

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie

Lehrstuhl für Analytische Chemie

Entwicklung immunanalytischer Methoden zur Detektion von niedermolekularen toxischen Verbindungen in Lebensmitteln

Xaver York Zacharias Karsunke

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Michael Schuster
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner
2. Univ.-Prof. Dr. Michael Groll

Die Dissertation wurde am 31. Mai 2011 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 30. Juni 2011 angenommen.

Danksagung

Diese Arbeit entstand in der Zeit vom November 2008 bis Mai 2011 am Lehrstuhl für Analytische Chemie der Technischen Universität München unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner. Ein Teil der Arbeit wurde durch ein Projekt des BMBF (02WU0969) gefördert.

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Reinhard Nießner für die Möglichkeit die äußerst interessanten Projekte in sehr gut ausgestatteten Laboratorien durchführen zu können. Besonders möchte ich mich für das Vertrauen und den geschätzten Freiraum in der Forschung bedanken.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dietmar Knopp für seine intensive Betreuung während der gesamten Doktorarbeit. Für sein Vertrauen und die Möglichkeit Forschungsaufenthalte sowohl an der TsingHua Universität in Peking (China), als auch an der University of Guelph (Kanada) wahrnehmen zu können, bedanke ich mich herzlich.

Sehr herzlich danke ich Prof. Chris Hall, Dr. Mike McLean und Dr. HaiFeng Wang der Universität Guelph in Kanada für die großartige Unterstützung bei der Herstellung rekombinanter Antikörper. Besonderer Dank gilt hierbei Herrn HaiFeng Wang, der mir auch privat bei meinem Aufenthalt in Guelph eine große Unterstützung war.

Herrn Prof. Boos und Herrn Prof. J.-M. Lin danke ich vielfach für die Möglichkeit der Teilnahme an der „Sino-German Cooperation Research Group for Separation and Analysis of Complex Samples“ und meinem damit verbundenem Forschungsaufenthalt an der TsingHua Universität (Peking, China).

Dr. Ekkehard Weber und Rita Medek vom Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich sehr für die Produktion und Reinigung der monoklonalen Antikörper.

Bei Herrn Helmut Krause vom Lehrstuhl für Biochemie der Technischen Universität München bedanke ich mich für die zahlreichen Aufnahmen von MALDI-Spektren. Herrn Dr. Stefan Asam vom Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München danke ich für die Bereitstellung zahlreicher Lebensmittelproben.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meinem Vater für seine Unterstützung und die Entwicklung der Mikroarray-Auswertesoftware SIP 0.4.

Sehr herzlicher Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen Martin Rieger, Jimena Saucedo-Friebe, Susanna Vazac und Michael Pschenitza für ihre große Unterstützung im Labor und die gute Atmosphäre am Arbeitsplatz. Außerdem gilt mein besonderer Dank Ben Greisen, Anna Neumann, Philipp Pust und Josef Schachtner für die Unterstützung im Labor. Für das Korrigieren der Arbeit möchte ich mich besonders bei Sandra Prell, Susanna Vazac und Klaus Wutz bedanken. Des Weiteren danke ich meinen Kollegen und Kolleginnen Anne Wolter, Dr. Caroline Peskoller, Dr. Christian Cervino, Christine Sternkopf, Dr. Christoph Haisch, Dr. Clemens Helmbrecht, Gerhard Pappert, Johannes Schmid, Maria Knauer, Dr. Markus Knauer, Mattheo Carrara, Dr. Philipp Stolper, Susanna Mahler, Dr. Thomas Baumann und XiangJiang Liu, sowie allen hier nicht namentlich Erwähnten.

Mein ganz besonderer und liebevoller Dank gilt meiner Mutter, die leider viel zu früh von uns gegangen ist. Meinen Brüdern Ignaz und Franziskus, meiner Tante Anja, meinen Großeltern Elisabeth und Rolf und meiner Verlobten HuiBin Wei danke ich von Herzen für die uneingeschränkte Unterstützung.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

Karsunke X. Y. Z., Pschenitza M., Rieger M., Weber E., Niessner R., Knopp D., Screening and characterization of new monoclonal anti-benzo[a]pyrene antibodies using automated flow-through microarray technology, *J. Immunol. Meth.* **2011**, in press, doi:10.1016/j.jim.2011.06.016.

Sauceda-Friebe J. C., Karsunke X. Y. Z., Vazac S., Biselli S., Niessner R., Knopp D., Regenerable immuno-biochip for ochratoxin A determination in green coffee extract using an automated microarray chip reader with chemiluminescence detection, *Anal. Chim. Acta* **2011**, 689, 234-242.

Karsunke X. Y. Z., Niessner R., Seidel M., Development of a Multichannel Flow-through Chemiluminescence Microarray for Parallel Calibration and Detection of Pathogenic Bacteria, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 395, 1623-1630.

