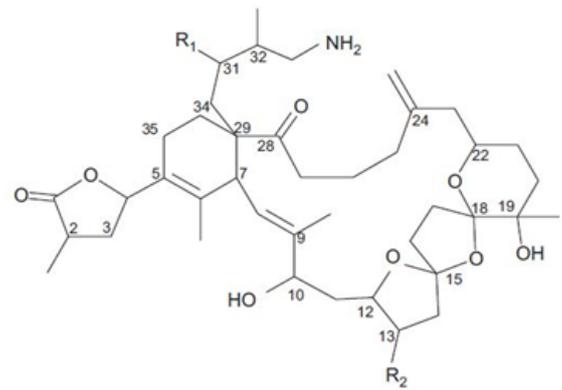
Spirolide sind makrozyklische Imine, welche als erstes in Schalentieren in Nova Scotia, Kanada detektiert worden sind. Die ersten vier gefundenen Spirolide waren Spirolid A-D. (Hu et al., 1995)

Bei Spiroliden handelt es sich um schnell wirkende Neurotoxine. Im Maus-Bioassay, bei dem die Extrakte Mäusen injiziert werden, um so die Wirkung der Toxine zu beurteilen, zeigen Spirolide eine schnelle tödliche Wirkung. (Cembella et al., 2000). Wie sich die Toxizität bei Menschen auswirkt, ist bis dato unaufgeklärt.

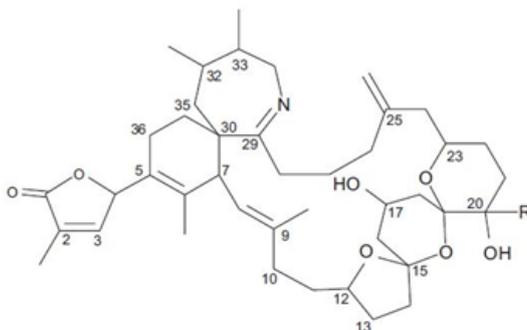
Als bisher einziger Produzent für Spirolide ist *A. ostenfeldii* identifiziert worden. Die Struktur der Spirolide ist sehr variantenreich und kann sich in unterschiedlichen Stämmen und geographischen Regionen unterscheiden. (Cembella et al., 2000) Derzeit sind 15 Spirolide in der Literatur beschrieben. (vgl. Abb. 2 und Literaturangaben)



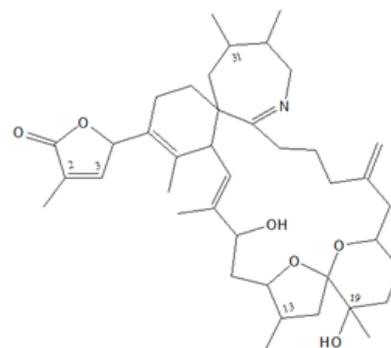
Spirolid	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Δ ^{2,3}	MW
A	H	CH ₂	CH ₂	H	+	691,5
B	H	CH ₂	CH ₂	H	-	693,5
C	CH ₂	CH ₂	CH ₂	H	+	705,5
D	CH ₂	CH ₂	CH ₂	H	-	707,5
13-desMe-C	CH ₂	CH ₂	CH ₂	H	+	691,5
13, 19-didesMe-C	CH ₂	H	H	H	+	677,5
27-hydroxy-13-desMe-C	CH ₂	H	CH ₂	OH	+	707,5
27-hydroxy-13, 19-didesMe-C	CH ₂	H	H	OH	+	693,5
27-oxo-13, 19-didesMe-C	CH ₂	H	H	=O	+	691,5



Spirolid	R ₁	R ₂	Δ ^{2,3}	MW
E	H	CH ₃	+	709,5
F	H	CH ₃	-	711,5



Spirolid	R	MW
G	H	691,5
20-Me-G	CH ₃	705,5



Spirolid	Δ ^{2,3}	MW
H	+	649,5
I	-	651,5

Abbildung 2: Darstellung der Struktur bisher in der Literatur beschriebener Spirolide. Strukturen von Spirolid A-G sowie die Derivate 13-desMe-C, 13, 19-didesMe-C und 20-Me-G wurden analog zu (Christian et al., 2008 Abbildung 1.) erstellt. Die Informationen für die Struktur von 27-hydroxy-13-desMe-C, 27-hydroxy-13, 19-didesMe-C & 27-oxo-13, 19-didesMe-C stammen von (Ciminello et al., 2010). Die Struktur von Spirolid H & I wurden analog erstellt zu (Roach et al., 2009, Abbildung 1.)

Bei 13-desmethyl Spirolid C (SPX 1) handelt es sich um das einzige Toxin, welches als analytischer Standard kommerziell verfügbar ist und somit zur quantitativen Analyse aller bisher bekannten Spirolide eingesetzt wird. Ihr Gehalt wird in SPX 1-Äquivalenten angegeben. Spirolide weisen nur geringe Unterschiede in ihrer Struktur auf und daraus resultierend, kann ein ähnlicher chemischer Responsefaktor angenommen werden.

Bei den Spiroliden E und F handelt es sich um Schalentiermetabolite, welche durch enzymatische Prozesse aus Spirolid A und B gebildet werden. Diese Metabolite weisen keine Toxizität auf. Die als maßgebend für die Toxizität vermutete Cycloimineinheit ist hydrolysiert, sie liegt als Ketoimineinheit vor. (Hu et al., 1996) Besonderheit bei Spirolid G ist, dass es anstelle des typischen 5:5:6 Ringsystems ein 5:6:6 Ringsystem enthält (vgl. Abb. 2).

Spirolid H und I weisen anstelle des trispiroketal Ringsystem ein dispiroketal Ringsystem 5:6 auf. Besonderheit ist zudem, dass sie keine Toxizität im Maus-Bioassay aufweisen, obwohl die Cycloimineinheit vorhanden ist. (Roach et al., 2009)

Daraus ist zu folgern, dass die Cycloimineinheit nicht die einzige Bedingung für Toxizität ist, dass Vorliegen eines trispiroketal Ringsystems scheint ebenfalls notwendig zu sein.

5.3.2 Gymnodimine:

Bei Gymnodiminen handelt es sich ebenfalls um schnell wirkende Nervengifte. Gymnodimin A wurde 1995 das erste Mal in neuseeländischen Austern entdeckt und wurde zunächst auf eine unbestimmte Art der Gattung *Gymnodinium* zurückgeführt. (Seki et al., 1995) Diese und weitere verwandte Arten wurden später der neu errichteten Gattung *Karenia* zugeordnet. (Daugbjerg et al., 2000) Zu der Gruppe der Gymnodimine gehören außerdem Gymnodimin B und C. Hierbei handelt es sich um an C(18) oxidierte Strukturanaloga, welche sich durch die sterische Orientierung der OH-Gruppe unterscheiden. Diese wurden das erste Mal in Extrakten aus *Karenia selliformis* detektiert. (Miles et al., 2003).

Ein weiteres Strukturanalogon, 12-methyl-Gymnodimin, konnte in *A. ostenfeldii* aus den USA detektiert werden. Das globale Auftreten von Gymnodiminen deutet darauf hin, dass mehr Dinoflagellatenarten als bisher bekannt, Gymnodimine produzieren und vermutlich deutlich mehr strukturelle Varianten auftreten als bisher bekannt. Bisher sind nur fünf Gymnodimine in der Literatur beschrieben.

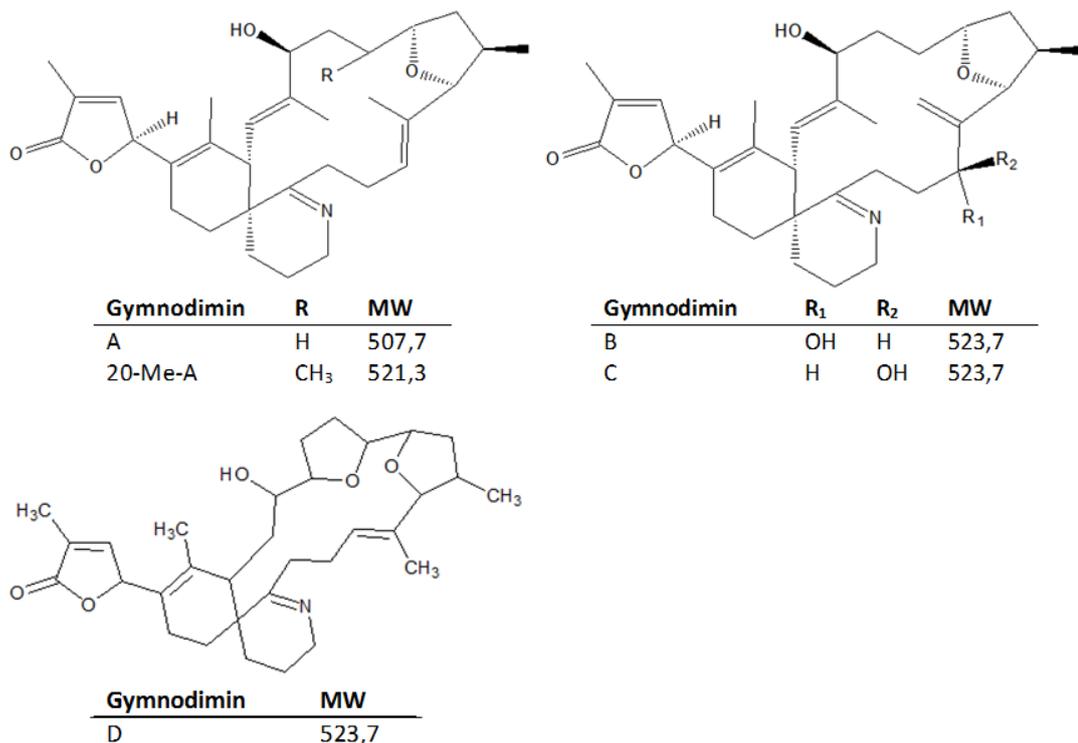


Abbildung 3: Darstellung der Struktur in der Literatur beschriebener Gymnodimine, Strukturen wurden analog der Darstellung in (Miles et al., 2003, Abbildung 1) erstellt. Die Modifizierung für die Darstellung von 20-Me-A wurde analog der in (Molgó et al., 2014, Abbildung 33.1) durchgeführt. Die Struktur von Gymnodimin D wurde entsprechend (Harju et al., 2016, Abbildung 1 (1)) erstellt.

Zur Identifizierung der dargestellten Toxine wurden folgende Geräte verwendet.

5.4 Verwendete Geräte:

5.4.1 High Performance Liquid Chromatographie (HPLC):

High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) ist ein in der chemischen Analytik häufig eingesetztes Analysengerät. Es ermöglicht eine genaue Quantifizierung von Verbindungen in flüssigen Messextrakten. Für die Messung wird die Probe in der mobilen Phase, einem Elutionsmittelfluss, aufgenommen und so über eine Chromatographiesäule (stationäre Phase) gebracht. Auf der Säule findet die Trennung der einzelnen Probenbestandteile statt. Die unterschiedlichen Substanzen zeigen verschiedene Wechselwirkungen (z.B. Adsorptionsvorgänge, Van-der-Waals Wechselwirkung) mit der Säule und werden so unterschiedlich schnell von der mobilen Phase eluiert. Die Zeit, die eine Substanz auf der Säule verbleibt bis sie zum Detektor gelangt, ist charakteristisch für diese Substanz und diese Retentionszeit kann zur Identifizierung der Substanz genutzt werden. Die Säule ist sehr dicht gepackt und verfügt über sehr kleine Porengrößen, um eine optimale Trennung zu ermöglichen. Je geringer die Porengrößen der Säule desto besser ist die Trennleistung. Die Porengröße liegt in der Regel zwischen 3 - 10 µm. Um dennoch eine angemessene Fließgeschwindigkeit zu erreichen, werden Drücke bis zu 400 bar verwendet. Die daraus resultierende Fließgeschwindigkeit liegt zwischen 0,1 - 10 ml/min. (Skoog & Leary, 1992) Dabei können je nach Substanzanforderung unterschiedliche Säulenmaterialien verwendet werden. Häufig werden modifizierte Silicagele oder Aluminiumoxid eingesetzt. Diese können chemisch modifiziert werden und so z.B. unpolare Säulen durch das Addieren von C18-Ketten dargestellt werden. (Naumer & Heller, 1986) Trennsäulen sind zwischen 3 - 7,5 cm lang und haben einen Innendurchmesser von 1 - 4,6 mm. So kann eine schnelle Trennung mit einem geringen Elutionsmittelverbrauch gewährleistet werden.

Die mobile Phase setzt sich aus zwei (oder mehr) verschiedenen Elutionsmitteln zusammen. Die Zusammensetzung kann konstant eingestellt werden (isokratische Elution) oder im Verlauf der Messung variieren (Gradientenelution). Die Eluenten unterscheiden sich in ihrer Polarität. Durch den Gradienten kann auf die unterschiedlichen Eigenschaften der Substanzen in der Probe reagiert werden. (Skoog & Leary, 1992)

Die meisten HPLC-Anlagen verfügen über einen Säulenofen, mit dem die Säule auf eine konstante Temperatur eingestellt werden kann und so konstante Bedingungen für die Chromatographie vorliegen. (Skoog & Leary, 1992)

Allgemein können zwei grundlegende Anwendungsarten der HPLC unterschieden werden. Die sogenannte Normalphasen-HPLC (NP-HPLC) und die Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC). Bei der RP-HPLC werden unpolare Säulenmaterialien verwendet, dies sind bspw. C18-Säulen. Die mobile Phase ist polar (Wasser, Acetonitril, Methanol). Bei der NP-HPLC ist das Säulenmaterial polar und die mobile Phase unpolar. So erfolgt zuerst die Elution der unpolarsten Komponente, bei der Umkehrphasen Chromatographie ist dies umgekehrt.

Umkehrphasen Chromatographie

Die Umkehrphasen Chromatographie wird für die Trennung von DSP und anderen lipophilen Toxinen verwendet. Für die Trennung von Spiroliden und Gymnodiminen wird als Säulenmaterial eine unpolare C18-Säule verwendet und als Laufmittel Wasser und Methanol, welche in einem Gradienten gefahren werden, bei dem die anteilige Menge an Methanol über die Zeit gesteigert wird. Die Cycloimintoxine weisen durch ihre cyclischen Ethergruppen und Hydroxylgruppen einen polareren Charakter als reine Kohlenwasserstoffe auf, sodass sie bei geringen Methanolanteilen im Laufmittel eluiert werden können. Die Wechselwirkung mit der Umkehrphase erfolgt mit den unpolaren Strukturkomponenten der Toxine (vgl. Abb. 2 & 3). Da die genauen Strukturen vieler Toxine unbekannt sind und außerdem Toxine mit gleicher Masse auftreten, ist es notwendig, die Toxine über CID-Messungen (vgl. Kapitel 5.4.2) zu identifizieren. Durch die Chromatographie ist es neben der Trennung der Toxine auch möglich, die Toxine von Matrixbestandteilen zu isolieren. (Skoog & Leary, 1992)

Ionenpaarchromatographie

Die mobile Phase besteht aus einer wässrigen Pufferlösung, welche ein organisches Laufmittel, wie beispielsweise Acetonitril oder Tetrahydrofuran sowie eine ionische Verbindung, z.B. Sulfonsäuren mit unterschiedlich langen Seitenketten, welche einen unpolaren Charakter aufweisen (Oktansulfonsäure oder Heptansulfonsäure) enthält, deren Gegenion die entgegengesetzte Ladung des Analyten besitzt. Das Gegenion bildet mit dem Analyten ein neutrales Ionenpaar, welches mit der Umkehrphase wechselwirkt (retardiert). (Skoog & Leary, 1992) Die PSP-Toxine weisen positive Ladungen durch ihre außenstehenden Imingruppen auf. Durch diese Ladung zeigen sie keine Wechselwirkung mit einer unpolaren stationären Phase. Die Ladung der PSP-Toxine kann durch die vorhandenen ionischen Verbindungen bei der Ionenpaarchromatographie neutralisiert werden. Saxitoxin weist vor der Bildung der Ionenpaare zwei positive Ladungen auf (vgl. Abb. 1). Die in der mobilen Phase enthaltenen Sulfonsäuren weisen eine negative Ladung auf, diese bilden durch die auftretenden Wechselwirkungen Ionenpaare. Mit den unpolaren Seitenketten der Sulfonsäuren findet eine Wechselwirkung mit der unpolaren Säule (z.B. C18-Säule) statt. Je nach Anzahl der vorhanden positiven Ladungen im Molekül weisen die Toxine eine unterschiedliche Anzahl zusätzlicher unpolarer Seitenketten durch die Bildung der Ionenpaare auf, welche im Wesentlichen mit der unpolaren stationären Phase wechselwirken. Beispielsweise eluiert Saxitoxin als Letztes von der Säule, da es mit zwei Alkylsulfonsäuren Ionenpaare bildet. GTX 3 hat zusätzlich zu den beiden positiven Ladungen eine negative Ladung durch die Sulfatgruppe. Dadurch wird bereits eine der positiven Ladungen neutralisiert und es ist nur ein Gegenion zur vollständigen Neutralisierung notwendig. Dadurch eluiert es früher von der Säule als Saxitoxin. Diese durch die Ionenpaare gesteigerte Retention auf der Umkehrphase hat sich als Standardmethode für die Analyse von PSP-Toxinen etabliert. (Krock et al., 2007)

Nach der Trennung erfolgt die Detektion der Substanzen, dazu kann die HPLC mit unterschiedlichen Detektoren kombiniert werden. Allgemein kann zwischen zwei Detektionsarten unterschieden werden. Lösungsmitelegenschaften sensitive Detektoren, welche physikalische Parameter des Elutionsstroms messen. Diese werden

durch den Analyten verändern, beispielsweise Brechungsindex und Dielektrizitätskoeffizient. Die andere Detektion ist analytselektiv, sie ist auf bestimmte Eigenschaften der Analyten ausgerichtet (UV-Extinktion, Diffusionsstrom oder Fluoreszenz). (Skoog & Leary, 1992)

Fluoreszenzdetektoren

Fluoreszenzdetektoren (FLD) werden zur Detektion von PSP-Toxinen eingesetzt. Grundlegend ist es, dass die zu detektierenden Substanzen fluoreszenzaktiv sind. Bei den Toxinen ist dies nicht der Fall. Sie werden durch eine Nachsäulenderivatisierung zu fluoreszierenden Verbindungen oxidiert. Durch stark oxidierende Reagenzien, Periodsäure in Ammoniak oder Wasserstoffperoxid, wird das Guanidingerüst (vgl. Abb. 1) der PSP-Toxine aromatisiert und durch anschließendes Ansäuern mit Salpetersäure weiter zyklisiert. Durch die konjugierten Doppelbindungen weisen die Toxine ein großes π -System auf. Das ebenfalls vorliegende starre Ringsystem ist ebenfalls notwendig für Fluoreszenz, da diese durch planare Strukturen begünstigt wird. (Camman, 2001) Die Identifizierung der PSP-Toxine erfolgt durch den Vergleich der Retentionszeiten mit den Retentionszeiten eines Mischstandards, welcher ebenfalls durch die Nachsäulenderivatisierung fluoreszenzaktiviert wird. (Krock et al., 2007) Es erfolgt erst die Trennung und danach die Derivatisierung, wodurch ein Einfluss auf die chromatographische Trennung vermieden wird.

Die Anregung der Fluoreszenzstrahlung erfolgt durch Einstrahlen von Licht im UV/VIS-Bereich. Fluoreszenz einer Verbindung kann durch eine spezifische Wellenlänge angeregt werden. Von dem eingestrahlteten Licht werden Photonen absorbiert und dadurch Elektronen in einen angeregten Zustand angehoben (dieser Zustand liegt auf einem höheren Energieniveau als der Grundzustand). Elektronen, die von den Photonen angeregt werden können, liegen in großer Zahl in ausgedehnten π -Elektronensystem vor. Die im Vergleich zur Anregungswellenlänge längerwellige Fluoreszenzstrahlung entsteht dadurch, dass ein Teil der Anregungsenergie beim Zurückkehren der Elektronen vom Angeregten in den Grundzustand in strahlungslose (Schwingungen, Rotation) Energie umgewandelt wird. Die emittierte Fluoreszenzstrahlung wird über einen photoelektrischen Detektor erfasst. (Camman, 2001) Bei der Fluoreszenzmessung wird die Emission der Fluoreszenzstrahlung gegen einen Nullwert bestimmt, dadurch können bereits geringe Intensitäten gemessen werden, weswegen Fluoreszenzdetektoren eine hohe Empfindlichkeit aufweisen. Die Wellenlänge der Anregung der Fluoreszenz und die Wellenlänge der emittierten Strahlung unterscheiden sich voneinander. Im Vergleich dazu wird bei der UV/VIS-Messung die Abschwächung des Lichts durch die Absorption der Probe gegen einen Referenzstrahl gemessen. Die Empfindlichkeit ist geringer, da größere Unterschiede zu der Referenz vorliegen müssen, bis diese detektiert werden. (Camman, 2001)

5.4.2 Massenspektrometrie:

Die Massenspektrometrie ist ein physikalisches Verfahren, bei dem geladene Moleküle gemäß ihrem Masse- zu Ladungsverhältnis (m/z) im Vakuum getrennt werden. Sie dient zur Quantifizierung, Strukturaufklärung und Identifizierung organischer Moleküle. Vorteil ist, dass bereits sehr kleine Probenmengen für die Analyse ausreichend sind und selbst große Makromoleküle analysiert werden können. (Camman, 2001)

Die Aufnahme der Probe erfolgt im Einlasssystem, es können unterschiedliche Probenarten verarbeitet werden, für welche unterschiedliche Einlasssysteme benötigt werden. Flüssige Proben können durch Kopplung mit LC-Geräten in das MS eingebracht werden und gasförmige Proben über GC-Geräte. Eine andere Möglichkeit ist ein direktes Einlasssystem, welches besonders für geringe Probenmengen oder Feststoffproben geeignet ist.

Für die Ionisierung gibt es verschiedene Verfahren, bei denen je nach Analysenmethode einfach positiv, einfach negativ und mehrfach positiv oder negativ geladenen Ionen entstehen können. Allgemein kann zwischen harter und weicher Ionisierung unterschieden werden. Bei der harten Ionisierung tritt eine starke Fragmentierung auf, ein Beispiel dafür ist die Elektronenstoß-Ionisierung. Hierbei wird die Probe verdampft und mit einem Elektronenstrahl beschossen, durch die entstehende Energie wird das Molekül ionisiert und fragmentiert. (Camman, 2001) Beispiele für eine weiche Ionisierung sind Chemische Ionisierung (CI), Elektronenspray-Ionisierung (ESI), der Beschuss mit schnellen Atomen (FAB – Fast Atom Bombardement) und MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation), bei denen durch eine geringere Energie eine geringe Fragmentierung auftritt. Nach der Ionisierung gelangen die Ionen durch elektromagnetische Anziehungskräfte in das Massentrennsystem. (Camman, 2001)

In diesem werden die Ionen gemäß ihrem Masse- zu Ladungsverhältnis (m/z) getrennt. Ein wichtiges Kriterium für die durch das MS zu gewinnende Information ist dessen Auflösung, das bedeutet wie genau die jeweiligen Massen voneinander unterschieden werden können. (Naumer & Heller, 1986) Für die Quantifizierung von Phycotoxinen ist es ausreichend, die nominellen Massen voneinander zu trennen, da zusätzlich für die Identifizierung der jeweiligen Toxine eine CID-Messung durchgeführt wird. Für die Trennung gibt es unterschiedliche Arten von Massenanalysatoren. Die Ionen können zum einen in einem elektrischen oder magnetischen Feld getrennt werden (Sektorfeld-Instrumente), zum anderen können Ionen durch wechselnde elektrische Felder in Quadrupolen, Ionenfallen oder Zyklotronresonanz-Analysatoren herausgefiltert werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Trennung nach der Zeit, welche die Ionen für das Durchfliegen einer definierten Strecke im Vakuum benötigen (TOF – Time Of Flight – Analysatoren). (Camman, 2001)

Die ausgewählten Massen werden im letzten Schritt im Detektor analysiert und als Spektrum in der Computereinheit ausgegeben. Grundlegend für die optimale Funktionsweise eines Massenspektrometers ist das Vorhandensein von Vakuum im Bereich von (10^{-4} - 10^{-8} Torr). Dadurch wird gewährleistet, dass Ionen im Massenspektrum nicht durch Kollision mit anderen Molekülen fragmentieren und entladen werden. Des Weiteren erhöht es die Lebensdauer des Massenspektrometers, da durch das Vakuum keine Verunreinigungen in das Gerät gelangen und die Belastung verringert wird.

Ein häufig verwendeter Detektor ist der Elektronenvervielfacher, bei dem der ankommende Ionenstrahl mit dem Detektor kollidiert und Elektronen freisetzt, diese setzen auf ihrem Weg durch den Detektor weitere Elektronen frei, wodurch das Signal verstärkt wird. Dieses elektrische Signal wird am Ende gemessen. Die Probe geht verloren. Ein anderer Detektor ist der Faradaybecher, welcher nach einem ähnlichen

Prinzip der Signalverstärkung durch Elektronenfreisetzung nach Kollision funktioniert.

5.4.3 Elektrospray Ionisierung mit Triple Quadrupol Massenspektrometer:

Die Ionisierung in der Massenspektrometrie ist eine Konkurrenzreaktion und ein Gemisch von chemisch sehr unterschiedlichen Verbindungen kann zur Unterdrückung der Ionisierung und Interferenzen einzelner Verbindungen untereinander führen. Deswegen hat sich in der Praxis die LC-MS Kopplung durchgesetzt, bei der komplexe Substanzgemische vor der massenspektroskopischen Analyse zuerst vollständig oder partiell chromatographisch aufgetrennt werden. Dies kann durch die Kombination von MS-Analysatoren mit HPLC- oder GC-Geräten erreicht werden. Sie dienen als Einlasssystem und bieten den Vorteil, dass die Probe zum einen in die einzelnen Bestandteile aufgetrennt ist und zum anderen, neben dem Masse- zu Ladungsverhältnis (m/z) der Substanz, die Retentionszeit der entsprechenden Substanz, resultierend aus der vorherigen Chromatographie zur Identifizierung zur Verfügung steht.

Für die Analysen von marinen Phycotoxinen wird die Kombination LC-MS/MS genutzt. Dabei werden die Substanzen in der HPLC unter Umkehrphasen Bedingungen getrennt und anschließend durch Elektrosprayionisierung (ESI) ionisiert. Für die Analyse des Moleküls im Quadrupol ist es notwendig, dass es nicht in der Ionenquelle fragmentiert wird, da häufig im ersten Quadrupol das Molekülion als zu analysierende Masse ausgewählt wird und es durch eine vorherige Fragmentierung in der Ionenquelle zu Fehlbestimmungen kommen könnte. Um dies zu vermeiden, wird eine weiche Ionisationsmethode wie die ESI eingesetzt. Bei dem Massenanalysator handelt es sich um ein triple Quadrupol. Quadrupole sind die am häufigsten eingesetzten Analysatoren, da sie relativ kostengünstig und robust sind. (Camman, 2001) Ein weiterer Vorteil ist, dass sie niedrige Scanzeiten von < 100 ms aufweisen, welches eine Echtzeitanalyse ermöglicht. Der Quadrupol kann so gesteuert werden das er wie ein Massenfilter wirkt, der nur bestimmte m/z -Verhältnisse passieren lässt. Dieser Bereich ist während der Messung variabel. Alle anderen Ionen kollidieren mit dem Quadrupol, verlieren so ihre Ladung und werden aus dem Massenspektrometer gesaugt. Ein Quadrupol ist aus vier zylindrischen parallel verlaufenden Metallstäben aufgebaut, die Ionen werden in den Raum zwischen die Stäbe beschleunigt. Die jeweils gegenüberliegenden Stäbe sind elektrisch miteinander verbunden. An die Stäbe ist eine Gleichspannung angelegt, welche zusätzlich von einer Wechselfspannung überlagert wird. Dadurch resultiert ein moduliertes elektromagnetisches Feld, welches nur von einem oder mehreren m/z -Verhältnissen durchquert werden kann. Andere Verhältnisse weisen in dem Feld keine stabile Flugbahn auf und verlassen so den Analysator. Zwei Stäbe sind positiv geladen und zwei sind negativ geladen. (Camman, 2001)



Abbildung 4: Fotografie eines ausgebauten Quadrupols, Jörg Hildebrandt, AB SCIEX

So ist es möglich, Ionen welche sich um eine Masseneinheit unterscheiden, zu trennen. Dies ist im Vergleich zu hochauflösenden Massenanalysatoren, mit denen die Summenformel der Ionen bestimmt werden kann, sehr gering. Es kann ein Massenbereich von bis zu 4000 m/z abgedeckt werden.

Bei einem Triple Quadrupol handelt es sich um drei in Reihe geschaltete Quadrupole, der zweite Quadrupol dient in der Regel als Fragmentierungszelle. Hierzu wird ein Argon- oder Stickstoff-Gasstrom durch die Zelle geleitet. Die Ionen kollidieren mit den Gasmolekülen und werden durch die Kollisionsenergie fragmentiert. Die anderen beiden Massenanalysatoren können als Massenfilter eingesetzt werden oder alle ankommenden Ionen passieren lassen, wodurch sich unterschiedliche Analysemethoden ergeben.

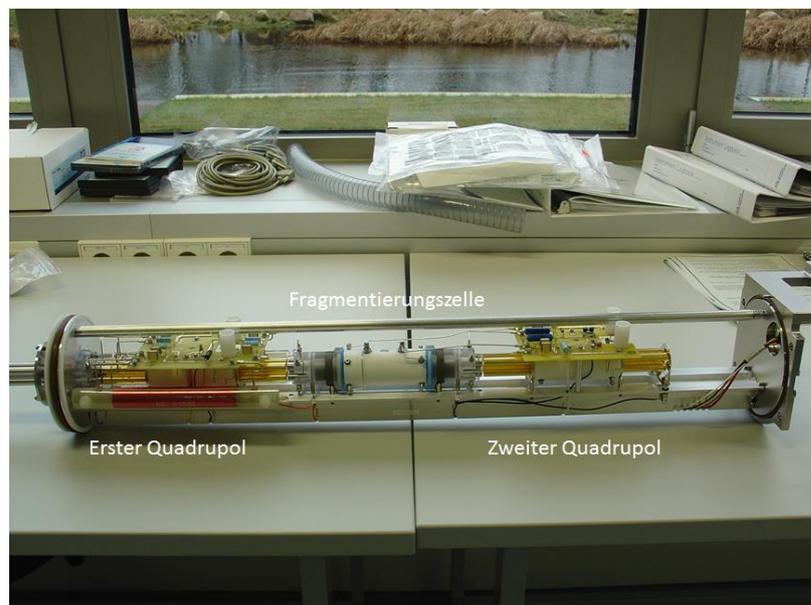


Abbildung 5: Fotografie eines ausgebauten Triple-Quadrupols, Jörg Hildebrandt, AB SCIEX

Unterschiedliche Operationsmodi

Full Scan

Bei einem Full Scan wird ein Massenbereich von Interesse analysiert. Dabei gelangen alle Ionen in diesem Bereich zum Detektor. Der zweite Quadrupol, welcher bei anderen Messmethode als Fragmentierungszelle eingesetzt wird, wird hier wie die anderen beiden Quadrupole als Massenfilter des zu analysierenden Massenbereichs eingesetzt. Eine Fragmentierung soll nicht stattfinden. Daraus resultiert bei realen Proben eine Vielzahl von Signalen, bei denen es sich um Matrixbestandteile, sowie um die gesuchten Substanzen halten kann. Um dies zu spezifizieren, müssen von den detektierten Massen (m/z) CID-Spektren erstellt werden. Full Scan Analysen werden eingesetzt, um bisher unbekannte Substanzen zu detektieren, von denen keine charakteristischen Fragmente bekannt sind oder, um sich einen allgemeinen Überblick über die Probenzusammensetzung zu verschaffen.

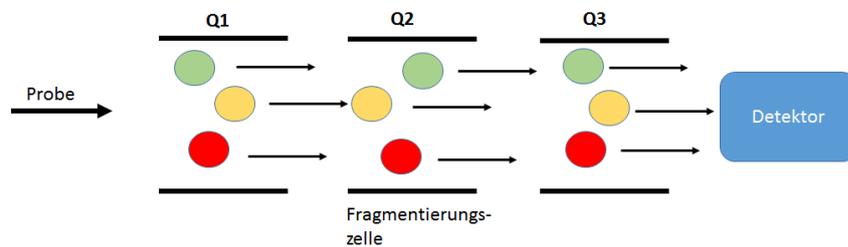


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Full Scan Messung

Selected-Reaktion-Monitoring (SRM)

Hierbei wird ein spezifischer Fragmentierungsübergang, welcher für eine Substanz charakteristisch ist, analysiert. Dazu wird im ersten Quadrupol die geladene Molekülmasse herausgefiltert und nur diese gelangt in die Kollisionszelle. Von der Kollisionszelle gelangen die Fragmente in den dritten Quadrupol, in dem eine oder mehrere Fragmentmassen herausgefiltert werden. Die Anzahl der Ionen, die an den Detektor gelangt, gibt die Intensität dieses Übergangs an.

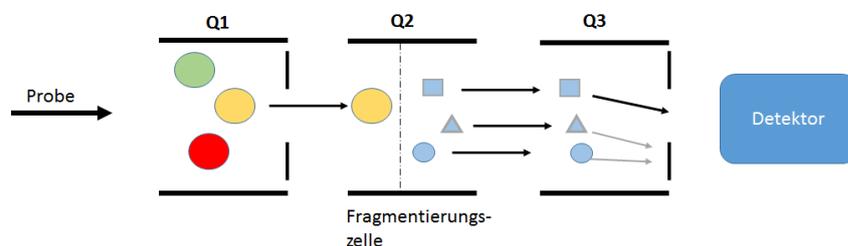


Abbildung 7: Schematische Darstellung einer SRM-Methode

Precursor Scan – Vorläuferscan (Prec)

Dieser Operationsmodus wird eingesetzt, um bisher unbekannte Varianten einer Substanzklasse zu detektieren. Häufig weisen Substanzgruppen charakteristische Fragmente auf. Für Spirolide sind diese Fragmente m/z 150, 164 und 180 (Vgl. Abb. 20). Der erste Quadrupol scannt einen definierten Massenbereich ab und alle Ionen gelangen in die Kollisionszelle. Von dieser gelangen sie in den dritten Quadrupol indem das charakteristische Fragment herausgefiltert wird. Darüber kann Aufschluss genommen werden, welche geladenen Molekülmassen die entsprechenden Fragmente produzieren und weitere Toxine der jeweiligen Klasse sein könnten.

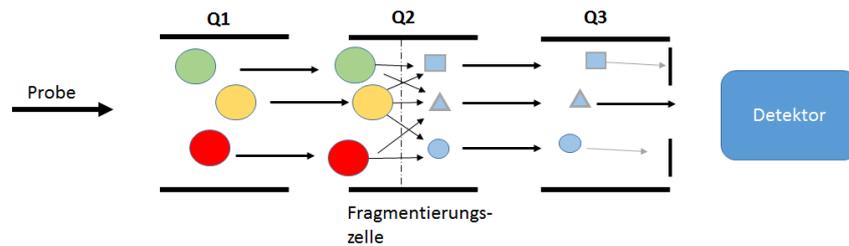


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Precursor Scans

Collision Induced Dissociation (CID)

Diese Form der Analyse wird hauptsächlich zur Identifizierung und Strukturaufklärung von bisher unbekannt Substanzen verwendet. Hierbei wird die zu bestimmende Molekülmasse im ersten Quadrupol herausgefiltert und in der Kollisionszelle fragmentiert. Der dritte Quadrupol dient nicht als Massenfilter, sondern er scannt einen definierten m/z Bereich ab. So wird ein charakteristisches Fragmentierungsmuster (CID-Spektrum) der Substanz erhalten, über welches Rückschlüsse auf eventuelle Strukturmerkmale durch den Vergleich von CID-Spektren bereits bekannten Toxine geschlossen werden kann. Die typischen Fragmentierungsschemata für Gymnodimine sind in Kapitel 8.1.1 und 8.1.2 dargestellt.

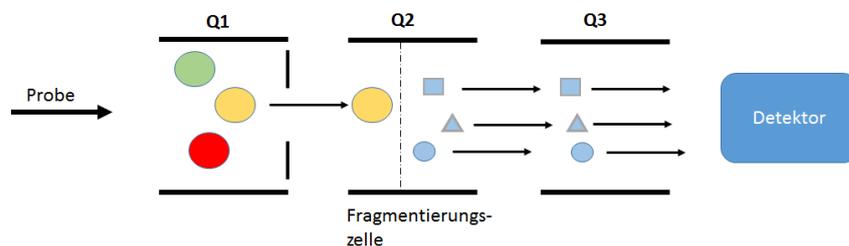


Abbildung 9: Schematische Darstellung einer CID-Methode

6. Vorgehensweise:

Für die Durchführung der in Kapitel 4 aufgeführten Ziele wurde für verschiedene *A. ostensefeldii* Stämme ein Toxinprofil erstellt. Dafür wurde auf bereits vorliegende Daten eines Isolats einer *A. ostensefeldii* Population aus den Niederlanden (Oosterschelde), welche in der Lage ist, Toxine jeder der drei verschiedenen Toxingruppen zu produzieren, zurückgegriffen. (Van de Waal et al., 2015, Manuskript in Arbeit, Helge Martens, AWI) Des Weiteren erfolgte die erneute Analyse eines Stamms aus Chile, um zu überprüfen, ob dieser in der Lage ist, neben der Produktion von PSP-Toxinen Cycloimine zu produzieren (vgl. Kapitel 3.3). Zusätzlich zu den bereits vorhandenen Daten erfolgt die Analyse weiterer Isolate aus Kanada, Norwegen, Argentinien und eines weiteren, noch nicht untersuchten, Stammes aus Chile. Mit den ausgewählten Proben soll ein möglichst großes geographisches Gebiet sowie unterschiedliche Umweltbedingungen, im Bezug auf die am Ursprungsort vorliegende Salinität, abgedeckt werden. Dadurch ist es möglich, einen Vergleich der Toxinprofile von Stämmen aus marinen Bedingungen und Stämmen aus niedrig salinen Wasserkörpern durchzuführen.

Zusätzlich wurde eine Expedition zum Limfjord (Dänemark) durchgeführt, um die Toxinprofile von *A. ostensefeldii* in der Nordsee, dem Limfjord und im Kattegat zu vergleichen. Für die im Limfjord auftretenden Populationen sind bereits Daten bekannt (vgl. Kapitel 3.3), durch die erneute Analyse soll einerseits überprüft werden, ob sich die Populationen verändert haben und andererseits zusätzlich eine detaillierte Analyse durchgeführt werden, da zu dem Zeitpunkt der letzten Analyse nur eine sehr geringe Anzahl an Cycloimintoxine bekannt war. Deswegen wird vermutet, dass die bereits publizierten Toxinprofile unvollständig sein könnten.

Die Analyse der PSP-Toxine erfolgt mittels Ionenpaarchromatographie, da die Toxine durch ihre ionische Form (vgl. Abb. 1) nicht mittels Umkehrphasenchromatographie trennbar sind. (vgl. Kapitel 5.4.1) Die Analyse der Cycloimine erfolgt mittels HPLC-MS/MS (vgl. Kapitel 5.4.3). Die Quantifizierung der Toxine erfolgt durch externe Standardkalibrierung, da nur wenige Standards kommerziell verfügbar sind und diese sehr kostspielig sind. Eine genauere Quantifizierung über isotope markierte interne Standards ist daher nicht möglich. Die Angabe der Gymnodimine erfolgt als Gymnodimin A Äquivalente und die Angabe der Spirolide als SPX 1 Äquivalente, da es sich dabei um die einzigen verfügbaren analytischen Standards handelt.

Mit mit daraus gewonnen Daten erfolgt neben der quantitativen Darstellung eine qualitative Darstellung um die verschiedenen Toxinprofile in ihrer prozentualen Zusammensetzung vergleichen zu können.

7. Material und Methoden:

7.1 Probennahmeorte:

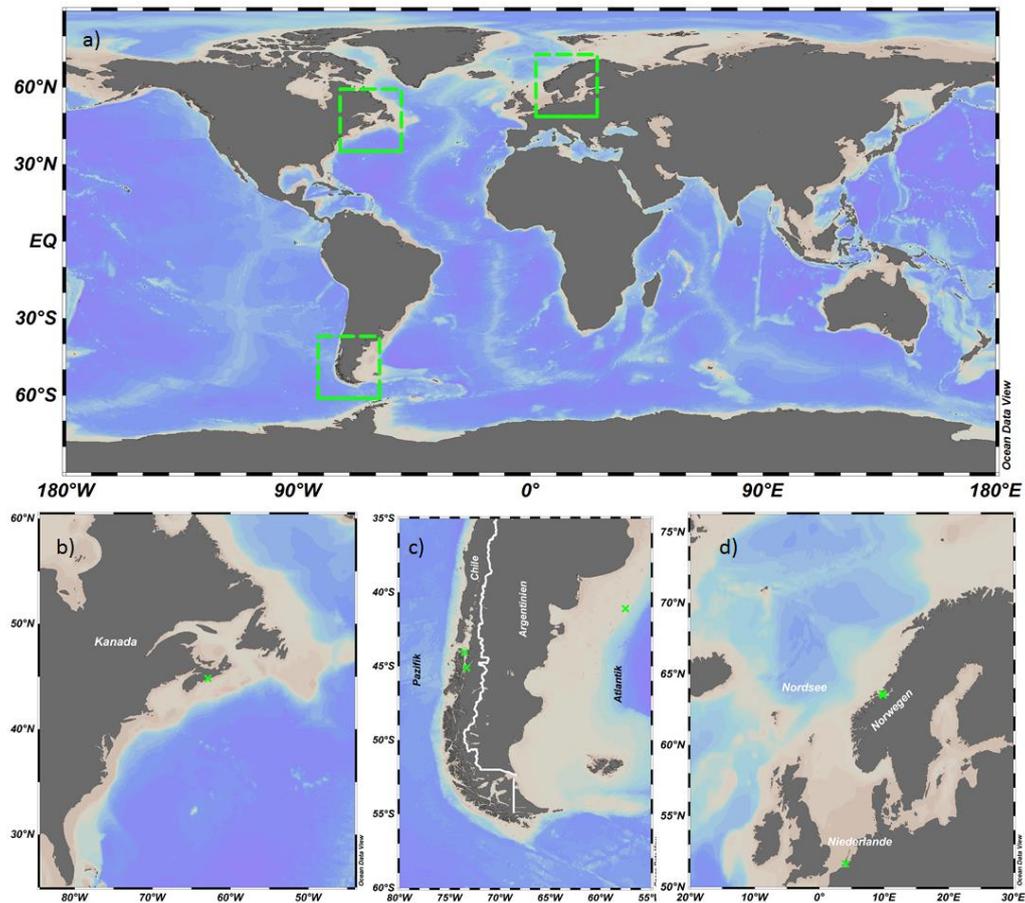


Abbildung 10: Darstellung der Probennahmeorte: a) Weltkarte mit Markierungen der Probennahmeorte; b) Herkunft der Probe aus Kanada; c) Herkunft der Proben aus Südamerika; d) Herkunft der Proben aus Nordeuropa

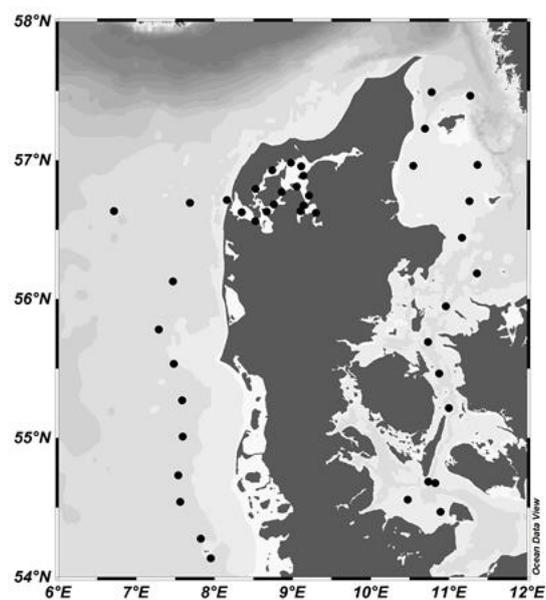


Abbildung 11: Darstellung der Probennahmeorte der Uthörnexpedition 2016, ein genaues Stationsprotokoll ist im Anhang Nr. 1 zu entnehmen

Uthörn Expedition

Die Expedition erfolgte von Bremerhaven durch die Nordsee zum Limfjord in Dänemark, von dort aus weiter in den Kattegat. Bei den während der Ausfahrt gewonnenen Proben handelt es sich um Planktonextrakte, welche direkt aus den durchgeführten Probennahmen extrahiert worden sind. Sie können somit nicht klar auf eine Spezies zurückgeführt werden, da weitere Produzenten von PSP-Toxinen und Gymnodiminen, neben *A. ostenfeldii*, bekannt sind. Ein direkter Vergleich mit den Kulturextrakten der anderen Proben ist daher nicht möglich. Ein Eindruck des vorhandenen Toxinprofils sowie der ungefähr vorhandenen Menge ist jedoch möglich.

Kanada, Nova Scotia:

Bei dem Stamm AOSH 2 aus Kanada handelt es sich um einen der ersten Stämme, der als Spirolid Produzent *A. ostenfeldii* identifiziert wurde. Zusammen mit den Stämmen aus Argentinien handelt es sich um Populationen aus dem offenen Ozean, die bei dem im Meer üblichen hohen Salzgehalten (34 – 35) isoliert wurden.

Norwegen, Fjordsystem:

Die norwegischen Isolate stammen aus Feldproben, welche bei einer Expedition mit der Heinke im Jahr 2015 im norwegischen Trondheim-Fjord gesammelt wurde. Bei den Norwegischen Fjorden handelt es sich um ein Gebiet mit geringeren Salinitäten als im offenen Ozean (21-34). Insgesamt drei Stämme wurden am AWI kultiviert.

Oosterschelde, Niederlande

Der *A. ostenfeldii* Stamm OKNL 42 wurde während einer toxischen *Alexandrium ostenfeldii* Blüte in der Oosterschelde in den Niederlanden isoliert und kultiviert. Bei der Oosterschelde handelt es sich um ein flaches Mündungsgewässer, in dem verschiedene Aquakulturen kultiviert werden. Die in der Oosterschelde vorliegende Salinität liegt zwischen 8 - 21. (Burson et al., 2014)

Argentinien:

Insgesamt drei Stämme von *A. ostenfeldii* wurden während einer Expedition im Jahr 2015 an die argentinische Schelfkante isoliert und am AWI kultiviert. Diese Populationen unterliegen marinen Bedingungen und sind somit höheren Salinitäten ausgesetzt (33,64).

Fjordsystem in Chile:

Detailanalyse des Stammes AOA32-2 aus chilenischen Fjorden mit einer geringeren Salinität als im offenen Ozean (28,2). Die Analyse ist spezifisch auf die Detektion von Cycloiminen ausgerichtet. Zusätzlich wird eine weiterer, bisher nicht untersuchter Stamm AOICW, aus dem gleichen Chilenischen Fjord untersucht, welcher dichter am Pazifik liegt und so marineren Bedingungen unterliegt (32,5).

7.2 Bestimmung der Toxine:

7.2.1 Probennahme der Uthörnausfahrt:

Die Probennahme erfolgte mit einem Phytoplanktonnetz (Maschenweite = 20 µm). Mit dem Netz wurden vertikale Netzzüge durchgeführt und das erhaltene Probenmaterial mit filtriertem Seewasser (gefiltriert über 5 µm Polycarbonatfilter) in 2 L Plastikflaschen überführt. Danach wurde auf ein definiertes Volumen, in der Regel 1000 ml, aufgefüllt. Davon wurden 50 ml entnommen und zur Identifizierung der Spezies aufbewahrt. Des Weiteren wurden für spätere mikroskopische Arbeiten 18 ml entnommen, in ein Glasgefäß überführt und mit 2 ml Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

Als nächster Schritt erfolgte eine Fraktionierung des restlichen Wassers über einen dreiteiligen Filterturm mit Gaze der Maschenweite von 200, 50 und 20 µm. Die jeweiligen Fraktionen wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit filtriertem Seewasser auf 45 ml aufgefüllt. Diese wurden in je drei 15 ml Zentrifugenröhrchen aliquotiert. Je eins diese Aliquote wird für die Extraktion von DSP, PSP und DNA verwendet.

Zur Pellettierung des Planktons wurden die Zentrifugenröhrchen für 15 min bei 4 °C und 3220 *rcf* zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und die trockenen Zellpellets wie unten angegeben aufgearbeitet.

Die Salinitätsdaten wurden mit einer CTD-Sonde (Conductivity, Temperature, Depth) ermittelt. Dabei handelt es sich um eine Sonde, welche für ozeanographische Untersuchungen eingesetzt wird.

Ein genaues Stationsprotokoll der Ausfahrt ist im Anhang Nr. 1 zu entnehmen.

7.2.2 Extraktion der PSP-Toxine:

Chemikalien:

Als Extraktionsmittel wurde 0,03 M Essigsäure verwendet. Als Eluenten wurden in der HPLC für Eluent A: 6 mM Oktansulfonsäure, 6 mM Heptansulfonsäure, 40 mM Ammoniumphosphat mit verdünnter H₃PO₄ auf pH 7 eingestellt und 0,75 % THF (Tetrahydrofuran) eingesetzt. Eluent B: 13 mM Oktansulfonsäure, 50 mM H₃PO₄, mit NH₃ auf pH 6,9 eingestellt, 15 % ACN (Acetonitril), 1,5 % THF. Für die Nachsäulenderivatisierung der Toxine wurden folgende Chemikalien verwendet: 10 mM Periodsäure + 550 mM NH₃ und 0,75 M Salpetersäure.

Die verwendeten Geräte werden in dem Abschnitt Extraktion für die jeweiligen Toxine direkt angegeben.

Extraktion:

Für die Extraktion der PSP-Toxine des Stammes AOICW aus Chile wurden die mit Algen belegte Glasfaserfilter kleingeschnitten und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Extraktion mit 4 ml 0,03 M Essigsäure als Extraktionsmittel und Homogenisierung mittels Ultraschallsonotrode (HD2070, Sonopuls, Bandelin, Berlin, Deutschland) 5 min 10 sec., 70 Zyklen, max. Energie.

Dann erfolgte die Phasentrennung durch Zentrifugation (Parameter: 3220 rcf, 10 °C, 15 min (Eppendorf Centrifuge 5810 R, Hamburg, Deutschland)). Der Überstand wurde in einen 25 ml Spitzkolben überführt und zur quantitativen Extraktion eine Nachextraktion durchgeführt. Die beiden Überstände wurden vereinigt und das Volumen am Rotationsverdampfer (Laborota 4002-Control, Heidolph, Schwabach, Deutschland) auf 1 ml eingeengt (60 °C, 30 mbar). Der Rohextrakt wurde durch einen Spinfilter (Porendurchmesser 0,45 µm, Millipore Ultrafree, Eschborn, Deutschland) gereinigt (Zentrifugenparameter: 0,5 min, 10 °C, 5000 rcf). Das Filtrat wurde in ein HPLC-Messvial überführt und bis zur Messung bei -20 °C eingefroren.

7.2.3 Analyse der PSP-Toxine:

Die Analyse der PSP-Toxine erfolgte mittels HPLC-FLD (Agilent LC1100-FLD G1321A, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) mit Nachsäulenderivatisierung (Pinnacle PCX 2500, Pickering Laboratories, Mountain View, CA, USA). In der HPLC sind integriert ein Entgaser G1379A, eine quaternäre Pumpe G1311A, ein Probengeber G1329A und ein Probenthermostat G13308. Von der Probe wurden für die Bestimmung 20 µl injiziert. Der Elutionsmittelfluss betrug 1 ml/min. Für die Elution der Toxine wurden die Eluenten in einem Gradienten verwendet (Vgl. Tab. 1).

Tabelle 1: Darstellung des Gradienten der PSP-Methode

Zeit min	Eluent A %	Eluent B %
0	100	0
15	100	0
16	0	100
35	0	100
36	100	0
45	100	0

Die Temperatur des Probenthermostats wurde auf 4 °C eingestellt. Die Trennung der Substanzen erfolgte über eine Phenomenex Luna C18-Säule (5 µ, 250 x 4,6 mm). Vor der Trennsäule war eine Vorsäule, Phenomex SecuriGuard geschaltet.

Die Nachsäulenderivatisierung erfolgte mit einem Fluss der Derivatisierungssubstanzen von je 0,4 ml/min. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit einer Anregungswellenlänge von 333 nm und einer Emissionswellenlänge von 395 nm.

Die Identifizierung der Toxine erfolgte durch externe Standardkalibrierung. Dazu wurde ein Mischstandard verwendet (Certified Reference Material Programme of the Institute for Marine Biosciences, National Research Council, Halifax, NS, Kanada). Die Retentionszeit der detektierten Peaks wurden mit denen der Standardsubstanzen verglichen und dadurch die Toxine identifiziert. Um sicherzustellen, dass es sich bei den entsprechenden Peaks wirklich um Toxine handelt, erfolgte die Messung mit und ohne Nachsäulenderivatisierung. Die Peaks, bei denen es sich um Toxine handelt sind nur bei der Methode mit Nachsäulenderivatisierung zu erkennen. Die Quantifizierung

erfolgte mittels OpenLAB CDS, Chem Station Edition C01.04 [35], über externe Standardkalibrierung.

7.2.4 Extraktion der Cycloimin-Toxine:

Chemikalien:

Als Extraktionsmittel wurde Methanol verwendet. Als Eluenten wurden in der HPLC für Eluent A: H₂O + 50 mM Ameisensäure + 2 mM Ammoniumformiat und für Eluent B: MeOH + 50 mM Ameisensäure + 2 mM Ammoniumformiat eingesetzt.

Die verwendeten Geräte werden in dem Abschnitt Extraktion für die jeweiligen Toxine direkt angegeben.

Extraktion:

Die Extraktion der Probe des Stammes AOICW aus Chile wurden am Instituto de Fomento Pesquero (IFOP) in Chile analog der Aufarbeitung der Planktonaliquote der Uthörnexpedition durchgeführt (vgl. Kapitel 7.2.1). Die Extrakte wurden getrocknet und an das AWI verschickt. Die drei getrockneten Cycloimin-Extrakte des Stammes AOICW aus Chile wurden mit je 3 ml MeOH versetzt und durch Ultraschallbad (DT 255, Sonorex Digitec, Bandelin, Berlin, Deutschland) und Vortexer (Press-To-Mix, cenco-instrumenten b.v., Breda, Niederlande) gelöst. Anschließend wurden die Rohextrakte in einem 25 ml Spitzkolben vereinigt und am Rotationsverdampfer (Laborota 4002-Control, Heidolph, Schwabach, Deutschland) getrocknet. Das Extrakt wurde mit 1 ml MeOH aufgenommen und durch Spinfiltration (Porendurchmesser 0,45 µm, Millipore Ultrafree, Eschborn, Deutschland) gereinigt (Zentrifugenparameter: 10 °C; 0,5 min; 5,0 rcf). Das Filtrat wurde in ein HPLC-Vial überführt und bis zur Analyse bei -20 °C eingefroren.

7.2.5 Analyse der Cycloimin-Toxine:

Die Analyse der Cycloimin-Toxine erfolgte mittels LC-MS/MS (Agilent, Waldbronn, Deutschland 1100 HPLC; AB SCIEX, API 4000 Q Trap MS/MS, Darmstadt, Deutschland) Die Flüssigchromatographie beinhaltet ein Laufmittelreservoir, einen in den Fluss geschalteten Entgaser (G1379A), eine binäre Pumpe (G1311A), einen gekühlten Autosampler (G1329A/G1330B) und einen Säulenofen (G1316A). Die Trennung der Toxine erfolgte durch eine Phenomenex Hypersil BDS 3u C18-Säule, 120 A (50 * 2,00 mm). Das Probenthermostat wurde auf 4 °C eingestellt. Von der Probe wurden für die Bestimmung 5 µl injiziert. Der Elutionsmittelfluss betrug für die Messung 0,2 ml/min. Für die Elution der Toxine wurden die Eluenten in einem Gradienten verwendet (Vgl. Tab. 2).

Tabelle 2: Darstellung des Gradienten der Cycloimin-Multimethode

Zeit min	Eluent A %	Eluent B %
0	95	5
10	0	100
20	0	100
21	95	5
30	95	5

Zur Quantifizierung der Toxine wurden die Proben mit einer Multimethode für Spirolide analysiert. In dieser Multimethode sind für alle bekannten Spirolide sowie Gymnodimine charakteristischen Übergänge enthalten. Eine Tabelle mit den in der Methode enthaltenen Übergängen ist im Anhang Nummer 2 dargestellt. Weitere Methodenparameter wie Kollisionsgas und die Kollisionsenergie sind in Anhang Nummer 3 dargestellt. Die Quantifizierung der Toxine erfolgt durch externe Standardkalibrierung. Als Standardsubstanz wurde für Spirolide SPX 1 in den Konzentrationen 1, 10, 100 und 1000 pg/ml zur Erstellung einer Kalibriergeraden eingesetzt. Für Gymnodimine wurde ein GYM A Standard in der Konzentration 10 pg/ul als externe Einpunktkalibrierung eingesetzt.

Durchführung von PrecursorScans (vgl. Kapitel 5.4.3) der für Spirolide typischen Fragmentmassen m/z 150, 164 und 180. (Vgl. Abb. 20, Literaturangaben) Der verwendete Gradient entspricht dem der Multimethode. Der im Vergleich zur Multimethode veränderte Parameter ist der erhöhte Fluss des Kollisionsgases auf die Einstellung hoch. Der zu analysierende Massenbereich wurde zu m/z 150-800 definiert.

Durchführung einer FullScan Messung (vgl. Kapitel 5.4.3) über den für Gymnodimine typischen Massenbereich von m/z 480-550 durchgeführt. Der Gradient der FullScan Messung entspricht dem der Multimethode. Der Unterschied im Vergleich zu der Multimethode liegt in der Verringerung des Volumenstroms des Kollisionsgases auf die kleinste mögliche Einstellung (niedrig), ebenso wurde die Kollisionsenergie auf 5 V verringert.

Für die CID-Messungen (vgl. Kapitel 5.4.3) wurde der Gradient der Multimethode verwendet. Die MS-Parameter entsprechen im Wesentlichen denen der Multimethode. Unterschiede sind, dass keine substanzspezifischen Übergänge analysiert werden, sondern zwei Massenbereiche m/z 100-230 und m/z 225-725 gescannt werden. Der zweite Unterschied ist, dass der Volumenstrom des Kollisionsgases auf die Einstellung hoch eingestellt wurde. Konnte mit der Kollisionsenergie von 57 V, welche ebenfalls in der Multimethode verwendet wurde, keine ausreichende Fragmentierung erzielt werden, wurde die Energie auf 65 V erhöht.

8. Ergebnis und Diskussion:

8.1 Strukturelle Charakterisierung der bisher unbekanntenen Toxine:

8.1.1 Gymnodimine:

Durch den FullScan über den für Gymnodimine typischen Massenbereich von m/z 480-550 konnte eine Vielzahl von Peaks detektiert werden, von denen zwei durch den Vergleich der erstellten CID-Spektren als Gymnodimine identifiziert werden konnten. Für beide Verbindungen konnte ein Strukturvorschlag gemacht werden. Die Strukturaufklärung erfolgte über den Vergleich der aufgenommenen CID-Spektren mit CID-Spektren bereits bekannter Toxine aus der Literatur.

Fragmentierungsschema:

Die Fragmentierung beginnt analog wie bei den strukturell verwandten Spiroliden mit einer Wasserabspaltung ausgehend von dem Molekülpeak. Vor der weiteren Fragmentierung findet eine Retro-Diels-Alder Reaktion (Vgl. Abb. 12) im Ringsystem neben dem Cycloiminringsystem statt - durch die das makrozyklische Ringsystem geöffnet wird.

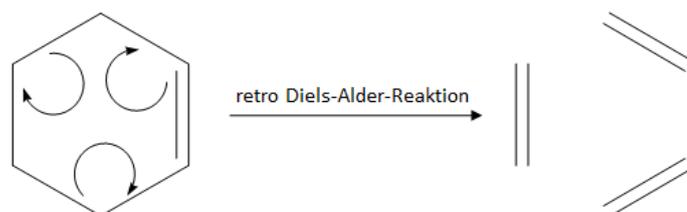


Abbildung 12: Schematische Darstellung einer Retro-Diels-Alder-Reaktion

Von der nun linearen Struktur entstehen durch verschiedene C-C Bindungsbrüche weitere Fragmente. Die mittelgroßen Fragmente entstehen durch die Abspaltung des Ketofuranylringes inklusive einer weiteren Wasserabspaltung. Charakteristisch sind zudem die vielen kleinen Fragmente, welche durch die Cycloimineinheit mit unterschiedlich langen Seitenketten entstehen. (vgl. Abb. 13)

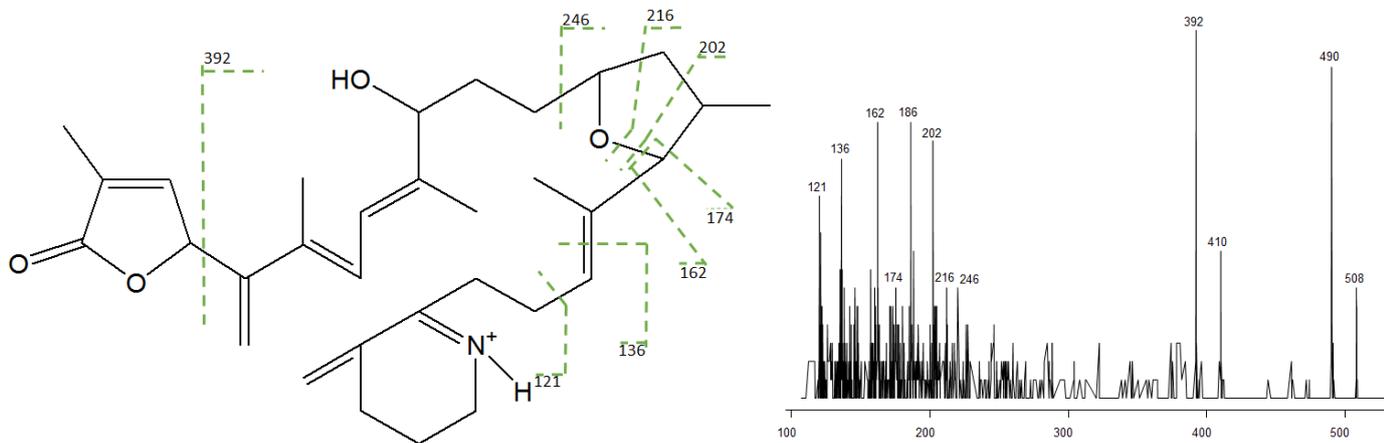


Abbildung 13: links: Fragmentierungsschema für Gymnodimin A nach Retro-Diels-Alder-Reaktion, analog dargestellt zu Van Wagoner et al., (2011), Abbildung 4; rechts: CID-Spektrum von Gymnodimin A aus Stamm NX 56-07, Norwegen, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS

Strukturelle Charakterisierung der Gymnodimine:

m/z 494 in Stamm NX 56-07, Norwegen:

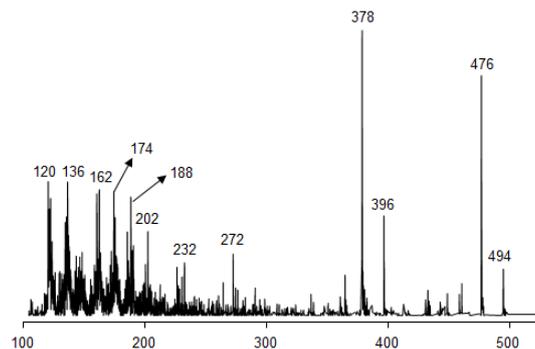


Abbildung 14: CID-Spektrum m/z 494 in Stamm NX 56-07, Norwegen, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS

In den Stämmen aus Norwegen wurde eine Verbindung mit dem Masse- zu Ladungsverhältnis von m/z 494 detektiert. Es hat im Vergleich zu Gymnodimin A (m/z 508, Vergleich Abb. 13 rechts) eine um 14 Da verringerte Masse. Eine Massendifferenz von 14 Da kann mit einer Demethylierung erklärt werden. Es handelt sich somit mit großer Wahrscheinlichkeit um eine Desmethylvariante von Gymnodimin A.

An dem CID-Spektrum ist deutlich zu erkennen, dass es sich um ein Gymnodimin handelt, da es die typischen Fragmentierungsmuster aufweist (Vgl. Abb. 13). Eine Wasserabspaltung ausgehend vom Molekülpeak (Übergang m/z 494 > 476) und eine Vielzahl kleinere Fragmente (m/z 120, 136, 162, 174 und 202). Im Vergleich zu CID-Spektrum von GYM A (vgl. Abb. 13 rechts) sind die Fragmente bis zu dem Fragment m/z 174 jeweils um 14 Da verringert. Danach weisen die Fragmente die gleichen Massen auf. Bei dem im CID-Spektrum vorliegenden Fragment m/z 188 kann es sich durch die Massendifferenz von 14 Da um die Desmethylvariante des in GYM A auftretenden m/z 202 Fragments handeln. In der gleichen Betrachtungsweise liegt bei dem Fragment m/z 202 die Desmethylvariante des in GYM A auftretenden Fragments m/z 216 vor. Die Massendifferenz beträgt ebenfalls 14 Da. Da die kleineren Fragmente, bei denen der Bindungsbruch dichter am Cycloiminring erfolgt, den Fragmenten im CID-Spektrum von GYM A entsprechen, liegt die Demethylierung mit großer Wahrscheinlichkeit in der Nähe des Bindungsbruches für das m/z 202 und das Fragment m/z 216 vor. Der Bindungsbruch für dieses Fragmente erfolgt zwischen C(15/16) für m/z 202 und C(16/17) für m/z 216 (vgl. Abb. 13 links). An C(15) liegt in GYM A eine Methylgruppe vor, es ist daher sehr wahrscheinlich, dass für die bisher unbekannte Struktur an Position C(15) eine Demethylierung vorliegt. Das bisher unbekanntes Gymnodimin wird als **15-desmethyl Gymnodimin A** bezeichnet.

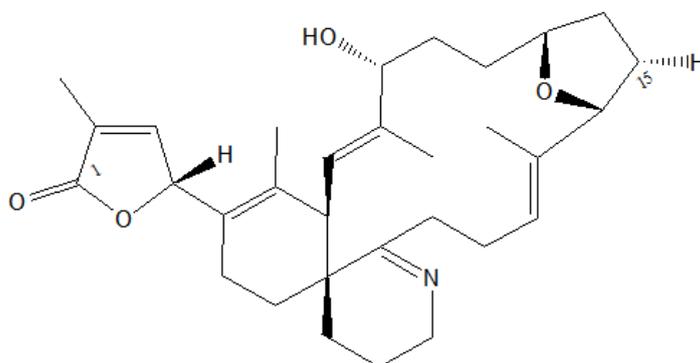


Abbildung 15: Strukturvorschlag für m/z 494 in Stamm NX 56-07, Norwegen, 15-desmethyl Gymnodimin A

m/z 510 in Stamm NX 56-10, Norwegen:

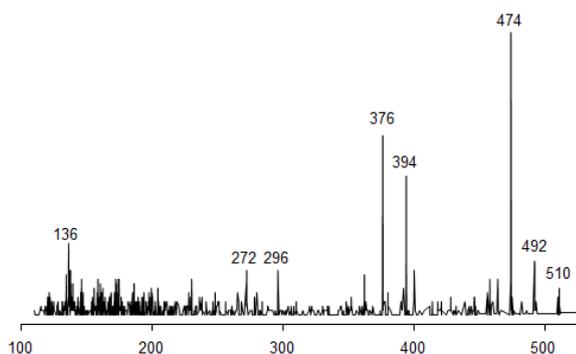


Abbildung 16: CID-Spektrum m/z 510 in Stamm NX 56-10, Norwegen, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS

Das zweite bisher unbekannte Gymnodimin hat die geladenen Molekülmasse m/z 510. Die Massendifferenz zu Gymnodimin A (m/z 508) beträgt 2 Da. Formal kann die Differenz von 2 Da durch die Substitution einer vorhandenen Methylgruppe mit einer Hydroxygruppe erklärt werden. Die mittelgroßen Fragmente im Molekül (m/z 394 und 376) sind im Vergleich zu GYM A um 16 Da verringert. Die Abspaltung ausgehend vom Molekülpeak zum ersten mittelgroßen Fragment beträgt für dieses Gymnodimin 116 Da (Übergang $510 > 394$). Bei dem gleichen Übergang tritt in GYM A eine Abspaltung von 98 Da auf. Die daraus resultierende Massendifferenz beträgt 18 Da. Eine Massendifferenz von 18 Da kann durch eine Hydroxylierung im Zusammenhang mit einer Hydrierung einer Doppelbindung erfolgen. Da es sich bei der Abspaltung um die Abspaltung des Ketofuranylringes handelt, muss die strukturelle Veränderung innerhalb von Position C(1-4) erfolgen. Die wahrscheinlichste Position ist dafür C(3), da durch die zusätzliche Hydroxygruppe im Molekül die detektierte m/z von 510 überschritten werden würde, ist wahrscheinlich eine Verschiebung der Hydroxygruppe von Position C(10) an C(3) erfolgt.

Auffällig ist, dass ausgehend vom Molekülpeak zwei Wasserabspaltungen stattfinden (m/z 492 und 474). Im Vergleich dazu liegt im CID-Spektrum von GYM A nur eine Wasserabspaltung vor (vgl. Abb. 13 rechts). Dies kann durch die veränderte Stabilität des Ketofuranylringes erklärt werden. Durch die dort vorliegende Hydroxygruppe treten in dem Ringsystem zwei Wasserabspaltungen auf (m/z 492 und 474). Bei dem bisher unbekanntem Toxin handelt es sich um den ersten Befund eines Gymnodimins, bei dem die Doppelbindung zwischen C(2/3) hydriert vorliegt. Daher wird für dieses Gymnodimin eine bisher unbekannte Grundstruktur angenommen. Das bisher unbekannte Gymnodimin wird in Fortsetzung der bisher durchgeführten Nomenklatur (GYM A-D) als **Gymnodimin E** bezeichnet.

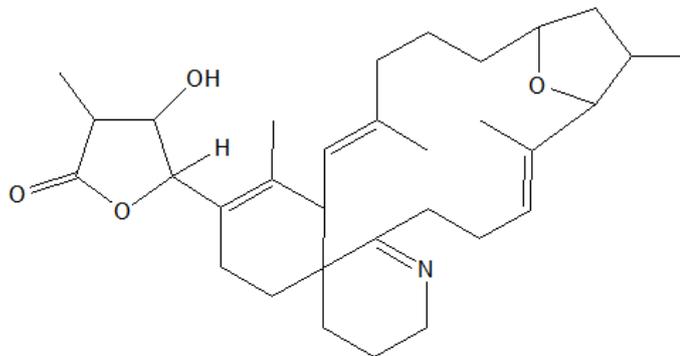


Abbildung 17: Strukturvorschlag für m/z 510 in Stamm NX 56-10, Norwegen, Gymnodimin E

8.1.2 Spirolide:

Zusätzlich zu den zwei detektierten Gymnodiminen, konnten in allen untersuchten *A. ostenfeldii* Stämmen bisher unbekannte Spirolide mittels der durchgeführten Precursor Scans detektiert werden.

Fragmentierungsschema:

Die Fragmentierungsweise von Spiroliden wird im Folgenden anhand von SPX 1 (vgl. Abb. 18 & 19), Spirolid G (vgl. Abb. 21 & 22) und Spirolid H (vgl. Abb. 23 & 24) dargestellt.

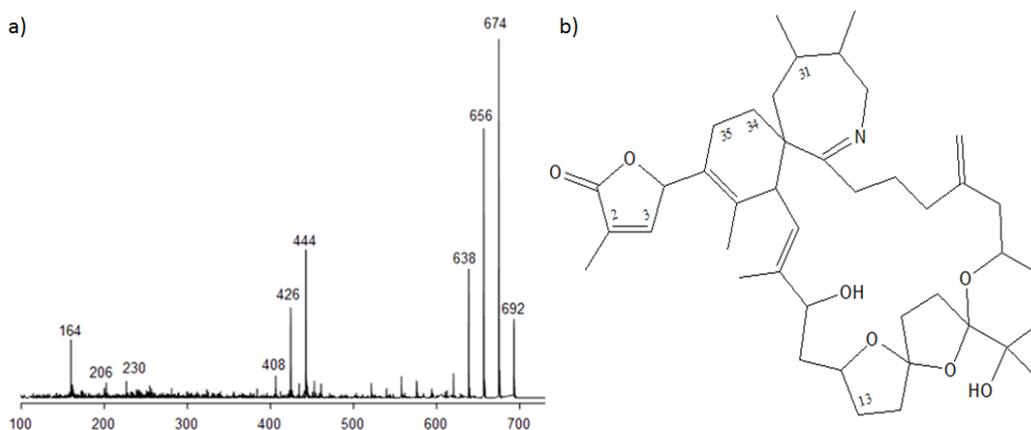


Abbildung 18: a) Spektrum von SPX1, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS, b) Struktur von SPX 1, 13-desmethyl Spiolid C [erstellt mit ChemDraw Pro 7.0]

Ein typisches CID-Spektrum von Spioliden weist drei Fragmentgruppen auf. Zum einen den Molekülpeak $[M+H]^+$ und von diesem ausgehend mehrere Wasserabspaltungen. Für SPX1 liegen beispielsweise drei Wasserabspaltungen vor.

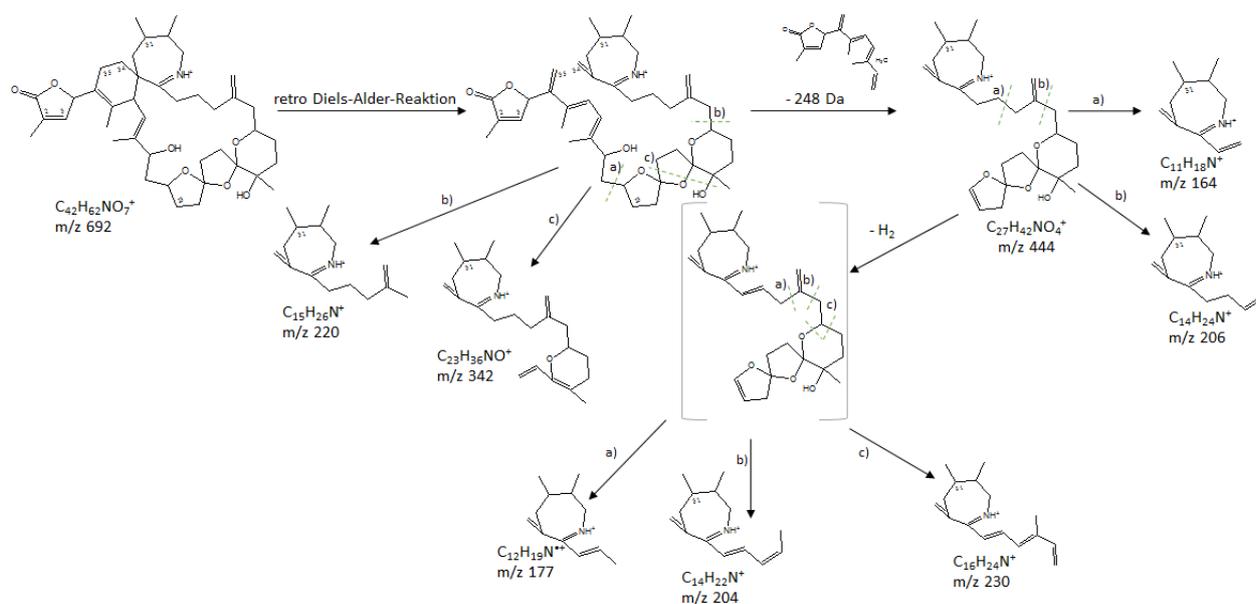


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Fragmentierungsschema von Spioliden anhand von SPX 1, gemäß (Sleno et al., 2004, Abbildung 4B)

Die weitere Fragmentierung beginnt mit einer Retro-Diels-Alder Reaktion (vgl. Abb. 12), bei der das Ringsystem am Ketofuranylring geöffnet wird. Der Mechanismus der Reaktion wurde im einleitenden Teil der strukturellen Charakterisierung von Gymnodiminen dargestellt, für Spiolide läuft die Reaktion analog ab.

Anschließend erfolgt die Abspaltung eines Fragments m/z 248. Dies beinhaltet den Ketofuranylring und die angrenzende Seitenkette (C(1) – C(11)), bis zum trispiroketal Ringsystem im unteren Teil des Moleküls sowie eine Wasserabspaltung. Aus dieser Abspaltung resultiert bei SPX 1 und anderen Spioliden des C-Typs ein Fragment mit

dem Masse- zu Ladungsverhältnis von m/z 444. Von diesem gehen wie beim Molekülpeak Wasserabspaltungen aus. Treten Fragmente im diesen Massenbereich im Chromatogramm auf, handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ein Spirolid des C-Typs.

Bei den kleinen Fragmenten im Spektrum handelt es sich um den Iminring, mit unterschiedlichen langen Seitenketten. Bei dem Fragment m/z 164 handelt es sich um ein charakteristisches Fragment für Spirolide. (Sleno et al., 2004) Weitere charakteristische Fragmente für Spirolide sind das Fragment m/z 150 (Hu et al., 2001) und m/z 180. (Sleno et al., 2004) Dabei handelt es sich um eine Desmethyl- und eine Hydroxylvariante des m/z 164 Fragments. Diese Fragmente wurden in dieser Studie zur Identifizierung unbekannter Spirolide im Precursor Scan eingesetzt.

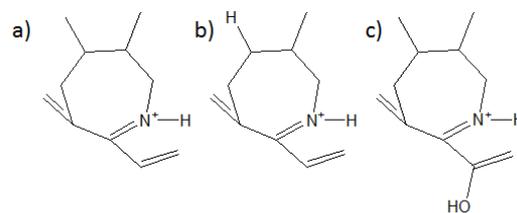


Abbildung 20: Darstellung bekannter Vorläufermassen für Spirolide, a) m/z 164, b) m/z 150, c) m/z 180

Neben SPX 1 und direkten Strukturanaloga, welche ein sehr ähnliches Fragmentierungsschema aufweisen, gibt es Spirolide des G-Typs, welche sich wesentlich durch die mittelgroßen Fragmente unterscheiden. Bei Spiroliden dieses Typs liegt kein 6:5:5 trispiroketal Ringsystem vor, sondern ein 6:5 dispiroketal Ringsystem. Durch diese Änderung weisen sie ein anderes Fragmentierungsschema für den mittleren Teil des CID-Spektrums im Massenbereich von 300 bis 450 auf.

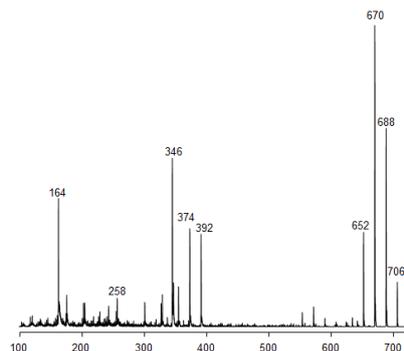


Abbildung 21: Spektrum von 20-methyl Spirolid G, detektiert in AOSH 2, Kanada, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS

Die mittelgroßen Fragmente sind nach links zu kleineren Massen verschoben, die Spaltung findet nicht mehr an dem linken 5-Ring an Position C(12) statt, sondern an dem in dieser Struktur vorliegenden mittleren 6-Ring. So werden größere Teile des Moleküls abgespalten, was in kleineren Fragmenten resultiert. Durch das vorliegende 6-Ringsystem sind die entstehenden Fragmente besser stabilisiert und die Fragmentierung findet bevorzugt dort statt. Eine Verschiebung dieser Art ist ein Zeichen für ein Spirolid mit einer Spirolid G ähnlichen Grundstruktur.

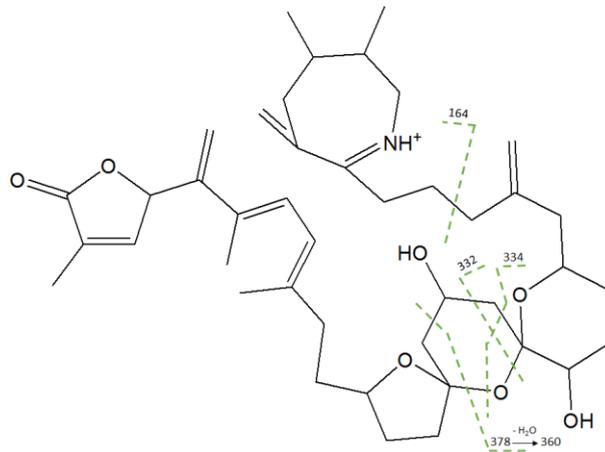


Abbildung 22: Fragmentierungsschema für die mittleren Fragmente von Spirolid G, analog zu Aasen et al., 2005, Abbildung 5

Eine weitere bekannte Grundstruktur ist die von Spirolid H und I, welche sich lediglich durch eine Doppelbindung zwischen C(2) und C(3) unterscheiden. Sie weisen durch ihr dispiroketal Ringsystem ebenfalls ein anderes CID-Spektrum auf. Der Unterschied liegt im Vergleich zu SPX1 ebenfalls im mittleren Fragmententeil, welcher durch das Ringsystem geprägt wird.

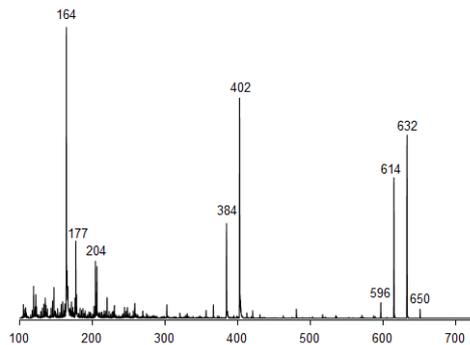


Abbildung 23: CID-Spektrum von Spirolid H, detektiert in AOSH 2, Kanada, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS

Das Fragmentierungsschema läuft analog zu SPX 1 ab, allerdings ist das Fragment - resultierend aus der Abspaltung der Seitenkette mit dem Ketofuranylring - durch das Fehlen des dritten Ringes verkleinert. Ein mittlerer Part in dieser Größenordnung mit einer Wasserabspaltung ist ein klares Anzeichen für ein Strukturanalogon von Spirolid H und I.

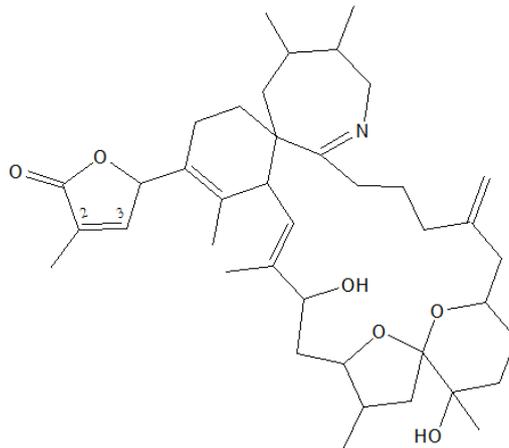


Abbildung 24: Struktur von Spirolid H

Über einen Vergleich der CID-Spektren und die Kenntnis der Struktur der jeweiligen Fragmente können Rückschlüsse auf die Struktur von bisher unbekanntem Spiroliden gezogen werden.

Strukturelle Charakterisierung der Spirolide:

m/z 722 in Stamm AOSH 2, Kanada:

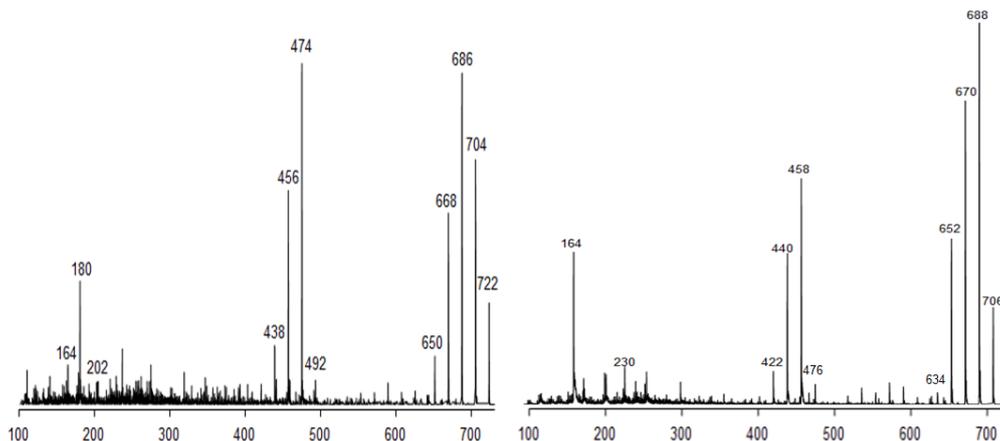


Abbildung 25: links: CID-Spektrum von m/z 722 in AOSH 2; Kanada, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS rechts: Vergleichsspektrum von Spirolid C in AOSH 2, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS

Ausgehend vom Molekülpeak m/z 722 gehen vier Wasserabspaltungen (m/z 704, 686, 668 und 650) aus. Das entspricht der gleichen Anzahl an Wasserabspaltungen, die bei Spirolid C auftreten (vgl. Abb. 25 rechts). Bei diesem Spirolid handelt es sich um ein Spirolid des C-Typs, dies ist an der charakteristischen Abspaltung des Fragments 248 Da zu erkennen (Übergang m/z 722 > 474). Somit entspricht der Molekülteil von C(1)-C(11) dem von Spirolid C. Der mittlere Teil des CID-Spektrums entspricht formal dem von Spirolid C, es liegen drei Wasserabspaltungen vor (m/z 474, 456 und 438). Die in Spirolid C vorliegenden Fragmente sind um 16 Da niedriger als die in dem bisher unbekanntem Spirolid detektierten Fragmente. Eine Massendifferenz von 16 Da kann mit einer Hydroxylierung erklärt werden. An welcher Position diese vorliegt, kann durch das Fragment m/z 180 erklärt werden. Das Fragment m/z 180 entspricht dem Fragment m/z 164 in Spirolid C mit einer Hydroxylierung an C(27).

Diese Struktur wurden von Sleno et al., (2004) aufgeklärt (vgl. Abb. 20 c). Bei dem bisher unbekanntem Spirolid handelt es sich demnach höchst wahrscheinlich um **27-hydroxy Spirolid C**.

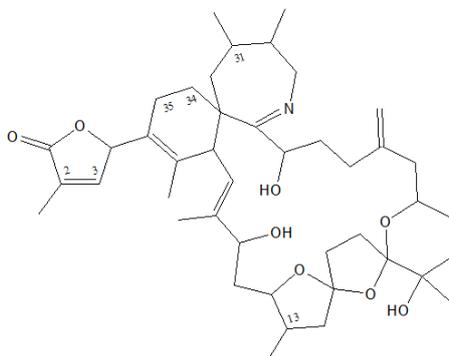


Abbildung 26: Strukturvorschlag für m/z 722 in Stamm AOSH 2, Kanada, 27-hydroxy Spirolid C

m/z 696 in Stamm NX 56-07, Norwegen:

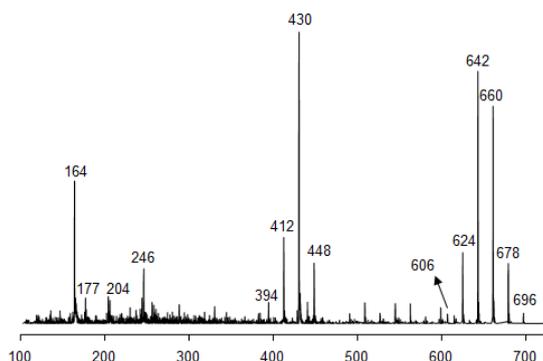


Abbildung 27: CID-Spektrum von m/z 696 in Stamm NX 56-07, Norwegen, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS

Ausgehend vom Molekülpeak gehen fünf Wasserabspaltungen (m/z 678, 660, 642, 624 und 606) aus, dies ist ein Zeichen für eine weitere Hydroxygruppe im Molekül, im Vergleich zu SPX 1 (Abb. 18). Die für die meisten Spirolide charakteristische Abspaltung des Fragments 248 Da tritt nicht auf, aber stattdessen wird ein Fragment mit 266 Da abgespalten (Übergang m/z 696 > 448). Die zu 248 Da resultierende Differenz beträgt 18 Da. Eine Massendifferenz von 18 Da kann mit einer Hydroxylierung bei gleichzeitiger Reduzierung einer Doppelbindung erklärt werden. Da das Fragment mit 266 Da dem Molekülteil C(1)-C(11) von SPX-1 mit einem zusätzlichen Sauerstoff und zwei zusätzlichen Wasserstoffatomen entspricht, ist es wahrscheinlich, dass in dieser Verbindung im Vergleich zu SPX-1 sowohl eine Hydrierung einer Doppelbindung als auch eine Hydroxylierung in diesem Molekülteil vorliegen. In dem Molekülteil C(1)-C(11) weist SPX-1 (Abb. 18) zwei Doppelbindungen auf, nämlich an Position C(2/3) und an Position C(7/8). Welche dieser beiden Positionen hydriert ist, ist mit Massenspektrometrie nicht zu bestimmen, da zwischen C(1) und C(11) keine weiteren Fragmentierungen auftreten, die Rückschlüsse auf die Lage der Hydrierung zulassen könnten. Da die Massendifferenz zu SPX-1 lediglich 4 Da beträgt ist es wahrscheinlich, dass in der Verbindung zusätzlich eine Demethylierung vorliegt. Diese ist für Position C(19) am wahrscheinlichsten, da an dieser Position in anderen bereits bekannten Spiroliden wie

13,19-didesMe Spirolid C eine Demethylierung vorliegt. Des Weiteren muss die Methylierung im trispiroketal Ringsystem stattgefunden haben, da die charakteristischen kleinen Fragmente ausgehend von der Cycloimineinheit mit unterschiedlich langen Seitenketten (m/z 164, 177 und 204) detektiert werden konnten. Dadurch ist klar, dass die Struktur von C(24)-C(34) der von SPX-1 entspricht. Das ebenfalls detektierte Fragment m/z 246 entspricht dem in SPX-1 vorliegenden Fragment m/z 230. Die aus den beiden Fragmenten resultierende Massendifferenz beträgt 16 Da. Eine Massendifferenz von 16 Da kann durch eine Hydroxylierung erklärt werden. Das Fragmentierungsmuster des Fragments m/z 230 wurden bereits von (Sleno et al., 2004) aufgeklärt (vgl. Abb. 19). Durch das Fragment m/z 204 ist bekannt, dass die Struktur bis C(24) der von SPX-1 entspricht. Daraus folgt, dass die Hydroxylierung mit hoher Wahrscheinlichkeit zwischen C(20) und C(24) vorliegt. Eine Hydroxylierung am Ringsystem würde die Stabilität des Ringsystems beeinflussen und weitere Fragmentierungen im Ringsystem hervorrufen, aber dies ist nicht der Fall. Das Fragment m/z 246 kann am ehesten durch die Hydroxylierung der Methylengruppe an C(24) zusammen mit einer Verschiebung der Doppelbindung an eine Nachbarposition erklärt werden. Die Addition einer weiteren Hydroxygruppe würde die detektierte m/z 696 des Spirolids überschreiten, daher ist es sehr wahrscheinlich, dass stattdessen eine Verschiebung der Hydroxygruppe von Position C(19) auf C(41) stattgefunden hat. Durch die wesentlichen strukturellen Veränderungen und die Hydrierung von zwei Doppelbindungen, welche in der bisherigen Nomenklatur der Cycloimine, in der Weise beachtet wurde, dass eine neue Grundstruktur definiert wurde (vgl. Abb. 2), wird dieses Spirolid in Fortsetzung der bisher durchgeführten Nomenklatur (SPX A-I), unter Auslassung des Buchstabens J, als **Spirolid K** bezeichnet (Die Bezeichnung Spirolid J könnte zu Verwechslung mit Spirolid I, durch ähnliche Schreibweisen führen).

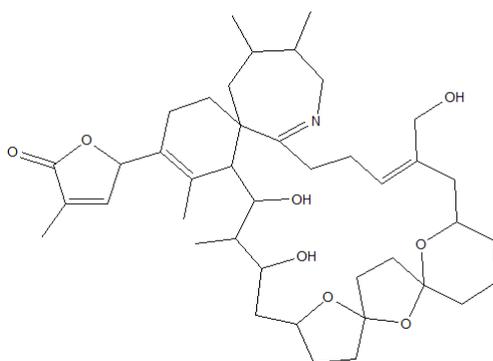


Abbildung 28: Strukturvorschlag für m/z 696 in Stamm NX 56-07, Norwegen, Spirolid K

m/z = 678 in Stamm H2-A4, Argentinien:

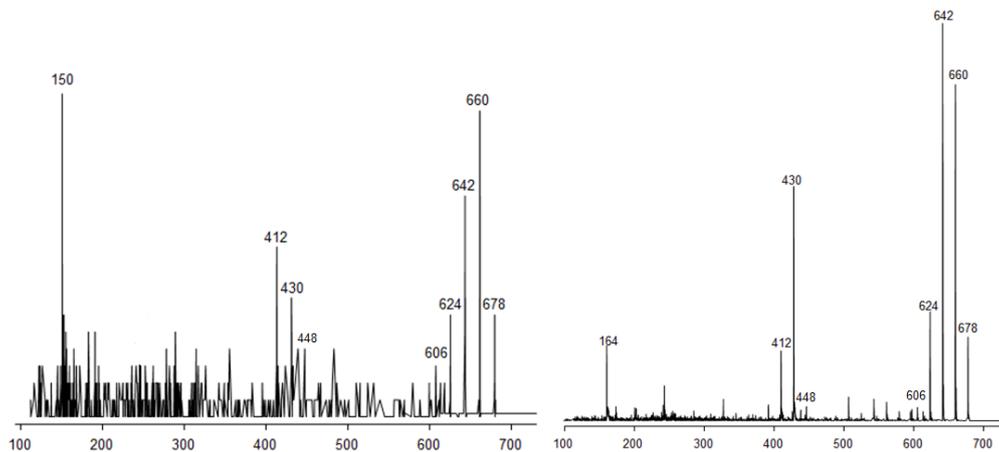


Abbildung 29: links: CID-Spektrum von m/z 678 in H2-A4, Argentinien, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS; rechts: CID-Spektrum von 13,19-didesmethyl-Spirolid C in NX 56-07, Norwegen, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS

Bei dem Vergleich der beiden Spektren ist zu erkennen, dass sie sich lediglich um das charakteristische kleinste Cycloiminfragment m/z 150 in dem bisher unbekanntem Spirolid zu m/z 164 in 13,19-didesmethyl Spirolid C (Abb. 29 rechts) unterscheiden. Ausgehend vom Molekülpeak finden in beiden Molekülen vier Wasserabspaltungen statt (m/z 660, 642, 624 und 606). Die charakteristische Abspaltung des Fragments 248 Da, welches für ein Spirolid des C-Typs spricht tritt ebenfalls auf (Übergang m/z 678 > 430). Das Fragment m/z 150 welches in dem bisher unbekanntem Spirolid vorliegt, wurde von Hu et al., (2001) beschrieben. Es kann durch eine Desmethylierung an Position C(31) erklärt werden (vgl. Abb. 20 b). Da die Molekülmassen der beiden Verbindungen sich nicht unterscheiden, ist es wahrscheinlich, dass für die zusätzliche Demethylierung an C(31) eine zusätzliche Methylgruppe an C(13) oder C(19) vorliegt. Welche dieser beiden Positionen methyliert ist, ist durch Massenspektrometrie nicht aufzuklären, da im trispiroketal Ringsystem keine weiteren Fragmentierungen auftreten, mit denen die beiden Positionen voneinander differenziert werden könnten. Bei der Substanz handelt es sich demnach mit großer Wahrscheinlichkeit um **13/19, 31-didesmethyl Spirolid C**

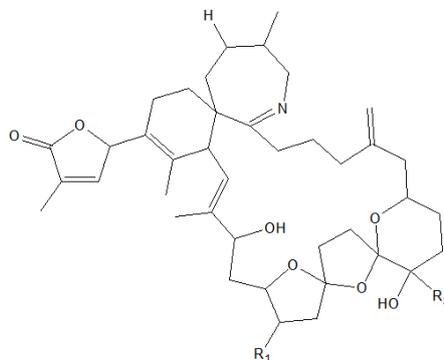


Abbildung 30: Strukturvorschlag für m/z 678 in Stamm H2-A4, Argentinien, Für R1 und R2 gilt hier jeweils H oder CH₃

m/z 666 in Stamm NX 56-10, Norwegen:

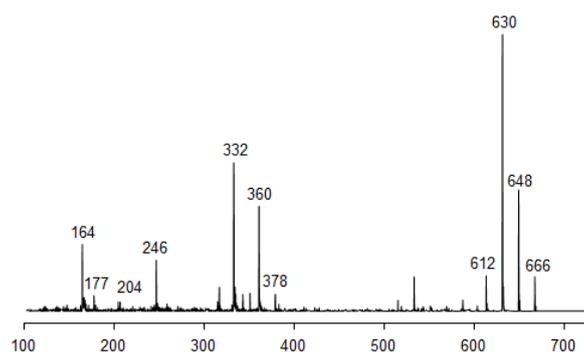


Abbildung 31: CID-Spektrum von m/z 666 in Stamm NX 56-10, Norwegen, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS

Das mittlere Fragmentmuster entspricht dem von Spirolid G (vgl. Abb. 22). In diesem Toxin liegt somit ein 6:6:5 trispiroketal Ringsystem vor. Es handelt sich bei dem bisher unbekanntem Spirolid demnach um ein kleineres Toxin des G-Typs. Ausgehend vom Molekülpeak erfolgen wie bei Spirolid G drei Wasserabspaltungen (m/z 648, 630 und 612). Der mittlere Teil des CID-Spektrums ist gleich. Daraus folgt, dass keine strukturellen Unterschiede im trispiroketal Ringsystem im Vergleich zu Spirolid G vorliegen. Die Massendifferenz zwischen dem bisher unbekanntem Spirolid und Spirolid G beträgt 26 Da, dies kann durch die Reduzierung um eine Ethyleneinheit erklärt werden. Unter Berücksichtigung, dass die charakteristischen kleinen Cycloiminfragmente (m/z 164, 177, 204) vorliegen, kann angenommen werden, dass die Struktur des bisher unbekanntem Spirolids von Position C(25) bis einschließlich der Cycloimineinheit der von Spirolid G (vgl. Abb. 22) entspricht. Durch die Kenntnis, dass das CID-Spektrum im mittleren Teil gleich ist, kann das trispiroketal Ringsystem für die Änderung der Struktur ausgeschlossen werden. Daher muss die strukturelle Änderung an der linken Seite des Moleküls zwischen Position C(1)-C(11) vorliegen. Eine Ethyleneinheit liegt bei Position C(7/8) vor. Sind C(7) und C(8) in dieser Struktur nicht vorhanden, kann das m/z von 666 erklärt werden. Ein weiterer Unterschied ist das Auftreten des Fragments m/z 246, welches durch die Verschiebung einer Hydroxygruppe von C(20) auf C(41) inklusive einer Verschiebung der dort vorliegenden Doppelbindung zu einem der nächstgelegenen C-Atome in Position C(23) oder C(25) erklärt werden kann. Das Fragment m/z 246 liegt ebenfalls in dem in dieser Arbeit detektierten Spirolid K (vgl. Abb. 28) vor. Durch die wesentlichen strukturellen Änderungen und insbesondere durch die veränderte Struktur, welche sich durch die Reduzierung der Ethyleneinheit an Position C(7/8) ergibt, wird für dieses Spirolid eine neue Grundstruktur postuliert. Dieses Spirolid wird analog zum bisherigen Nomenklatur als **Spirolid L** bezeichnet.

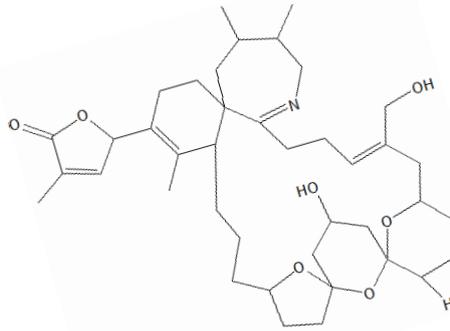


Abbildung 32: Strukturvorschlag für m/z 666 in Stamm NX 56-10, Norwegen, Spirolid L

m/z 666 in Stamm AOSH 2, Kanada:

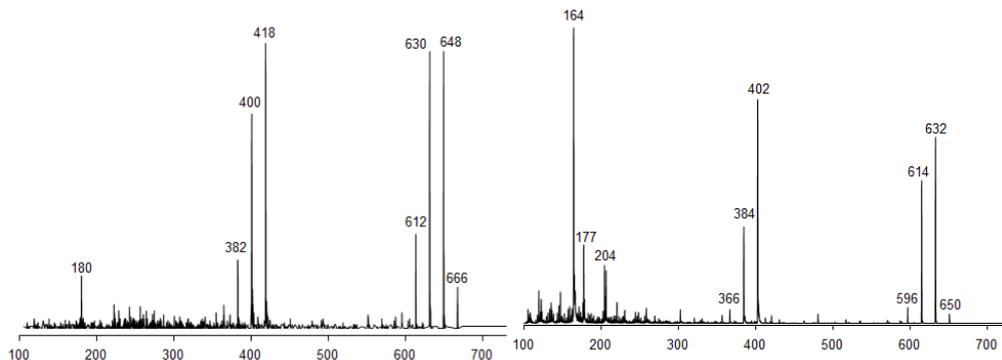


Abbildung 33: links: CID-Spektrum von 666 in Stamm AOSH 2, Kanada, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS; rechts: CID-Spektrum Spirolid H detektiert in AOSH 2, Kanada, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS

Dieses Toxin weist das gleiche Masse- zu Ladungsverhältnis (m/z 666), welches zuvor in dem Stamm aus Norwegen beschrieben wurde, auf. Es handelt sich hierbei allerdings um ein eigenständiges Toxin mit einer anderen Struktur, da die CID-Spektren unterschiedlich sind (vgl. Abb. 31). Dies ist im Wesentlichen an dem mittleren Part zu erkennen, bei dem Spirolid in Norwegen handelt es sich um ein Spirolid des G-Typs (vgl. Abb. 31), während es sich bei m/z 666 aus dem kanadischen Stamm um ein Spirolid analog zu Spirolid H handelt. Ausgehend vom Molekülpeak finden drei Wasserabspaltungen statt (m/z 648, 630 und 612). Das Spektrum des bisher unbekanntes Spirolids entspricht dem CID-Spektrum von Spirolid H, mit dem Unterschied, dass alle detektierten Fragmente um 16 Da erhöht sind. Eine Massendifferenz von 16 Da kann durch eine Hydroxylierung erklärt werden. An welcher Position diese Hydroxylierung im Vergleich zu Spirolid H stattgefunden hat, kann durch das Fragment m/z 180 welches von Sleno et al., (2004) aufgeklärt wurde (vgl. Abb. 20 c), bestimmt werden. Bei dem Fragment m/z 180 liegt an Position C(27) eine Hydroxylierung vor. Somit handelt es sich bei dem bisher unbekanntes Spirolid mit großer Wahrscheinlichkeit um **27-hydroxy Spirolid H**.

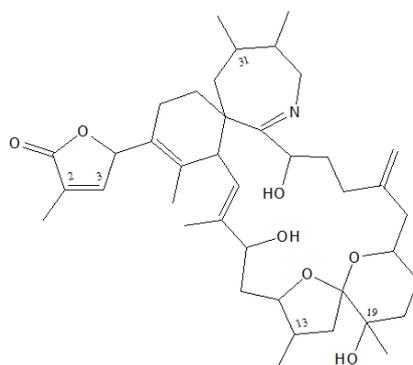


Abbildung 34: Strukturvorschlag für m/z 666 in Stamm AOSH 2, Kanada, 27-hydroxy Spirolid H

m/z 592 in Stamm H1-G8, Argentinien:

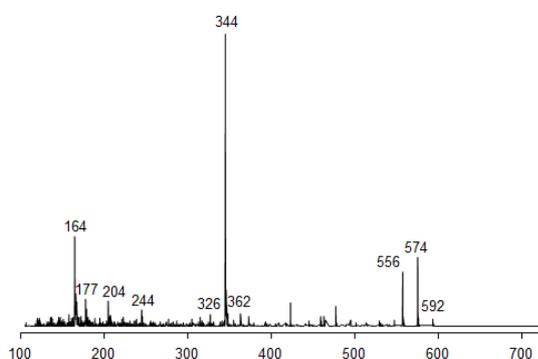


Abbildung 35: CID-Spektrum von m/z 592 in Stamm H1-G8, Argentinien, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS

Mit der geladenen Molekülmasse $[M+H]^+$ von 592 handelt es sich um das kleinste bisher in der Literatur veröffentlichte Spirolid. Die Differenz zu dem nächst größeren bekannten Spirolid (Spirolid H, m/z 650 (vgl. Abb. 23,24)) beträgt 58 Da. Anders als in dem CID-Spektrum von Spirolid H sind - ausgehend vom Molekülpeak - zwei Wasserabspaltungen anstelle von drei Wasserabspaltungen vorhanden (m/z 574 und 556.) Das bisher unbekannte Spirolid weist die typische Abspaltung von 248 Da (Übergang m/z 592 > 344) auf. Daraus ist zu erkennen, dass die Struktur von C(1)-C(11) der von Spirolid H entspricht. Zusätzlich weist das Spektrum die charakteristischen kleinen Fragmente der Cycloimineinheit auf (m/z 164, 177 und 204). An dem Fragment m/z 204 ist zu erkennen, dass sich die Struktur ausgehend vom Cycloiminring bis hin zu Position C(21) nicht von der von Spirolid H unterscheidet da der Bindungsbruch für dieses Fragment zwischen C(21) und C(22) erfolgt (vgl. Abb. 19). Das in der bisher unbekanntem Verbindung auftretende Fragment m/z 244 entspricht dem Fragment m/z 230, mit einer Massendifferenz von 14 Da. Eine Massendifferenz von 14 Da kann durch eine Methylierung erklärt werden. Das Fragment m/z 244 kann durch eine Methylierung an C(22) dargestellt werden. Durch die zusätzlich vorhandene Methylgruppe verringert sich die Massendifferenz zu Spirolid H auf 44 Da. Da bei Spirolid H ein dispiroketal Ringsystem, im Vergleich zu dem ansonsten vorliegenden trispiroketal Ringsystem von Spiroliden des C- und G-Typs vorliegt, besteht die Möglichkeit eines 6-gliedrigen Monozyklus. Durch die Postulierung eines Monozyklus kann die vorliegende Massendifferenz von 44 Da erklärt werden.

Bisher ist die Nomenklatur der Spirolide in der Art und Weise erfolgt, dass, sobald Veränderungen in der Struktur des trispiroketal Ringsystems auftraten, eine neue Grundstruktur eingeführt wurde. Die Bezeichnung für dieses Spirolid erfolgt demnach zu **Spirolid M**.

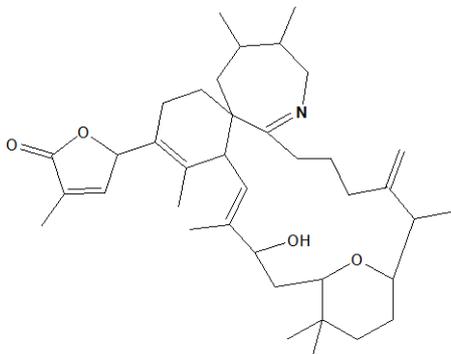


Abbildung 36: Strukturvorschlag für m/z 592 in Stamm H1-G8, Argentinien, Spirolid M

Insgesamt konnten in den untersuchten Stämmen zwei bisher unbekannte Gymnodimine des A-Typs detektiert werden.

Von den Spiroliden wurde eine größere Anzahl bisher unbekannter Verbindungen detektiert. Insgesamt konnte für sechs Verbindungen ein Strukturvorschlag gemacht werden. Dabei handelt es sich nicht nur um Modifikationen des C-Typs, für den bisher die meisten Modifikationen in der Literatur veröffentlicht sind, sondern ebenfalls um Modifikationen der Grundstruktur des G- und des H-Typs. Zusätzlich wurde ein Spirolid detektiert, welches mit großer Wahrscheinlichkeit eine neue Grundstruktur mit einem monospiroketal Ringsystem darstellt, dieses wurde als Spirolid M bezeichnet.

Außerdem wurden neun weitere Verbindungen detektiert, welche durch den Vergleich der aufgenommenen CID-Spektren klar als Spirolide identifiziert werden konnten, jedoch keine Struktur mit ausreichender Gewissheit aufgeklärt werden konnte. Um eine Struktur für die weiteren Spirolide darzustellen und die Strukturvorschläge zu bestätigen, ist es notwendig, weitere Analysen mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) durchzuführen. Für diese Analyse ist es notwendig, größere Mengen Probenmaterial durch weitere Kultivierung der Isolate und anschließende präparativer HPLC zu gewinnen.

Spirolide, für die kein Strukturvorschlag mit ausreichender Gewissheit aufgeklärt werden konnte:

m/z 720 in Stamm AOSH 2, Kanada, Verbindung 1:

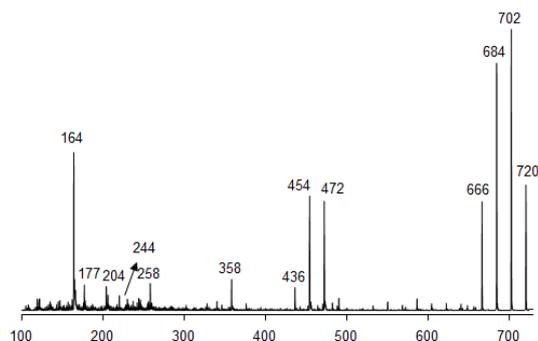


Abbildung 37: CID-Spektrum von m/z 720 in Stamm AOSH 2, Kanada, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS

Die Abspaltung von m/z 266 (Übergang m/z 720 > 454) kann durch eine Hydroxylierung in Verbindung mit einer Reduzierung einer Doppelbindung zwischen Position C(1)-C(11) erklärt werden. An welcher Position die Doppelbindung fehlt ist nicht klar zu bestimmen, da zwischen diesen beiden Positionen keine weitere Fragmentierung auftritt. An dem Fragment m/z 204 kann man erkennen, dass sich das detektierte Toxin ausgehend vom Cycloiminring bis zu Position C(24) nicht von der Struktur von SPX 1 unterscheidet (vgl. Abb. 19). Die beiden Fragmente m/z 244 und m/z 258 sprechen für eine doppelte Methylierung im Bereich des trispiroketal Ringsystems im Vergleich zu dem im CID-Spektrum von SPX 1 auftretenden Fragment m/z 230. Das Fragment m/z 358 weist eine Massendifferenz von 16 Da zu dem in SPX 1 auftretenden Fragment m/z 342 auf (vgl. Abb. 18). Diese Massendifferenz kann durch eine Hydroxylierung im trispiroketal Ringsystem erklärt werden. An welchen Positionen die jeweiligen Veränderungen auftreten, ist durch Massenspektrometrie nicht mit ausreichender Gewissheit zu bestimmen, da im Ringsystem zu wenig Fragmente, welche eine Differenzierung ermöglichen, gebildet werden. Bezeichnung: **Verbindung 1**.

m/z 720 in Stamm AOICW, Chile, Verbindung 2:

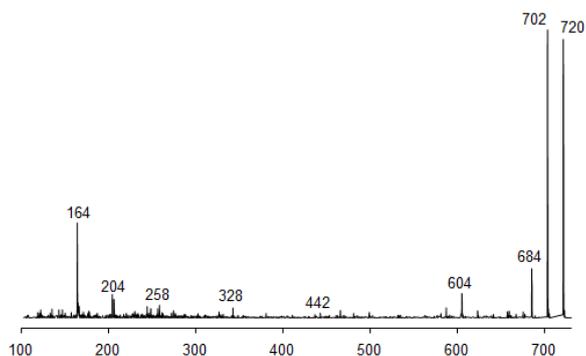


Abbildung 38: CID-Spektrum m/z 720 in Stamm AOICW, Chile, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS

An dem charakteristischen kleinsten Cycloiminfragment (m/z 164 und 204) sowie den Wasserabspaltungen ausgehend vom Molekülpeak (m/z 702 und 684) ist zu erkennen, dass es sich um ein Spirolid handelt. Eine Besonderheit bei diesem CID-Spektrum ist, dass es keine signifikanten Signale im mittleren Teil aufweist. Dies kann durch eine veränderte Struktur im Makrozyklus erklärt werden, durch die keine Fragmentierung mehr auftritt. Wie genau diese Veränderung vorliegt ist durch Massenspektrometrie nicht genau zu bestimmen. Ohne die Informationen, die aus den dort vorliegenden Fragmenten gewonnen werden können, ist es nicht möglich eine Struktur zu postulieren. Bezeichnung: **Verbindung 2**.

m/z 718 in Stamm H1-G8, Argentinien, Verbindung 3:

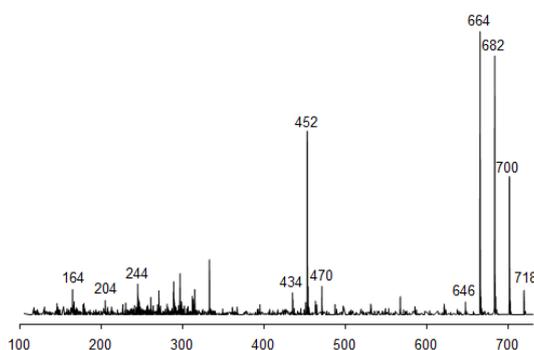


Abbildung 39: CID-Spektrum von m/z 718 in H1-G8, Argentinien, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS

Bei diesem Spirolid tritt eine Abspaltung ausgehend vom Molekülpeak von 266 Da auf (Übergang m/z 718 > 452). Diese Abspaltung wurde ebenfalls im CID-Spektrum von Spirolid K (vgl. Abb. 27) detektiert. Dieses Fragment kann durch eine Hydroxylierung verbunden mit einer Reduzierung einer Doppelbindung zwischen Position C(1)-C(11) erklärt werden. Die mittelgroßen Fragmente weichen um 8 Da von den vergleichbaren Massen aus dem CID-Spektrum von SPX 1 ab (vgl. Abb. 18). Eine Massendifferenz von 8 Da kann nicht ohne weiteres erklärt werden. Das Fragment m/z 244 kann durch eine Methylierung an Position C(23) erklärt werden. Die Molekülmasse resultierend aus den vorliegenden wahrscheinlichen Veränderungen liegt bei m/z 724, aber die daraus resultierende Massendifferenz von 12 Da kann mit Massenspektrometrie nicht mit ausreichender Gewissheit erklärt werden. Mit großer Wahrscheinlichkeit liegen weitere Unterschiede im trispiroketal Ringsystem vor. Bezeichnung: **Verbindung 3**.

m/z 718 in Stamm AOICW, Chile, Verbindung 4:

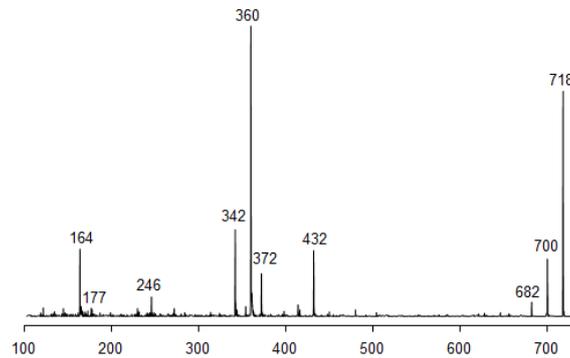


Abbildung 40: CID-Spektrum von m/z 718 in Stamm AOICW, Chile, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS

Die mittelgroßen Fragmente im Massenbereich um m/z 350 sind charakteristisch für ein Spirolid des G-Typs (vgl. Abb. 21). Die Massendifferenz zu Spirolid G beträgt 26 Da. Diese Differenz lässt sich formal durch eine zusätzlich vorliegende Ethyleneinheit erklären. An welcher Position diese vorliegen könnte, ist nicht klar zu bestimmen. Bei dem Peak m/z 360 handelt es sich im Vergleichsspektrum von Spirolid G um den Peak mit m/z 378. Das mittlere Fragmentmuster ist in diesem Toxin um 18 verringert. Diese Verschiebung kann formal durch eine Hydroxylierung und die Hydrierung einer Doppelbindung erklärt werden. Das Fragment m/z 246 kann durch eine Hydroxylierung der Methylengruppe in Position C(25) inklusive der Verschiebung der vorliegenden Doppelbindung in einer Nachbarposition erklärt werden. Unter Berücksichtigung dieser strukturellen Unterscheidung beträgt die verbleibende Massendifferenz zu Spirolid G m/z 692 noch 10 Da. Diese Massendifferenz ist ohne weitere Informationen nicht mittels Massenspektrometrie mit ausreichender Sicherheit zu erklären. Bezeichnung: **Verbindung 4**.

m/z 710 in Stamm H3_D4, Argentinien, Verbindung 5:

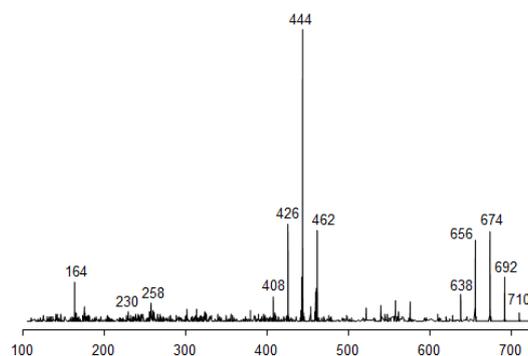


Abbildung 41: CID-Spektrum m/z 710 in Stamm H3_D4, Argentinien, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS

Bei dem Toxin mit der m/z 710 handelt es sich um ein Spirolid des C-Typs. Die charakteristische Abspaltung von 248 Da tritt nicht auf, sie ist um 18 Da erhöht.

Diese Abspaltung wurde ebenfalls im CID-Spektrum von Spirolid K (vgl. Abb. 27) detektiert. Es kann durch eine Hydroxylierung verbunden mit einer Reduzierung einer Doppelbindung zwischen Position C(1)-C(11) erklärt werden. Durch die strukturelle Änderung wäre die Molekülmasse von m/z 710 bereits erreicht. Allerdings ist ein weiterer Unterschied das Fragment m/z 258 vorhanden, dieser Fragment tritt ebenfalls im CID-Spektrum von 20-Me G auf (vgl. Abb. 21). Zur Erklärung dieses Fragments muss ein weiterer struktureller Unterschied zwischen C(19) und C(24) vorliegen. Die Massendifferenz zu dem Fragment m/z 230, welches im CID-Spektrum von SPX 1 vorliegt (vgl. Abb. 18) beträgt 28 Da. Diese Massendifferenz kann formal durch zwei Methylierungen erklärt werden. An welcher Position die strukturellen Änderungen stattgefunden haben (unter der Berücksichtigung, dass die detektierte Molekülmasse m/z 710 bereits durch die Unterscheidung zwischen C(1)-C(11) vorliegt), ist durch Massenspektrometrie nicht mit ausreichender Gewissheit aufzuklären. Bezeichnung: **Verbindung 5**.

m/z 692 in Stamm AOSH 2, Kanada, Verbindung 6:

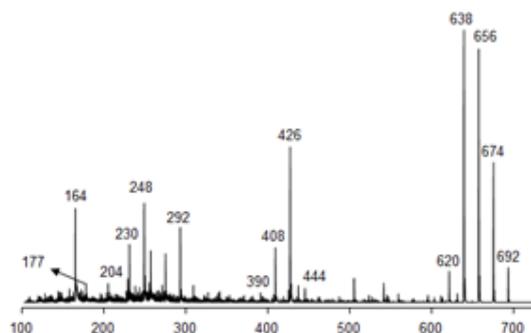


Abbildung 42: CID-Spektrum von m/z 692 in Stamm AOSH2, Kanada, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS

Dieses Spektrum weist Ähnlichkeiten mit dem Spektrum von SPX 1 (vgl. Abb. 18) auf. Der Unterschied liegt in der Abspaltung des Fragments 266 Da anstelle von 248 Da vor. Diese Abspaltung wurde ebenfalls im CID-Spektrum von Spirolid K (vgl. Abb. 27) detektiert. Es kann durch eine Hydroxylierung verbunden mit einer Reduzierung einer Doppelbindung zwischen Position C(1)-C(11) erklärt werden. Des Weiteren liegt das Fragment m/z 248 vor, welches durch eine Hydroxylierung an Position C(41) und eine Verschiebung der dort vorliegenden Doppelbindung an eine Nachbarposition erklärt werden kann. Da die Molekülmasse sich im Vergleich zu SPX 1 nicht ändert, müssen die hinzugefügten Hydroxygruppen an anderen Stellen des Moleküls entfernt werden. An welchen Positionen dies stattfindet, ist durch Massenspektrometrie nicht klar zu identifizieren. Bezeichnung: **Verbindung 6**.

m/z 618 in Stamm H1_G8, Argentinien, Verbindung 7:

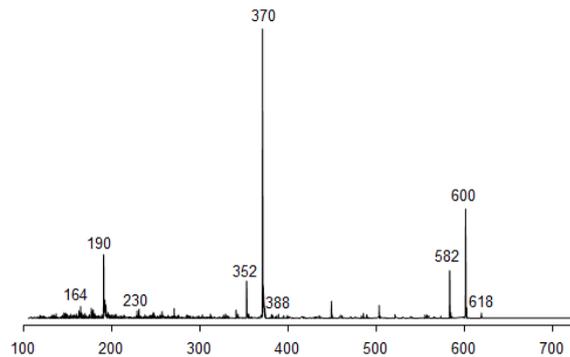


Abbildung 43: CID-Spektrum m/z 618 in Stamm H1_G8, Argentinien, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS

Die Massendifferenz zum nächsten bekannten Spirolid (Spirolid H) beträgt 32 Da. Ausgehend vom Molekülpeak finden analog zu Spirolid H zwei Wasserabspaltungen statt (m/z 600 und 582). Die charakteristische Abspaltung des Fragments 248 Da ist ebenfalls vorhanden (Übergang m/z 618 \rightarrow m/z 370). Daraus folgt, dass die Strukturen im Bereich von C(1) - C(11) identisch sind. Nach dieser Abspaltung findet eine Wasserabspaltung statt. Im Unterschied zu Spirolid H entsteht bei dieser Struktur ein Peak m/z 190. Dieses Fragment und der damit verbundene strukturelle Unterschied, ist ohne weitere Information nicht klar zu identifizieren. Bezeichnung: **Verbindung 7**.

m/z 658 in Stamm AOSH 2, Kanada, Verbindung 8 & 9:

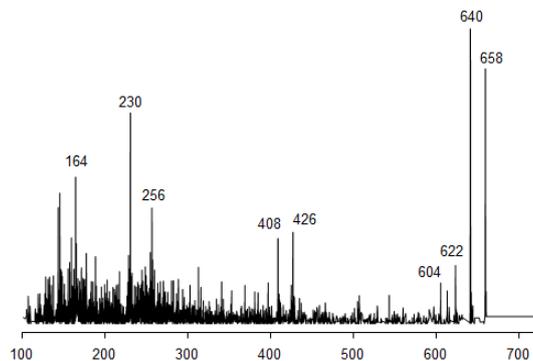


Abbildung 44: CID-Spektrum m/z 658 in Stamm AOSH 2, Kanada, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS

Bei dieser Verbindung handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ein Strukturanalogon zu Spirolid I, es findet, ausgehend vom Molekülpeak, eine Abspaltung von 250 Da statt (Übergang m/z 658 \rightarrow 408). Diese Abspaltung kann durch eine Hydrierung der Doppelbindung zwischen C(2/3) erklärt werden. Ein Unterschied besteht in dem Fragment m/z 256. Ein solches Fragment liegt im CID-Spektrum von Spirolid H (vgl. Abb. 23) nicht vor. Spirolid H und I unterscheiden sich lediglich durch die Doppelbindung zwischen C(2/3), daher kann das CID-Spektrum von Spirolid H als Vergleich verwendet werden. Die Massendifferenz zu Spirolid I beträgt 6 Da. Diese Massendifferenz sowie das Fragment m/z 256 sind nur mit den Informationen aus dem CID-Spektrum nicht mit ausreichender Wahrscheinlichkeit zu erklären. Bezeichnung: **Verbindung 8**.

Von dem gleichen Masse- zu Ladungsverhältnis m/z 658 wurde ein weiterer Peak im Precursor Scan von AOSH 2 detektiert. Dieser liegt bei einer anderen Retentionszeit vor und weist ein anderes CID-Spektrum auf, welches dem CID-Spektrum des Spirolids m/z 720 im Stamm AOICW, Chile (vgl. Abb. 39) in der Form ähnelt, dass beide Toxine keine Fragmente im mittleren Teil des CID-Spektrums aufweisen. Ohne die Information, die aus diesen Fragmenten gewonnen werden können, ist es nicht möglich, eine Aussage über die Struktur zu treffen. Bezeichnung: **Verbindung 9**.

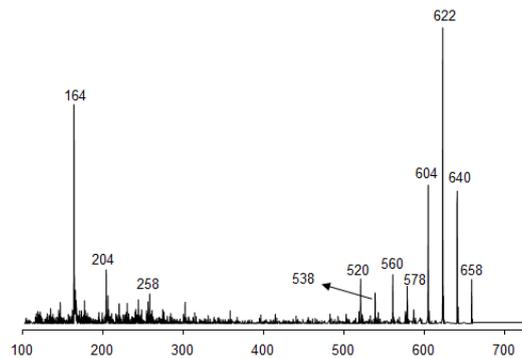


Abbildung 45: Abbildung 46: CID-Spektrum m/z 658 in Stamm AOSH 2, Kanada, aufgenommen mittels ESI HPLC-MS/MS

8.2 Qualitative Darstellung der Toxinprofile:

Anhand der Daten, welche in Tabelle Nr. 3 dargestellt sind, ist zu erkennen, dass das Toxinprofil von *A. ostensefeldii* sehr divers ist. Der Stamm aus Kanada AOSH 2, welcher stellvertretend für viele andere Stämme aus dem Nordatlantik steht, produziert lediglich Spirolide, alle anderen Stämme produzieren mindestens eine weitere Toxingruppe. Bei dem Stamm handelt es sich um einen marinen Vertreter, der aus einem System hoher Salinität isoliert wurde. Die dieser Arbeit zugrundeliegende Hypothese geht davon aus, dass Stämme aus Gebieten höherer Salinitäten nur eine Toxingruppe, die der Spirolide produzieren (vgl. Kapitel 4). Für den Stamm aus Kanada ist die Hypothese zutreffend. Im Kontrast dazu steht, dass die Stämme aus Argentinien, welche ebenfalls aus dem marinen offenen Schelfgebiet stammen, neben Spiroliden auch PSP-Toxine produzieren. Der chilenische Stamm AOICW wurde relativ dicht am Pazifik und somit aus einem Gebiet hoher Salinität isoliert und produziert wie die argentinischen Stämme neben Spirolide zusätzlich PSP-Toxine. Die Salinitäten an den drei verschiedenen Regionen lagen jeweils über 30.

Der zweite Stamm aus Chile AOA32-2 wurde aus dem weiter zurückliegenden Fjordsystem, in dem geringere Salinitäten vorherrschen (28), isoliert. Er weist jedoch das gleiche Profil wie der erste, marine Stamm aus Chile auf.

Die Hypothese, wonach Stämme aus Gebieten mit höheren Salinitäten nur Spirolide produzieren werden, kann somit nicht generell gültig sein und es sind vermutlich andere Faktoren an der Determination und Differenzierung des Toxinprofils beteiligt. Welche das sind, kann auf Grundlage der in dieser Arbeit ermittelten Daten nicht aufgeklärt werden.

Auch der zweite Teil der Hypothese, wonach *A. ostensefeldii* Stämme bei geringeren Salinitäten als im offenen Ozean generell ein diverseres Toxinprofil mit allen drei Toxingruppen ausbilden (vgl. Kapitel 4), kann auf Grundlage der Daten widerlegt werden. Lediglich der Stamm aus den Niederlanden OKNL 42 produziert Toxine aus allen drei Toxingruppen. Die Kulturen aus Norwegen produzieren Spirolide und Gymnodimine, dafür aber keine PSP-Toxine. Der zweite chilenische Stamm AOA32-2 aus dem Fjordsystem produziert im Vergleich dazu PSP-Toxine, aber keine Gymnodimine. Dies kann nicht ausschließlich durch die Salinität des Ursprungsortes erklärt werden, da die Salinitäten an den verschiedenen Regionen mit Ausnahme von der Osterschelde in den Niederlanden in einem ähnlichen Bereich liegen.

Ein Zusammenhang der Produktion von Gymnodiminen und PSP-Toxine konnte nicht festgestellt werden, da lediglich der Stamm OKNL 42 aus den Niederlanden beide Toxingruppen produziert. Die norwegischen Stämme produzieren Gymnodimine aber keine PSP-Toxine. Im Gegensatz dazu produzieren die untersuchten Stämme aus Chile und Argentinien PSP-Toxine aber keine Gymnodimine.

Bei einem Vergleich der ermittelten Profile lässt sich kein klares Muster erkennen, wovon die Produktion der Toxine abhängig gemacht werden könnte. Die Ausbildung des Toxinprofils von *A. ostensefeldii* ist somit deutlich komplexer als bisher vermutet (vgl. Kapitel 3.3) und erfordert weitere Forschungsarbeit.

Tabelle 3: Vergleichende qualitative Darstellung der detektierten Toxine, ND = nicht detektiert

Stamm	Salinität	Herkunft	PSP	SPX	GYM
AOSH2-2	> 30	Kanada	/	x	/
NX 56-07	21,1 - 33,3	Norwegen	/	x	x
NX 56-10	21,1 - 33,4	Norwegen	/	x	x
NX 56-12	21,1 - 33,5	Norwegen	/	x	x
ND	33,3	Nordsee*	/	x	/
ND	26,1	Limfjord DK*	/	x	x
ND	24,5	Kattegat*	/	x	/
OKNL 42	8 - 21	Niederlande [#]	x	x	x
AOICW	32,5	Chile	x	x	/
AOA32-2	28,2	Chile	x	x	/
H1-G8	33,6	Argentinien	x	x	/
H3-D4	33,6	Argentinien	x	x	/
H2-A4	33,6	Argentinien	x	x	/

*Die dargestellten Ergebnisse für die Uthörn Expedition sind nicht direkt mit den anderen dargestellten Ergebnissen zu vergleichen, da es sich bei den analysierten Proben um Plaktonmischproben handelt und nicht um ein Isolat eines Stammes von *A. ostenfeldii*.

[#]Die hier verwendeten Daten entstammen einem Manuskript in Arbeit, Helge Martens, AWI

8.3 Ergebnis der PSP-Toxin Analyse:

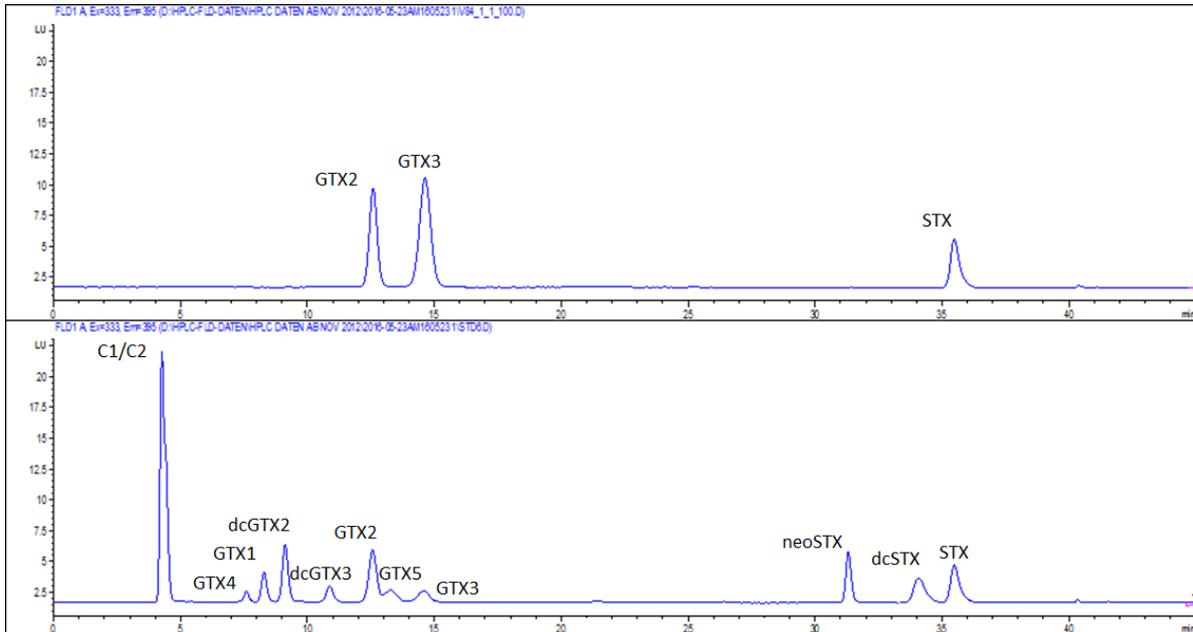


Abbildung 47: Darstellung des Chromatogramms des chilenischen *A. ostentfeldii* Stammes AOICW oben und unten das Chromatogramm des PSP-Mischstandards, aufgenommen mittels HPLC-FLD, Ionenpaarchromatographie

Innerhalb der jeweiligen Stämme konnten verschiedene PSP-Toxine identifiziert werden (vgl. Tab. 4). Gemeinsamkeit ist, dass alle untersuchten, PSP- produzierenden Stämme, GTX2/3 und STX bilden. Die Stämme aus den Niederlanden und Argentinien sind zudem in der Lage C1/C2 darzustellen. Als einziger Stamm in dieser Studie ist OKNL 42 in der Lage B1 zu produzieren. OKNL 42 weist somit das variantenreichste PSP-Profil auf. Des Weiteren variieren die pro Zelle berechneten Mengen der produzierten Toxine im Vergleich der Stämme aber ebenfalls innerhalb eines Stammes.

Tabelle 4: Vergleichende Darstellung der detektierten PSP-Toxine

Stamm	Salinität	Herkunft	PSP-Toxine / (pg/Zelle)					
			GTX2/3	STX	dcSTX	C1/C2	B1	Total
AOSH2-2	> 30	Kanada	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NX 56-07	21,1 - 33,3	Norwegen	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NX 56-10	21,1 - 33,4	Norwegen	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NX 56-12	21,1 - 33,5	Norwegen	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Netzzug	33,3	Nordsee*	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Netzzug	26,1	Limfjord DK*	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Netzzug	24,46	Kattegat*	ND	ND	ND	ND	ND	ND
OKNL 42	10	Niederlande	4,44	1,38	ND	34,36	0,27	40,45
AOICW	32,5	Chile	27,74	6,60	ND	ND	ND	34,34
AOA32-2	28,2	Chile ⁺	97,36 ± 66,38	8,04 ± 5,48	0,53 ± 0,36	ND	ND	105,83 ± 72,15
H1-G8	33,64	Argentinien	1,43	ND	ND	0,38	ND	1,80
H3-D4	33,64	Argentinien	3,72	0,22	ND	1,56	ND	5,50
H2-A4	33,64	Argentinien	4,18	0,06	ND	ND	ND	4,24

*Anmerkung: Die dargestellten Ergebnisse für die Uthörn Expedition sind nicht mit den anderen dargestellten Ergebnissen zu vergleichen, da es sich bei den analysierten Proben um Plaktonmischproben handelt und nicht um ein Isolat eines Stammes von *A. ostenfeldii*.

#Die hier verwendeten Daten entstammen einem Manuskript in Arbeit, Helge Martens, AWI

⁺ Die verwendeten Daten entstammen der Analyse von Salgado et al., 2015

8.4 Ergebnis der Uthörn Expedition:

In den Planktonproben der Uthörn Expedition wurden für alle drei geographischen Regionen keine PSP-Toxine in den Proben detektiert. Dieses Ergebnis stimmt nicht mit den bisher bekannten Ergebnissen der Kulturen, in Bezug auf den Limfjord, überein (vgl. Kapitel 3.3.) Das Fehlen von PSP-Toxinen in den Limfjord Feldproben könnte darauf zurückzuführen sein, dass Planktonextrakte aus Netzzügen (Mischproben aller Planktonalgen) analysiert wurden und dies ein Faktor für eine zu geringe Konzentration von *A. ostentfeldii* Zellen gewesen sein könnte. Ein weiteres Indiz für eine geringe Konzentration von *A. ostentfeldii* Zellen ist, dass aus den genommen Lebendproben, für die Isolation der vorliegenden *A. ostentfeldii* nur in einer Station entsprechende Zellen isoliert werden konnten. Das Vorhandensein von *A. ostentfeldii* wird durch die detektierten Spirolide bestätigt, da *A. ostentfeldii* als einziger bisher bekannter Produzent gilt.

In der Nordsee setzt sich das Profil im Wesentlichen aus SPX 1 und 20-methyl G zusammen. Dominiert wird das Profil von 20-methyl G. Gymnodimine wurden keine detektiert. Die größte Menge mit 1677 pg/m Netzzug konnte in Station 13 in der Nähe zum Limfjord detektiert werden. Das detektierte Profil stimmt mit dem für die Nordsee bekannten Profil überein. (Krock et al., 2008)

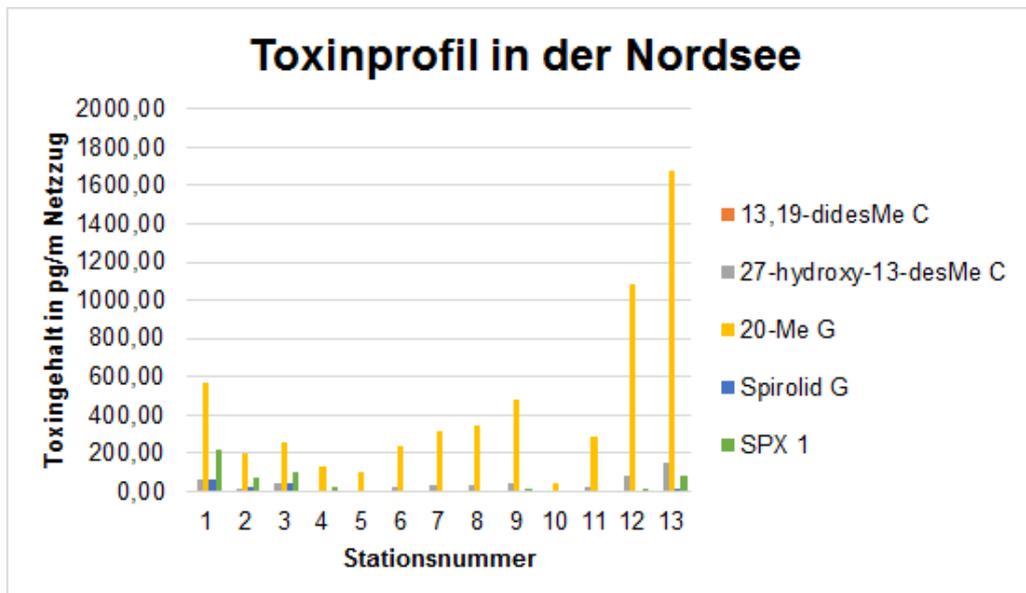


Abbildung 48: Darstellung des Cycloiminprofils in der Nordsee

Das Toxinprofil im Limfjord ist deutlich variabler als das in der Nordsee detektierte Profil. Es konnten sieben verschiedene Toxine detektiert werden, darunter zwei Gymnodimine. Bei einem handelt es sich um ein bisher unbekanntes Gymnodimin, mit dem Masse- zu Ladungsverhältnis m/z 510, welches aus Zeitgründen nicht weiter untersucht werden konnte. Bei dem zweiten Gymnodimin handelt es sich um Gymnodimin A. Dies ist der erste Befund von Gymnodiminen im Limfjord. Das Profil der Spirolide wird durch Spirolid G und SPX 1 dominiert. Dieser Befund deckt sich mit dem bisherigen Ergebnis von Kulturen aus dem Limfjord (vgl. Kapitel 3.3). Die Stationen mit den größten Mengen an detektierten Toxinen sind Station 17, 19 und 27, die dort detektierte Menge von Spirolid G liegt für Station 17 bei 6047 pg/m Netzzug, für Station 19 bei 3023 pg/m Netzzug und für Station 27 bei 2490 pg/m Netzzug. Die Salinitäten in diesen drei Station lagen im Bereich von 17,9 - 25,2.

Das in der Nordsee dominant vorliegende Spirolid 20-Me G tritt ebenfalls in den ersten Stationen innerhalb des Limfjord auf, nimmt dann aber immer mehr ab, bis es gar nicht mehr detektiert werden konnte. Das hat zur Schlussfolgerung, dass die Population aus der Nordsee in den Limfjord eindringen, sich dort aber nicht etablieren können. Die Populationen aus dem Limfjord scheinen dominanter zu sein. Die genaue Ursache ist auf Grundlage dieser Daten nicht zu ermitteln und bedarf weiterer Forschungsarbeit.

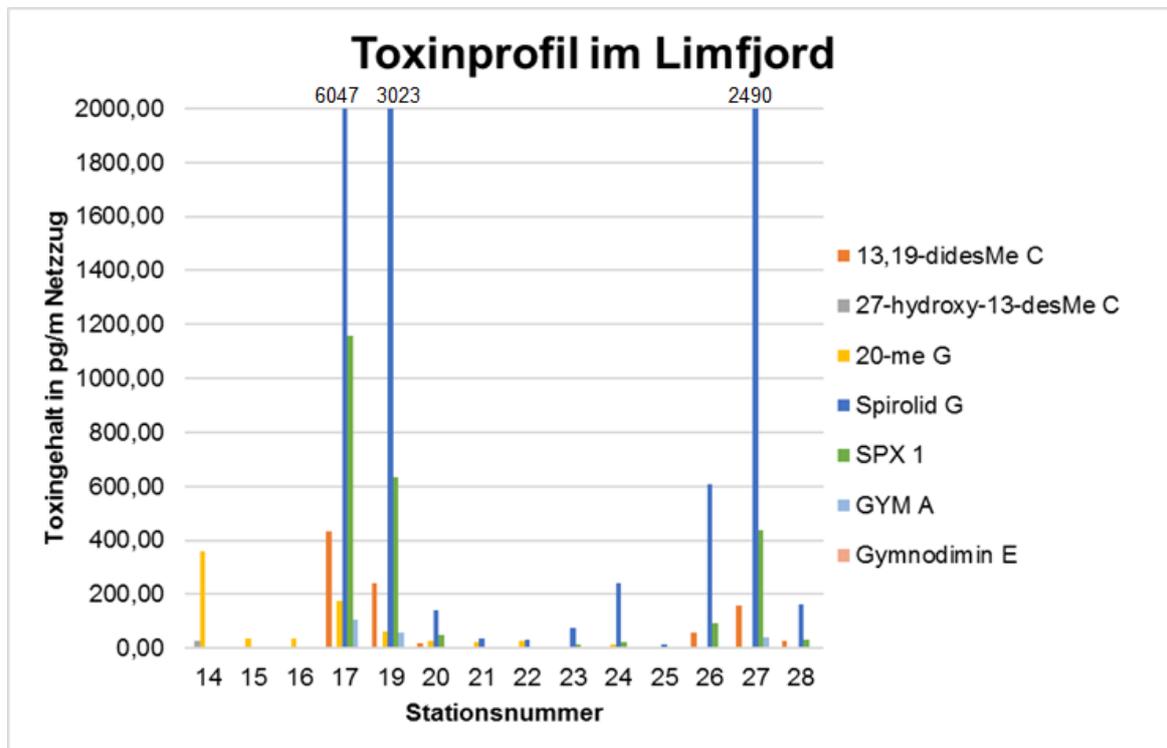


Abbildung 49: Darstellung des Cycloiminprofils im Limfjord, Dänemark

Im Kattegat wurde der geringste Gehalte an Cycloimininen detektiert. Das Profil wird wie das Profil in der Nordsee durch 20-Me G dominiert. Das detektierte Toxinprofil unterscheidet sich nicht wesentlich von dem in der Nordsee festgestellten Profil. Das Toxinprofil der Populationen im Kattegat innerhalb des Ostseetransseks weist trotz relativ geringer Salinität ein für einen marinen Stamm angenommenes Toxinprofil auf. Somit weisen die *A. ostenfeldii* Populationen aus Nordsee und dem Kattegat trotz der unterschiedlichen Salinitäten ein ähnliches Toxinprofil auf. Die Nordsee ist saliner als der Kattegat. Dieser Befund widerspricht der für diese Arbeit zugrundeliegende Hypothese (vgl. Kapitel 4). Danach müssten für die drei Regionen unterschiedliche Profile vorliegen und Populationen aus dem Kattegat eventuell Ähnlichkeiten mit den Populationen aus dem Limfjord aufweisen.

Der Limfjord liegt mit einer durchschnittlichen Salinität von 26,1 zwischen den der Nordsee (33,3) und dem Kattegat (24,5). Dennoch gleichen sich die Toxinprofile in Kattegat und der Nordsee und die Populationen aus dem Limfjord weisen ein anderes Toxinprofil auf. Dies widerlegt ebenfalls die zugrundeliegende Hypothese der Salinitätsabhängigkeit von Toxinprofilen.

Für die Station 33 wurden zudem Spuren von GYM A detektiert, ob dies auf *A. ostenfeldii* zurückgeführt werden kann, ist durch die Mischprobe nicht klar zu definieren.

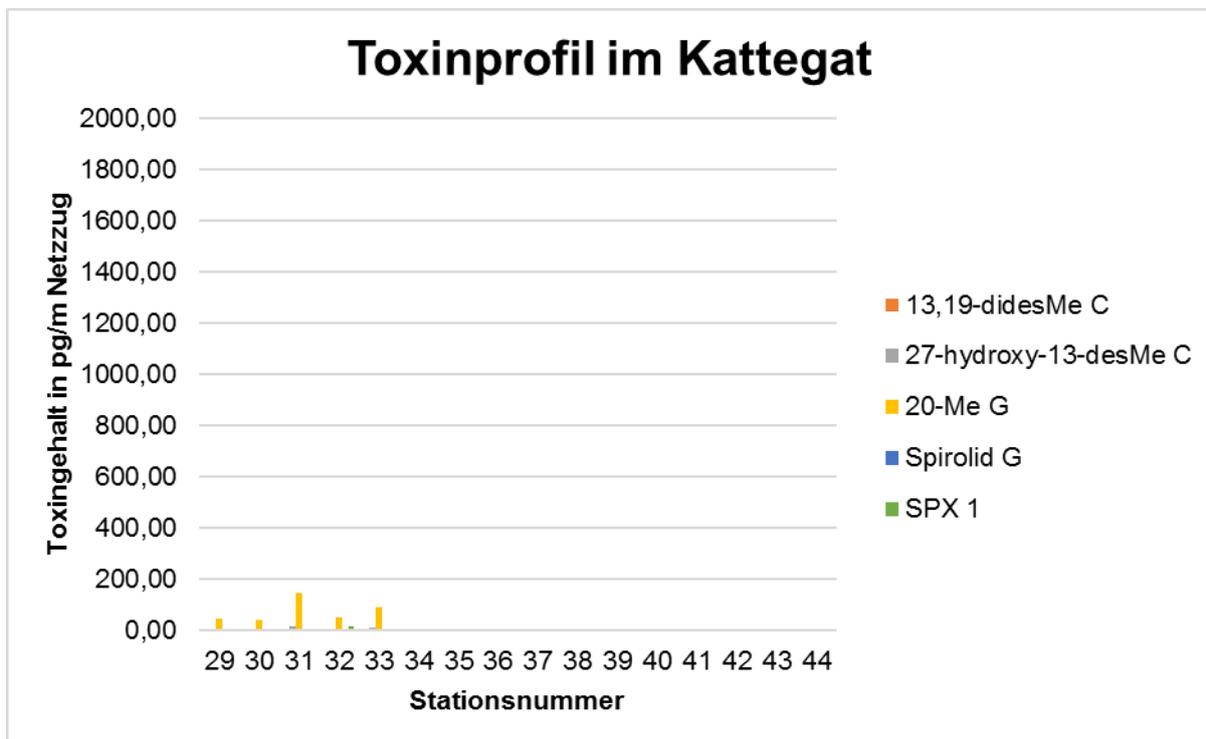


Abbildung 50: Darstellung des Cycloiminprofils im Kattegat

8.5 Ergebnis der Cycloimin-Toxin Analyse, der kultivierten Stämme:

Ergebnis der Gymnodimin-Analyse:

Gymnodimine konnten lediglich in den Kulturen aus Norwegen und der Niederlande detektiert werden. Das Profil unterscheidet sich innerhalb der geographischen Regionen sowie in den Stämmen voneinander. Das Profil von OKNL 42 wird von Gymnodimin Verbindung 6* dominiert, hierbei handelt es sich um ein bisher unbekanntes Gymnodimin, für das noch keine Struktur mit ausreichender Gewissheit postuliert werden konnte. (Manuskript in Arbeit, Helge Martens, AWI) Mit 226 pg/Zelle ist es der größte Gehalt an Cycloimin, der in dieser Arbeit gemessen wurde. Das Profil der norwegischen Stämme wird von 15-desmethyl Gymnodimin A dominiert. Gemeinsamkeiten sind in der Produktion von Gymnodimin A zwischen dem niederländischen Stamm OKNL 42 und NX 56-07 festzustellen. Die weiteren Gymnodimine werden jeweils nur in der geographischen Region produziert. Die anderen beiden norwegischen Stämme (NX 56-10/12) produzieren nahezu ausschließlich 15-desmethyl Gymnodimin A. Es ist nicht bekannt, ob OKLN 42 zusätzlich 15-desmethyl Gymnodimin A oder Gymnodimin E produziert, da es aufgrund der geringen Probenmenge nicht möglich war, diese Toxine nachträglich nach ihrer Entdeckung in OKNL 42 zu analysieren, da zu dem Zeitpunkt die Probe bereits aufgebraucht war. Bei den Gymnodimin Verbindung 6* und Verbindung 7* handelt es sich um Strukturanaloga von Gymnodimin D, diese Gymnodimine waren Bestandteil der in dieser Studie verwendeten Analysenmethode (Vgl. Tab. Nr. 11, Anhang Nr. 2). (Manuskript in Arbeit, Helge Martens AWI) Die genaue Struktur dieser Toxine konnte auf Grundlage der massenspektroskopischen Daten nicht aufgeklärt werden. Die Verbindung m/z 510, welche in dem niederländischen Stamm detektiert werden konnte, unterscheidet sich von der Gymnodimin E (m/z 510) aus den norwegischen Stämmen (Vergleich der CID-Spektren).

Ein Zusammenhang von PSP-Toxinen mit Gymnodiminen lässt sich auf Grundlage der in dieser Arbeit gewonnenen Daten nicht bestätigen, da OKNL 42 der einzige der untersuchten Stämme ist, der diese beiden Toxingruppen zusammen produziert. Im Kontrast dazu stehen die südamerikanischen Stämme, diese produzieren PSP-Toxine, aber keine Gymnodimine. Somit kann keine Verbindung zwischen der Produktion von PSP-Toxinen und der Produktion von Gymnodimin hergestellt werden.

Tabelle 5: Vergleichende, quantitative Darstellung der detektierten Gymnodiminen

Stamm	Salinität	Herkunft	Gymnodimine / pg/Zelle						
			15-desMe GYM A	GYM E	GYM A	12-Me GYM A	Verbindung 6*	Verbindung 7*	Total
AOSH 2	> 30	Kanada	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NX 56-07	21,1 - 33,3	Norwegen	0,27	ND	0,07	ND	ND	ND	0,34
NX 56-10	21,1 - 33,4	Norwegen	4,97	0,05	ND	ND	ND	ND	5,02
NX 56-12	21,1 - 33,5	Norwegen	0,03	ND	ND	ND	ND	ND	0,03
OKNL 42	8 - 21	Niederlande*	NA	NA	4,86	1,11	226	9,71	242
AOICW	32,5	Chile	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AOA32 2	28,2	Chile	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
H1-G8	33,64	Argentinien	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
H3-D4	33,64	Argentinien	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
H2-A4	33,64	Argentinien	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Anmerkung: NA = nicht analysiert, ND = nicht detektiert

* = Die hier verwendeten Daten entstammen einem Manuskript in Arbeit von Helge Martens (AWI), bei den verwendeten Bezeichnungen mit einem Stern handelt es sich um die Bezeichnung der Substanzen in dem Manuskript, es sind um andere Toxine als die gleiche Verbindung ohne Stern in dieser Arbeit.

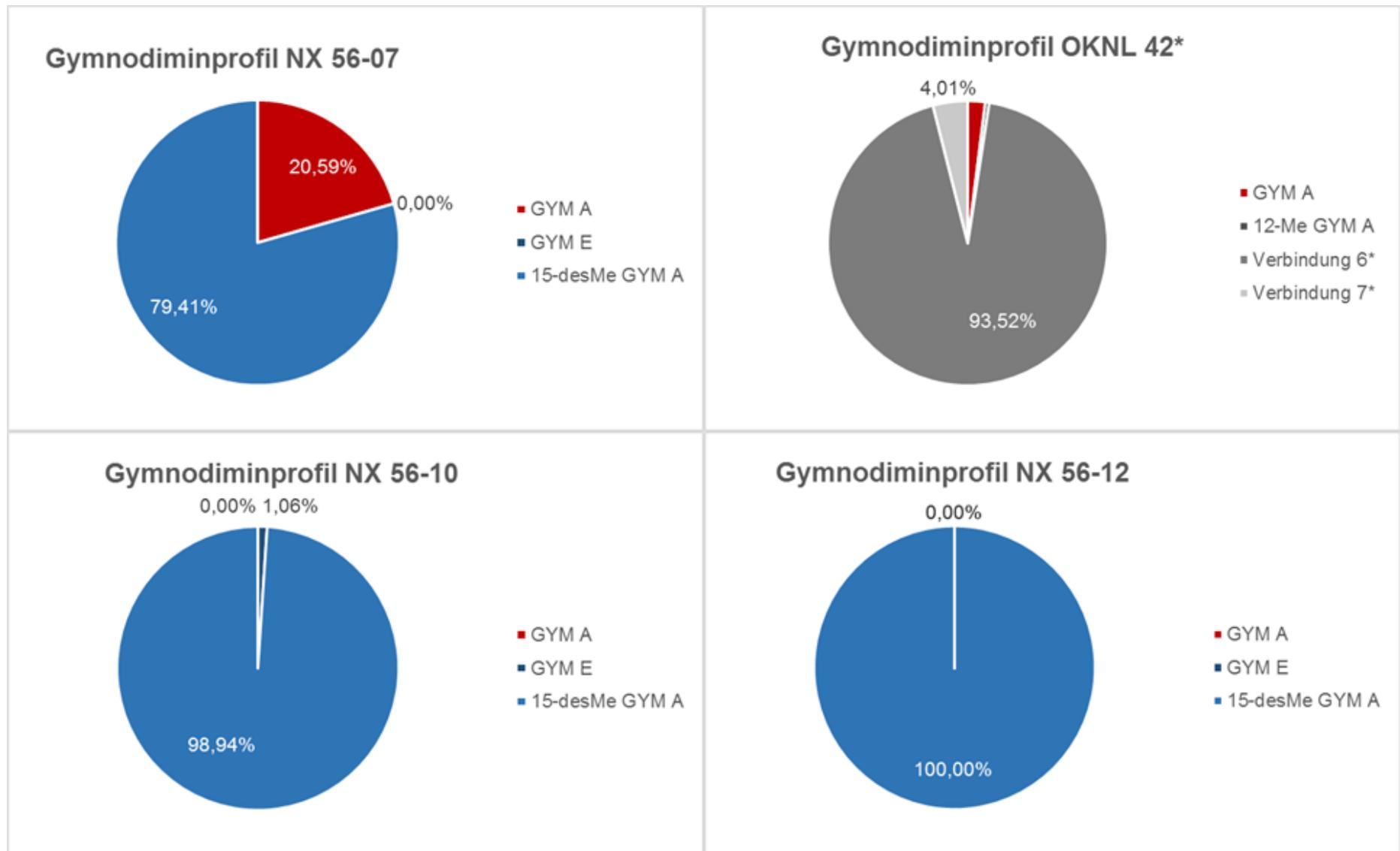


Abbildung 51: Vergleichende, prozentuale Darstellung der Gymnodiminprofile der *A. ostenfeldii* Stämme aus Norwegen und den Niederlanden, 100 % entsprechen der Summe aller in dem jeweiligen Stamm detektierten Cycloimine

Ergebnis der Spirolid-Analyse:

Bei den untersuchten Stämmen von *A. ostensefeldii* muss der Stamm AOSH 2 aus Kanada gesondert betrachtet werden, da für ihn keine weiteren Informationen zu Zellzahl und Extraktionsvolumen vorhanden sind, sodass lediglich eine qualitative Analyse stattfinden konnte. Es handelt sich um einen marinen Stamm, welcher Salinitäten von > 30 ausgesetzt ist. Er ist lediglich in der Lage, Spirolide zu produzieren, es konnten keine Gymnodimine detektiert werden. Diese Ergebnisse stimmen mit der Hypothese überein, dass *A. ostensefeldii* Stämme bei höheren Salinitäten nur eine Gruppe der Toxine, Spirolide produzieren. Dieser Stamm weist ein sehr diverses Spirolidprofil mit sieben verschiedenen Spiroliden auf. Die drei dominanten Spirolide sind 20-Me G, Spirolid C und Spirolid H. Des Weiteren werden in kleineren Mengen die Spirolide, 13,19-didesMe C, Verbindung 1, 27-hydroxy Spirolid C, 27-hydroxy Spirolid H, Verbindung 6 und Verbindung 8 & 9 produziert. Die Verbindung 6, 8 und 9 konnten nicht im folgenden Diagramm (vgl. Abb. 52) dargestellt werden, da für diese Verbindungen lediglich ein PrecursorScan und eine CID-Messung durchgeführt wurde und somit keine vergleichbare Peakfläche, welche als Grundlage für die Darstellung genutzt wurde, zur Verfügung steht.

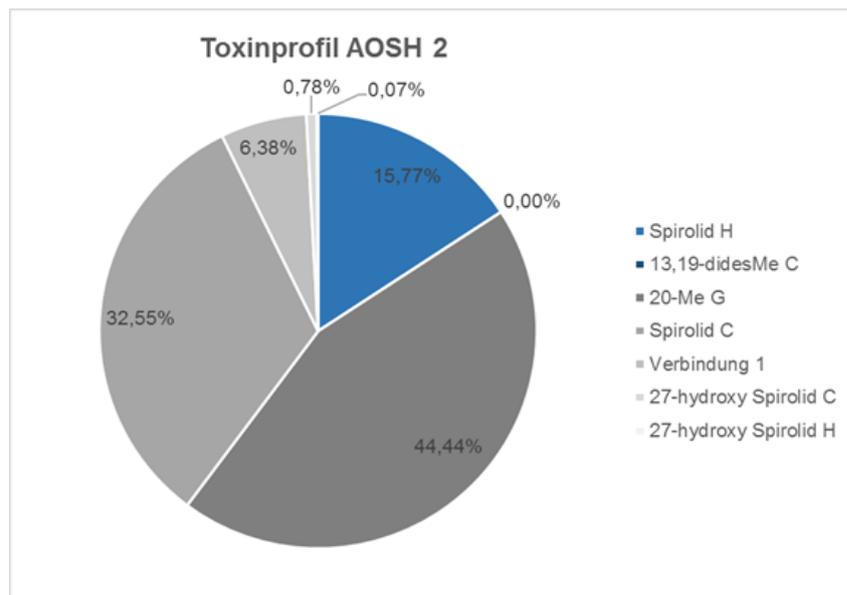


Abbildung 52: Graphische, prozentuale Darstellung des Toxinprofils von AOSH 2, Kanada, 100 % entsprechen der Summe aller in dem jeweiligen Stamm detektierten Cycloimine

***A. ostensfeldii* Isolate aus Chile:**

Die chilenischen Isolate weisen mit lediglich zwei produzierten Spiroliden das einfachste Toxinprofil von allen untersuchten Isolaten auf. Zusätzlich produzieren sie mit 0,08 pg/Zelle und 0,06 pg/Zelle für die gesamt produzierte Menge den geringsten Gehalt an Spiroliden. Dabei ist das Profil der beiden Stämme, trotz der unterschiedlichen Salinitäten am Herkunftsort nahezu identisch. Es ist fraglich, ob es sich bei den beiden Kulturen um unterschiedliche Populationen handelt. Das Ergebnis der Untersuchung des Stamms AOA32-2 von Salgado et al., (2015), wonach dieser Stamm lediglich PSP-Toxine und keine Spirolide produziert, konnte nicht bestätigt werden. Bei den detektierten Toxinen handelt es sich um bisher unbekannte Spirolide.

Tabelle 6: Darstellung des Spirolid-Toxinprofils der *A. ostensfeldii* Kulturen aus Chile

Stamm	Salinität	Herkunft	Spirolide in pg/Zelle		
			Verbindung 4	Verbindung 2	Total
AOICW	32,5	Chile	0,02	0,06	0,08
AOA32-2	28,2	Chile	0,01	0,05	0,06

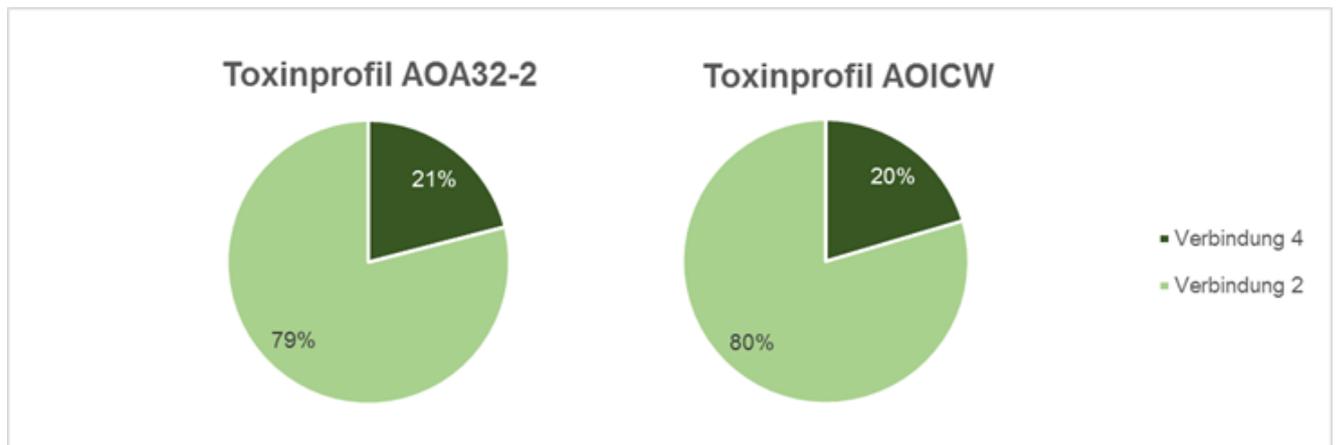


Abbildung 53: Graphische Darstellung des Spirolidtoxinprofils der chilenischen Proben, 100 % entsprechen der Summe aller in dem jeweiligen Stamm detektierten Cycloimine

A. ostenfeldii Isolate aus Argentinien:

Die anderen Isolate aus Südamerika, aus Argentinien, weisen ein deutlich diverseres Toxinprofil mit sieben verschiedenen Spiroliden, darunter fünf bisher unbekannte Spirolide, auf. Bei dem Stamm H3-D4 handelt es sich um den quantitativ größten Toxinproduzenten der drei argentinischen Stämme, mit einer Gesamtmenge von 11,9 pg/Zelle. Die qualitative Zusammensetzung innerhalb der Stämme unterscheidet sich nur geringfügig voneinander. Das Profil wird dominiert von SPX 1 als Hauptkomponente. Die weiteren Spirolide werden in deutlich geringeren Mengen produziert. Die in den chilenischen Proben detektierten Spirolide finden sich nicht im Profil der argentinischen Proben wieder.

Tabelle 7: Darstellung des Spirolid-Toxinprofils der *A. ostenfeldii* Kulturen aus Argentinien

Stamm	Salinität	Herkunft	Spirolide in pg/Zelle							Spirolid M	Total
			SPX 1	27-hydroxy-13-desMe C	13/19,31-didesMe C	Verbindung 3	Verbindung 5	Verbindung 7			
H1--G8	33,64	Argentinien	3,80	0,02	0,02	0,07	0,09	0,03	0,28	4,58	
H3--D4	33,64	Argentinien	9,30	0,14	0,07	0,15	0,16	0,12	1,29	11,9	
H2--A4	33,64	Argentinien	7,59	0,05	0,04	0,03	0,16	0,02	0,29	8,73	

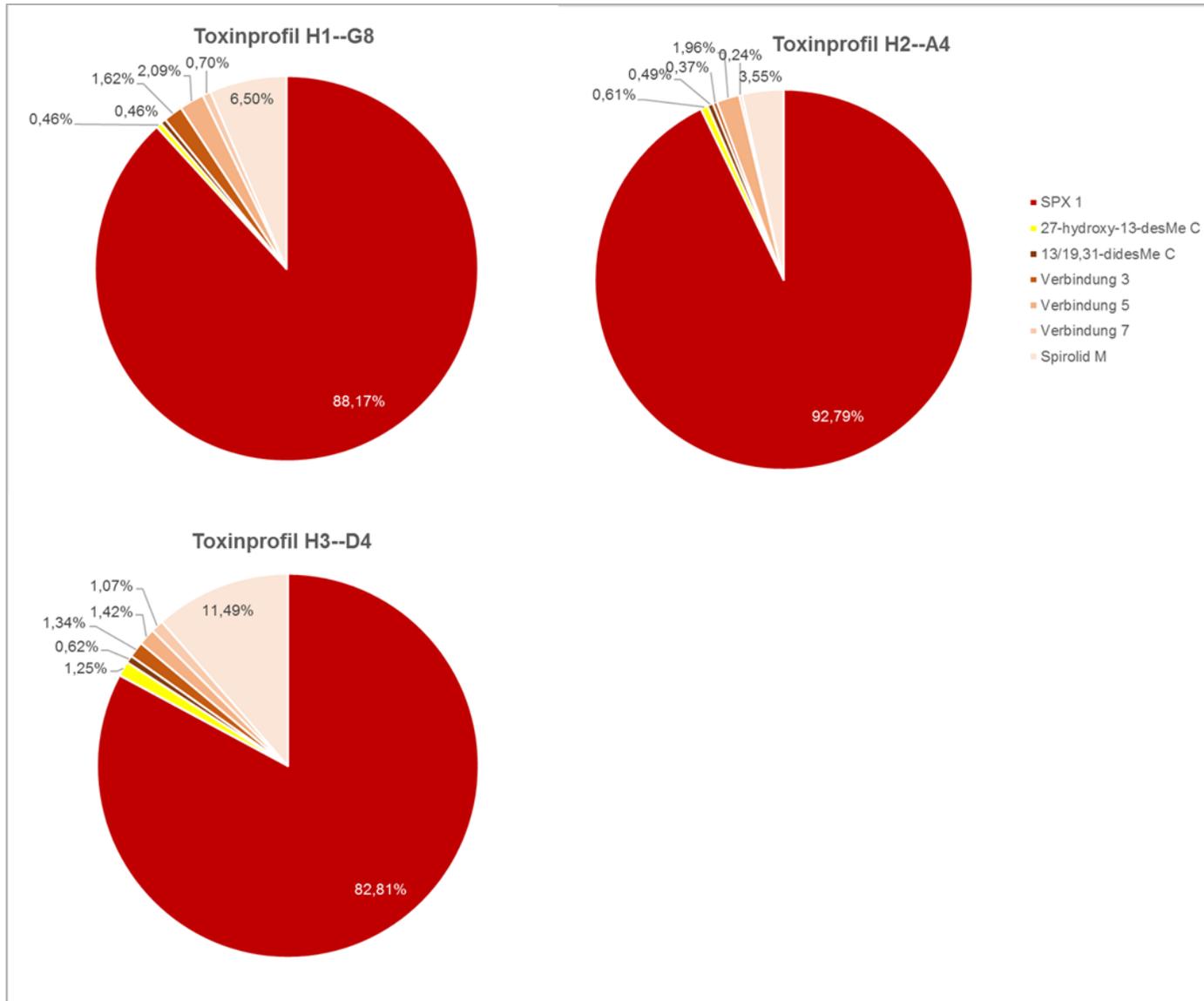


Abbildung 54: Graphische, prozentuale Darstellung des Spirolidtoxinprofils der argentinischen Proben, 100 % entsprechen der Summe aller in dem jeweiligen Stamm detektierten Cycloimine

A. *ostenfeldii* Isolate aus den Niederlanden:

Das Toxinprofil ist im Vergleich zu den Proben aus Argentinien geringfügig variantenärmer, es werden insgesamt sechs verschiedene Spirolide produziert. Das Toxinprofil wird von SPX 1 dominiert. Des Weiteren enthält das Profil vier weitere bisher unbekannte Toxine, für diese konnten bisher nicht mit ausreichender Gewissheit ein Strukturvorschlag gemacht werden. Mit einer Salinität von 8 - 21 weist OKNL 42 die geringste Salinität der in dieser Studie untersuchten Isolate auf.

Tabelle 8: Darstellung des Spirolid-Toxinprofils der *A. ostenfeldii* Kulturen aus den Niederlanden

Stamm	Salinität	Herkunft	Spirolide in pg/Zelle					Total	
			SPX 1	27-hydroxy-13-desMe C	Verbindung 2*	Verbindung 3*	Verbindung 4*		Verbindung 5*
OKNL 42	8 - 21	Niederlande*	2,92	0,05	0,01	0,06	0,28	0,14	3,45

* = Die hier verwendeten Daten entstammen einem Manuskript in Arbeit von Helge Martens (AWI), bei den verwendeten Bezeichnungen mit einem Stern handelt es sich um andere Toxine als die gleiche Verbindung ohne Stern

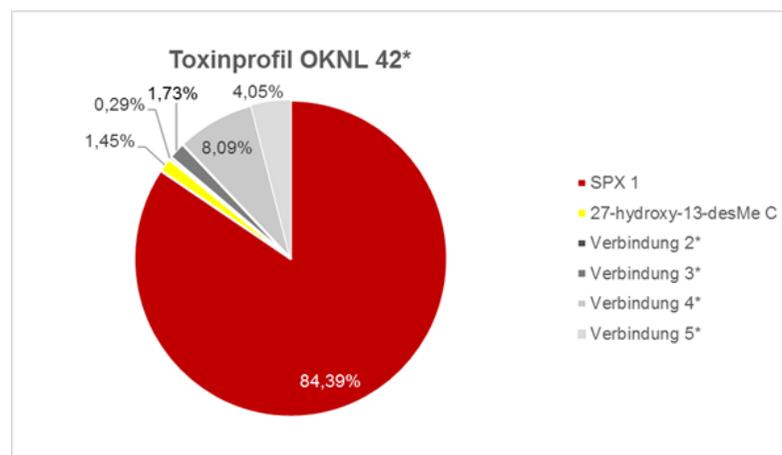


Abbildung 55: Graphische, prozentuale Darstellung des Spirolidtoxinprofils von OKNL 42, Niederlande, 100 % entsprechen der Summe aller in dem jeweiligen Stamm detektierten Cycloimine

***A. ostenfeldii* Isolate aus Norwegen:**

Bei den drei norwegischen Proben ist auffällig das der Stamm NX 56--12 die geringste Quantität und Anzahl an Toxinen aufweist. Wie auch bei den anderen Stämmen aus Norwegen ist die Hauptkomponente 13,19-didesmethyl Spirolid C. Der Stamm NX 56--10 produziert die größte Menge an Toxinen mit 46,4 pg/Zelle. Der Stamm NX 56-07 produziert sechs verschiedene Spirolide, die beiden anderen Stämme lediglich fünf bzw. vier. In den norwegischen Stämmen konnten zwei bisher unbekannte Spirolide (Spirolid K & L) detektiert werden.

Tabelle 9: Darstellung des Spirolid-Toxinprofils der *A. ostenfeldii* Kulturen aus Norwegen

Stamm	Salinität	Herkunft	Spirolide in pg/Zelle						
			SPX 1	27-hydroxy-13-desMe C	13,19-didesMe	Spirolid H	Spirolid K	Spirolid L	Total
NX 56--07	21,1 - 33,3	Norwegen	1,48	0,05	6,44	0,06	0,18	0,02	8,66
NX 56--10	21,1 - 33,4	Norwegen	1,93	ND	39,9	0,11	2,00	1,36	46,4
NX 56--12	21,1 - 33,5	Norwegen	0,08	ND	0,60	0,00	0,07	ND	0,81

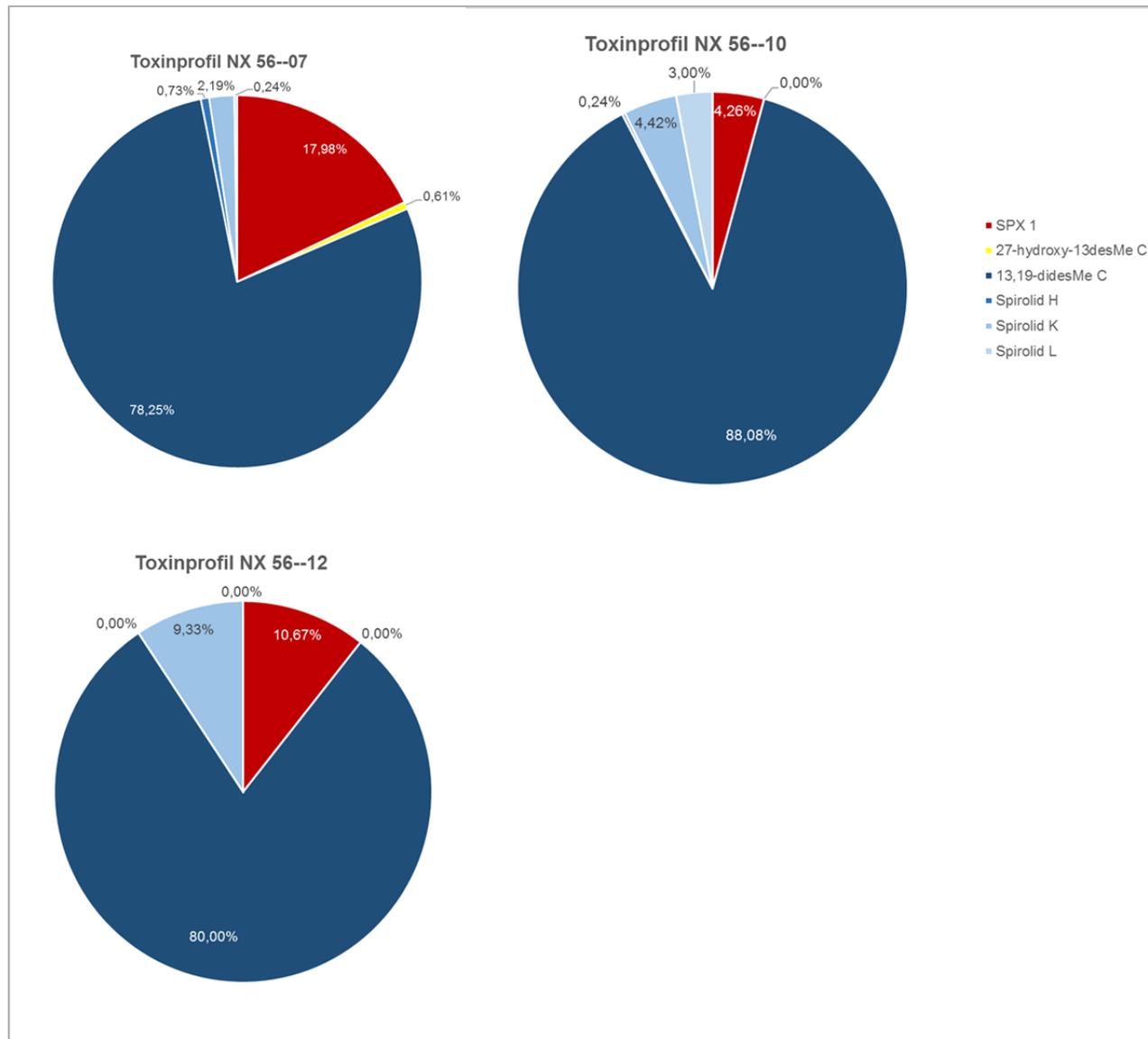


Abbildung 56: Graphische, prozentuale Darstellung des Spirolidtoxinprofils der norwegischen Isolate, 100 % entsprechen der Summe aller in dem jeweiligen Stamm detektierten Cycloimine

9. Fazit:

Insgesamt konnten in den untersuchten *A. ostenfeldii* Stämmen 31 verschiedene Cycloimine detektiert werden. Darunter 25 Spirolide und 6 Gymnodimine, davon 19 bisher unbekannte Toxine. Aufgeteilt in vier Gymnodimine und 15 Spirolide. Für die beiden Gymnodimine und sechs der Spirolide konnte auf Grundlage der CID-Spektren ein Strukturvorschlag gemacht werden. Dies zeigt wie variantenreich das Toxinprofil von *A. ostenfeldii* ist. Des Weiteren konnten 5 verschiedene PSP-Toxine detektiert werden.

Die Zusammensetzung der Toxinprofile unterscheidet sich sehr stark zwischen Isolaten aus unterschiedlichen geographischen Regionen. Es konnte jedoch kein genereller Zusammenhang zwischen Gymnodiminen und PSP-Toxinen festgestellt werden, lediglich in dem Stamm aus den Niederlanden OKNL 42 konnten sowohl Gymnodimine als auch PSP-Toxine detektiert werden. Die Stämme aus Norwegen sind in der Lage Gymnodimine zu produzieren, produzieren allerdings keine PSP-Toxine. Für die Stämme aus Südamerika liegt der umgekehrte Fall vor.

Außerdem konnte klargelegt werden, dass der Salzgehalt des Herkunftsortes einer Population kein direkter Einflussfaktor für das Produktionspotenzial von unterschiedlichen Toxingruppen ist. Die untersuchten marinen Stämme aus Kanada, Argentinien und Chile produzieren nicht, wie nach der Hypothese (vgl. Kapitel 4) vermutet, ausschließlich Spirolide, dies trifft nur für den Stamm aus Kanada zu. Die südamerikanischen Stämme sind zusätzlich in der Lage PSP-Toxine zu produzieren. Des Weiteren produzieren die untersuchten Stämme aus geographischen Regionen (Norwegen, Chile, Niederlande) mit einem niedrigeren Salzgehalt als im offenen Ozean, mit Ausnahme des niederländischen Stamms, lediglich nur zwei der drei Toxingruppen.

Mit den Daten der Uthörn-Expedition konnte festgestellt werden, dass sich die Toxinprofile in Nordsee und Kattegat trotz geographischer Trennung und unterschiedlichen Salinitäten sehr stark ähneln. Im Gegensatz dazu, weisen die Populationen im Limfjord ein eigenes Toxinprofil auf. An den Daten ist ebenfalls zu erkennen, dass keine Vermischung der Populationen aus der Nordsee und der Populationen aus dem Limfjord stattfindet, da das in der Nordsee dominante Spirolid 20-Me G in den ersten Stationen im westlichen Limfjord detektiert wurde, im weiteren Verlauf des Limfjord allerdings nicht mehr detektiert werden konnte.

10. Ausblick:

Um weitere Kenntnis über das Toxinprofil von *A. ostenfeldii* zu erlangen ist es notwendig, weitere Stämme aus anderen Regionen zu analysieren. Es ist wahrscheinlich, dass es noch mehr bisher unbekannte Cycloimine produziert werden, da in allen Stämmen die in dieser Studie analysiert worden sind bisher unbekannte Cycloimine detektiert wurden.

Die in dieser Studie durchgeführten Strukturvorschläge, sowie die noch nicht im Detail aufzuklärenden Toxine für die kein Strukturvorschlag gemacht werden konnte, gilt es zudem mit weiteren Analysen mittels hochauflösender Massenspektrometrie und NMR-Analyse strukturell aufzuklären. Für die NMR-Analyse ist es notwendig,

größere Menge der jeweiligen Toxine durch weitere Kultivierung der Stämme und anschließender präoperativer HPLC zur Trennung der jeweiligen Toxine zu produzieren.

Zusätzlich müssen weitere Faktoren als Grund für die unterschiedlichen Toxinprofile gefunden werden. Dafür müssen neben den Toxinprofilen die evolutionären Zusammenhänge der unterschiedlichen Populationen als Faktor durch molekularbiologische Analysen berücksichtigt werden. Durch weitere Analysen von verschiedenen Populationen könnte es möglich sein ein Muster in der Produktion der unterschiedlichen Toxingruppen zu erkennen und darüber die Gründe für die jeweilige Produktion weiter aufzuklären. Ein weiterer Schritt zum Verständnis der Produktion ist die Aufklärung der Biosynthese der Toxine, da ebenfalls bis dato unklar ist, welche Gründe für die Ausbildung eines solch vielfältigen Toxinprofils sind.

Ein weiterer Bereich mit Forschungspotenzial ist der der strikten geographischen Trennung der unterschiedlichen Populationen, wie sie im Limfjord beobachtet wurde.

Um die potenzielle Bedrohung durch die immer häufiger auftretenden Blüten von *A. ostensfeldii* zu beurteilen, ist es zudem notwendig, weitere Informationen über die Toxizität der unterschiedlichen Cycloimine zu gewinnen.

11. Quellen:

- Aasen, J., MacKinnon S.L., LeBlanc, P., Walters, J.A., Hovgaard, P., Aune, T., Quilliam M.A., 2005. Detection and Identification of Spirolides in Norwegian Shellfish and Plankton. *Chem. Res. Toxicol.*, Issue 18, pp. 509-515.
- Almandoz, G. O., Montoya, N. G., Hernando M.P., Benavideos, H. R., Carignan, M. O., Ferrario, M.E., 2014. Toxic strains of the *Alexandrium ostenfeldii* complex in southern South America (Beagle Channel, Argentina). *Harmful Algae*, Issue 37, pp. 100-109.
- Anderson, D. M., Alperman T.J., Cembella, A. D., Collos, Y., Masseret, E., Montresor M., 2012. The globally distributed genus *Alexandrium*: Multifaced role in marine ecosystems and impact on human health. *Harmful Algae* 14, pp. 10-35.
- Balech, E. & Tangen, K., 1985. morphology and taxonomy of toxic species in the *Tamarensis* group (Dinophyceae): *Alexandrium Excavatum* comb. nov. and *Alexandrium ostenfeldii* comb. nov.. *Sarsia*, Band 70, pp. 333-343.
- Burson, A., Matthijs, H. C. P., de Bruijne, W., Talens, R., Hoogenboom, R., Gerssen, A., Visser, P. M., Stomp, M., Steur, K., van Scheppingen, y., Huisman, J., 2014. Termination of a toxic *Alexandrium* bloom with hydrogen peroxide. *Harmful Algae*, Issue 31, pp. 125-135.
- Camman, K., 2001. Instrumentelle Analytische Chemie: Verfahren, Anwendungen und Qualitätssicherung. In: s.l.:Spektrum, pp. 5-11 bis 5-16 + 5-51 bis 5-74.
- Cembella, A. D., Bauder, A. G., Lewis, N. I. & Quilliam, M. A., 2001. Association of the gonyauslacoid dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* with spirolid toxins in size-fractionated plankton. *Journal of Plankton Research*, Issue 23, pp. 1413-1419.
- Cembella, A. D., Lewis, N. I. & Quilliam, M. A., 2000. The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) as the causative organism of spirolide shellfish toxins. *Phycologia*, 39(1), pp. 67-74.
- Christian, B., Below, A., Dreßler, N., Scheibner, O., Luckas, B., Gerdts, G., 2008. Are spirolides converted in biological systems?--A study. *Toxicon*, Issue 51, pp. 934-940.
- Ciminello, P., Dell' Aversano, C., Iacovo, E. D., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., Guerrini, F., Pezzolesi, L., Pistocchi, R., 2010. Characterization of 27-hydroxy-13-desmethyl spirolide C and 27-oxo-13,19-didesmethyl spirolide C. Further insights into the complex Adriatic *Alexandrium ostenfeldii* toxin profil. *Toxicon*, Issue 56, pp. 1327-1333.
- Daugbjerg, N., Hansen G., Larsen J., Moestrup, O., 2000. Phylogeny of some of the major genera of dinoflagellates based on ultrastructure and partial LSU rDNA sequence data, including the erection of three new genera of unarmoured dinoflagellates. *Phycologia*, 39(4), pp. 302-317.
- Gerssen, A., Mulder, P. P. J., McElhinney, M. A. & de Boer, J., 2009. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline conditions. *J. Chromatogr.*, Issue A 1216 (9), pp. 1421-1430.
- Hansen, P. J., Cembella, A. D. & Moestrup, O., 1992. The marine Dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*: Paralytic Shellfish Toxin concentration, composition, and Toxicity to a tintinnid ciliate. *J. Phycol.*, Issue 28, pp. 597-603.
- Harju, K., Koskela, H., Kremp, A., Suikkanen, S., De la Iglesia, P., Miles, C. O., Krock, B., Vanninen, P., 2016. Identification of gymnodimin D and presence of gymnodimin variants in the dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* from the Baltic Sea. *Toxicon*, Issue 112, pp. 68-76.
- Holmes, M. J., Brust, A. & Lewis, R. J., 2014. Dinoflagellate Toxins: An Overview. In: L. M. Botana, Hrsg. *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection*. 3 Hrsg. s.l.:CRC Press, Taylor & Francis Group, pp. 3-38.

- Hu, T., Burton, I. W., Cembella, A. D., Curtis, J. M., Quilliam, M. A., Walter, J. A., Wright, J. L. C., 2001. Characterization of Spirolides A, C, and 13-Desmethyl C, New Marine Toxins Isolated from Toxic Plankton and Contaminated Shellfish. *J. Nat. Prod.*, Issue 64, pp. 308-312.
- Hu, T., Curtis, J. M., Oshima, Y., Quilliam, M. A., Walter, J. A., Watson-Wright, W. M., Wright, J. L. C., 1995. Spirolides B and D, Two Novel Macrocycles Isolated from the Digestive Glands of Shellfish. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, pp. 2159-2161.
- Hu, T., Curtis, J. M., Walter, J. A. & Wright, J. L. C., 1996. Characterization of Biologically Inactive Spirolides E and F: Identification of the Spirolide Pharmacophore. *Tetrahedron Letters*, 37(43), pp. 7671-7674.
- Kremp, A., Lindholm, T., Dreßler, N., Erler, K., Gerdt, G., Eirtovaara, S., Leskinen, E., 2009. Bloom forming *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in shallow water of the Åland Archipelago, Northern Baltic Sea. *Harmful Algae*, Issue 8, pp. 318-328.
- Kremp, A., Tahvanainen P., Litaker, W., Krock, B., Suikkanen, S., Leaw, C. P., Tomas, C., 2014. Phylogenetic Relationships, Morphological Variation, and Toxin Patterns in the *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) Complex: Implications for Species Boundaries and Identities. *J. Phycol.*, Issue 50, pp. 81-100.
- Krock, B., Seguel, C. G. & Cembella, A. D., 2007. Toxin profile of *Alexandrium catenella* from the Chilean coast as determined by liquid chromatography with fluorescence detection and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Harmful Algae*, Issue 6, pp. 734-744.
- Krock, B., Tillmann, U. & John, U., 2008. LC-MS/MS aboard ship: tandem mass spectrometry in the search for phycotoxins and novel toxigenic plankton from the North Sea. *Anal Bioanal Chem*, Issue 392, pp. 797-803.
- MacKinnon, S. L., Walter, J. A., Quilliam, M. A., Cembella, A. D., LeBlanc, P., Burton, I. W., Hardstaff, W. R., Lewis, N. I., 2006. Spirolides Isolated from Danish Strains of the Toxigenic Dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. *Journal of Natural Products*, Issue 7, pp. 984-987.
- Martens, H., Van de Waal, D. B., Brandenburg, K. K., Krock, B., Tillmann, U., 2016. Salinity effects on growth and toxin production in an *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) isolate from The Netherlands. *Journal of Plankton Research*, Issue 3, pp. 1-15.
- Mattei, C., Vetter, I., Eisenblätter, A., Krock, B., Ebbecke, M., Desel, H., Zimmermann, K., 2014. Ciguatera fish poisoning: A first epidemic in Germany highlights an increasing risk for European countries. *Toxicon*, Issue 91, pp. 76-83.
- Miles, C. O., Wilkins, A. L., Stirling, D. J. & MacKenzie, A. L., 2003. Gymnodimin C, an Isomer of Gymnodimine B, from *Karenia selliformis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Issue 51, pp. 4838-4840.
- Molgó, J., Aráoz, R., Benoit, E. & Iorga, B. I., 2014. Cyclic Imin Toxins: Chemistry, Origin, Metabolism, Pharmacology, Toxicology, and Detection. In: L. M. Botana, Hrsg. *Seafood and Freshwater Toxins, Pharmacology, Physiology, and Detection*. 3 Hrsg. s.l.:CRC Press, pp. 951-990.
- Naumer & Heller, 1986. Untersuchungsmethoden in der Chemie. In: Stuttgart: Georg Thieme Verlag, pp. 54-60.
- Roach, J. S., LeBlanc, P., Lewis, N. I., Munday, R., Quilliam, M. A., MacKinnon, S. L., 2009. Characterisation of a Dispiroketal Spirolid Subclass from *Alexandrium ostenfeldii*. *Journal of Natural Products*, Issue 72, pp. 1237-1240.
- Salgado, P., Riobó, P., Rodríguez, F., Franco, J. M., Bravo, I., 2015. Differences in the toxin profiles of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) strains isolated from different geographic origins: Evidence of paralytic toxin, spirolide and gymnodimine. *Toxicon*, Issue 103, pp. 85-98.

Seki, T., Satake, M., Mackenzie, L., Kasper, H. F., Yasumoto, T., 1995. Gymnodimine, a New Marine Toxin of Unprecedented Structure Isolated from New Zealand Oysters and the Dinoflagellate, *Gymnodinium* sp.. *Tetrahedron Letters*, 36(39), pp. 7093-7096.

Skoog & Leary, 1992. Instrumentelle Analytik: Grundlagen, Geräte, Anwendungen. In: New York: Springer, pp. 455-496 + 675-720.

Sleno, L., Chalmers, M. J. & Volmer, D. A., 2004. Structural study of spirolide marine toxins by mass spectrometry, Part 2. Mass spectrometric characterization of unknown spirolides and related compounds in a cultured phytoplankton extract. *Anal Bioanal Chem*, Issue 378, pp. 977-986.

Sleno, L., Windust, A. J. & Volmer, D. A., 2004. Structural study of spirolid marine toxins by mass spectrometry, Part 1. Fragmentation pathways of 13-desmethyl spirolid C by collision-induced dissociation and infrared multiphoton dissociation mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, Issue 378, pp. 969-976.

Suikkanen, S., Anke, K., Hautala, H. & Krock, B., 2013. Paralytic shellfish toxins or spirolides? The role of environmental and genetic factors in toxin production of the *Alexandrium ostenfeldii* complex. *Harmful Algae*, Issue 26, pp. 52-59.

Tillmann, U., Kremp, A., Tahvanainen, P. & Krock, B., 2014. Characterization of spirolide producing *Alexandrium ostenfeldii* (Dionophyceae) from western Arctic. *Harmful Algae*, Issue 39, pp. 259-270.

Tomas, C. R., van Wagoner, R., Tatters, A. O., White, K. D., Hall, S., Wright, J. L. C., 2012. *Alexandrium peruvianum* (Balech and Mendiola) Balech und Tangen a new toxic species for coastal North Carolina. *Harmful Algae*, Issue 17, pp. 54-63.

Vale, P., 2014. Saxitoxin and Analogs: Ecobiology, Origin, Chemistry, and Detection. In: L. M. Botana, Hrsg. *Seafood and Freshwater Toxins, Pharmacology, Physiologie and Detection* . 3 Hrsg. s.l.:CRC Press, pp. 991-1014.

Van de Waal, D. B., Dedmer, B., Tillmann, U., Martens, H., Krock, B., Van Scheppingen, Y., John, U., 2015. Characterization of multiple isolates from an *Alexandrium ostenfeldii* bloom in The Netherlands. *Harmful Algae*, Issue 49, pp. 94-104.

Van Wagoner, R. M., Misner, I., Tomas, C. R. & Wright, J. L. C., 2011. Occurrence of 12-methylgymnodimin in a spirolide-producing dinoflagellate *Alexandrium peruvianum* and the biogenetic implications. *Tetrahedron Letters*, Issue 52, pp. 4243-4246.

Wang, D.-Z., 2008. Neurotoxins from Marine Dinoflagellates: A Brief Review. *Marine Drugs*, Issue 6, pp. 349-371.

12. Anhang:

Nummer 1:

Tabelle 10: Stationsprotokoll Uthörn-Expedition 2016

Station #	LAT	LON	Tiefe m	Probenahme Rosette	Anzahl Netzzüge	Tiefe NT m	Volumen NT ml	Extraktionsvolumen μ l
1	54° 8,10'	7° 57,20'	42	3/10	1	20	1000	1000
2	54° 16,60'	7° 49,60'	24	3/10	1	20	1000	1000
3	54° 32,4'	7° 33,7'	24	3/10	1	20	1000	1000
4	54° 43,9'	7° 32,2'	21	3/10	1	20	1000	1000
5	55° 0,65'	7° 35,7'	21	3/10	1	20	1000	1000
6	55° 16,3'	7° 35,15'	22	3/10	1	20	1000	1000
7	55° 32,1'	7° 28,8'	23	3/10	1	20	1000	1000
8	55° 46,8'	7° 17,3'	24	3/10	1	20	1000	1000
9	56° 7,6'	7° 28,2'	24	3/10	1	20	1050	1000
10	56° 38'	6° 42,9'	39	3/10	1	20	1000	1000
11	56° 38'	6° 42,9'	31	3/10	1	20	1000	500
12	56° 41,6'	7° 41,13	29	3/10	1	20	1000	500
13	56° 42,74'	8° 9,64'	15	3/10	2	10	2000	1000
14	56° 37,5'	8° 21'	6,4	3	2	5	2000	1000
15	56° 33,7'	8° 31,3'	8	3	2	5	2000	1000
16	56° 37,77'	8° 40,2'	14	3/10	1	10	1000	1000
17	56° 37,25'	9° 18,03'	5	3	2	4	1700	1000
18	56° 40,5'	9° 8,6'	7	3	2	5	2000	1000
19	56° 38,0'	9° 6,26'	5,5	3	2	4	1300	1000
20	56° 57,4	9° 6,7'	7	3	2	4	1000	1000
21	56° 46,22'	8° 51,67'	12	3	2	5	1100	1000
22	56° 40,863'	8° 45,675'	7,5	3	2	4	1000	1000
23	56° 58,9'	8° 58,8'	7,5	3	2	4	1000	1000
24	56° 47,6'	8° 31,65'	8,5	3	2	5	1000	1000
25	56° 55,7'	8° 44,3	11	3	2	5	1000	1000
26	56° 53,288'	9° 8,252'	4	3	2	4	1000	1000
27	56° 44,672'	9° 12,636'	10	3	2	5	1000	1000

28	56° 48,564'	9° 3,189'	5,5	3	2	4	1000	1000
29	56° 57,587'	10° 32,751'	8	3	2	4	1000	1000
30	57° 13,608'	10° 41,606'	22	3/10	1	17	1000	1000
31	57° 29,395'	10° 46,759'	31	3/100	1	25	1000	1000
32	57° 27,766'	11° 16,602'	18	3/10	2	7	1000	1000
33	54° 40,570'	10° 49,658'	59	3/10	1	25	1000	1000
34	56° 57,930'	11° 22,015'	12	3	2	7	1000	1000
35	56° 42,256'	11° 15,945'	18	3/10	2	12	1000	1000
36	56° 26,553'	11° 10,159'	17	3/10	2	10	1000	1000
37	56° 11,110'	11,3° 3,562'	23	3/10	1	20	1000	1000
38	55° 56,895'	10° 57,636'	22	3/10	1	15	1000	1000
39	55° 41,442'	10° 44,030'	25	3/10	1	20	1000	1000
40	55° 27,898'	10° 52,567'	26	3/10	1	20	1000	1000
41	55° 12,940'	11° 0,170'	16	3/10	2	10	1000	1000
42	54° 28,100'	10° 53,560'	16,5	3/10	2	10	1000	1000
43	54° 41,110'	10° 44,290'	23	3/10	1	20	1000	1000
44	54° 33,401'	10° 28,504'	17	3/10	2	10	1000	1000

Nummer 2:

Tabelle 11: Darstellung des in der Cycloiminmultimethode verwendeten Massenübergänge

Nr. des Übergangs	Parention (M1-Masse) m/z	Daughterion (M3-Masse) m/z
1	494,6	476,1
2	508,6	490,5
3	510	492
4	522,6	504,5
5	524	506,5
6	526	508,5
7	534,5	150,1
8	536,5	150,1
9	540	522,5
10	540,5	164,1
11	542	524,5
12	548	530,5
13	552,5	150,1
14	564	546,5
15	582	564,5
16	628,5	150,1
17	640,5	164,1
18	644,5	164,1
19	650,5	164,1
20	652,5	164,1
21	658	150,1
22	658,5	164,1
23	666,5	164,1
24	666,5	150,1
25	686,5	164,1
26	674,5	164,1
27	678,5	164,1
28	678,5	150,1
29	692,5	164,1
30	692,5	150,1
31	692,5	178,1
32	694,5	164,1
33	694,5	180,3
34	696,6	164,1
35	698,5	164,1
36	706,5	164,1
37	708,5	164,1
38	708,5	180,3
39	710,5	164,1
40	710,6	150,1
41	710,6	164,1
42	718,5	164,5
43	720,5	164,1
44	722,5	180,3
45	722,5	164,1
46	766,6	164,1
47	784,6	164,1

Nummer 3:

Tabelle 12: MS-Parameter der Cycloiminmultimethode (Turbo Spray)

Parameter	Wert
Source/Gas	
Curtain Gas (CUR)	20
Collision Gas (CAD)	Medium
Ion Spray Voltage (IS)	5500 V
Temperature (TEM)	650 °C
Ion Source Gas 1 (GS 1)	40 psi
Ion Source Gas 2 (GS 2)	70 psi
Compound	
Declustering Potential (DP)	121 V
Entrance Potential (EP)	10 V
Collision Energy (CE)	57 V
Collision Cell Exit Potential (CXP)	22 V

Nummer 4:

Tabelle 13: Darstellung der Toxindaten aller Stationen der Uthörn-Expedition

Station	SPX 1 pg/ m Netzzug	27-hydroxy- 13-desMe C pg/ Netzzug m	13,19-didesmethyl Spirolid C pg/ m Netzzug	Spirolid G pg/ m Netzzug	20-Me-G pg/ m Netzzug
Nordsee					
1	223,82	61,85	3,01	64,84	567,96
2	72,32	14,59	0,67	28,87	198,25
3	103,49	39,90	1,32	44,20	259,35
4	23,32	8,98	1,69	9,10	129,05
5	ND	7,54	0,27	ND	104,74
6	8,92	20,95	0,05	7,36	241,90
7	5,79	34,73	0,72	0,06	311,72
8	ND	36,66	1,69	1,62	348,50
9	18,70	40,90	ND	ND	480,05
10	0,69	8,92	1,65	0,72	41,71
11	5,70	25,34	0,18	ND	289,59
12	11,78	80,11	0,18	10,13	1081,67
13	81,05	151,50	1,71	19,70	1677,06
Limfjord, Dänemark					
14	ND	27,68	2,76	ND	357,86
15	ND	ND	ND	ND	36,16
16	ND	ND	6,73	ND	37,03
17	1156,48	0,75	434,85	6047,38	174,56
19	635,91	0,17	243,14	3023,69	61,25
20	50,34	5,91	17,30	142,92	25,72
21	ND	ND	3,38	37,03	21,95
22	ND	ND	ND	30,39	28,37
23	13,75	1,71	ND	75,28	0,00
24	23,69	ND	ND	241,90	15,96
25	5,62	ND	2,72	13,59	0,03
26	91,80	ND	58,76	607,86	ND
27	437,66	ND	159,60	2493,77	ND
28	30,08	ND	26,34	160,54	7,59
Kattegat					
29	ND	3,58	ND	ND	42,08
30	ND	ND	0,40	ND	41,51

31	ND	15,91	0,57	ND	143,64
32	12,29	ND	0,45	ND	48,18
33	0,57	7,98	0,83	1,15	91,27
34	5,02	ND	1,42	0,93	ND
35	1,38	ND	0,30	1,39	ND
36	2,00	1,66	0,69	0,69	ND
37	1,55	1,33	0,36	1,55	ND
38	1,43	2,19	0,96	2,39	0,01
39	0,22	ND	2,41	ND	ND
40	0,32	ND	2,28	0,59	ND
41	ND	ND	0,70	1,56	ND
42	ND	ND	ND	ND	ND
43	ND	0,72	1,35	0,57	ND
44	ND	0,27	ND	ND	0,92