„Wer sich gefangen gibt im Gefängnis seiner Trägheit, ist tot schon vor der Zeit, nutzlos ist sein Tun, sinnlos seine Reden.“

Rudi Benzien

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung und Problemstellung.....	1
II Theoretische Grundlagen.....	4
1 Getreiderelevante Mykotoxine.....	5
1.1 Vorkommen, Bedeutung und Klassifizierung.....	5
1.1.1 Aflatoxine.....	6
1.1.2 Ochratoxine.....	8
1.1.3 Fusarientoxine.....	9
1.2 Analytik von Mykotoxinen.....	13
1.2.1 Probennahme, -extraktion und -aufreinigung.....	13
1.2.2 Trenn- und Detektionsverfahren.....	15
1.2.3 Immunanalytische Verfahren.....	16
2 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe.....	21
2.1 Vorkommen und Bedeutung.....	21
2.2 Analytik von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen.....	25
2.2.1 Klassische Trenn- und Detektionsverfahren.....	25
2.2.2 Immunanalytische Verfahren.....	26
2.2.3 Marktstudie zu kommerziell erhältlichen Testkits.....	28
3 Antikörper.....	31
3.1 Typen und Strukturen von Antikörpern.....	31
3.2 Herstellung poly- und monoklonaler Antikörper.....	34
3.3 Herstellung rekombinanter Antikörper.....	36
3.4 Charakterisierung von Antikörpern.....	40

III Ergebnisse und Diskussion.....	44
1 Mikroarray für die parallele Detektion von Mykotoxinen.....	45
1.1 Herstellung der Mikroarraychips.....	45
1.2 Optimierung des Durchflussassays.....	52
1.3 Messung von Zearalenon.....	54
1.4 Validierung und Messung von Realproben.....	56
1.4.1 Kreuzreaktivitäten.....	56
1.4.2 Regenerierbarkeit der Mikroarraychips.....	57
1.4.3 Durchführung kompetitiver Immunoassays.....	59
1.4.4 Messung von Realproben.....	63
2 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Benzo[a]pyren.....	67
2.1 Synthese von Hapten-Protein-Konjugaten.....	67
2.2 Immunisierung, Fusionierung und Zellkulturüberstandsscreening.....	71
2.3 Entwicklung eines Chip-basierten Screeningverfahrens.....	73
2.4 Sensitivität und Selektivität der monoklonalen Antikörper.....	77
2.4.1 Bestimmung der Sensitivität mittels ELISA.....	77
2.4.2 Affinitätsbestimmung mit Oberflächenplasmonenresonanz.....	79
2.4.3 Bestimmung der Kreuzreaktivitäten.....	84
2.4.4 Messung von Realproben.....	86
2.5 Entwicklung weiterer Immunoassays.....	87
2.5.1 Oberflächenplasmonenresonanz.....	87
2.5.2 Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay.....	91
2.5.3 Weitere Optimierung des indirekt kompetitiven ELISAs.....	95
3 Herstellung rekombinanter Antikörper gegen Benzo[a]pyren.....	99
3.1 Strategie zur Produktion der scFv-Fragmente.....	99
3.2 Herstellung der Vektoren.....	100
3.3 Expression und Reinigung der scFv-Fragmente.....	105
3.4 Sensitivität und Selektivität der scFv-Fragmente.....	110
IV Zusammenfassung und Ausblick.....	118

V Experimenteller Teil.....	123
1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	124
1.1 Geräte.....	124
1.2 Software.....	125
1.3 Antikörper und Antigene.....	126
1.4 Chemikalien und Materialien.....	126
1.5 Puffer für ELISA (Mikrotiterplatte).....	130
1.6 Sonstiges.....	132
2 Standardprozeduren.....	133
2.1 Synthese von Hapten-Peptiden.....	133
2.1.1 Synthese von AFB2-CMO.....	133
2.1.2 Synthese von ZEA-CMO.....	133
2.1.3 Festphasenpeptidsynthese.....	134
2.2 Herstellung von Mykotoxin-Mikroarrays.....	136
2.3 Qualitative und quantitative Bestimmung von Mykotoxinen am MCR 3.....	138
2.3.1 Probenvorbereitung und -extraktion.....	138
2.3.2 Chemilumineszenzmessungen am MCR 3.....	139
2.3.3 Auswertung mit SIP 0.4.....	140
2.4 Synthese von Hapten-Protein-Konjugaten.....	141
2.5 Immunisierungsprotokoll zur Herstellung monoklonaler Antikörper.....	142
2.6 Indirekt nichtkompetitiver ELISA (Screening).....	143
2.7 Direkt nichtkompetitiver ELISA (Screening).....	143
2.8 Indirekt kompetitiver ELISA.....	144
2.9 Kreuzreaktivitätstests.....	144
2.10 Mikroarray basiertes Zellkulturüberstandsscreening.....	145
2.11 Oberflächenplasmonenresonanzmessungen.....	146
2.12 Entwicklung eines Fluoreszenzpolarisationsimmunoassays (FPIA).....	147

3 Mikrobiologische und molekularbiologische Techniken.....	150
3.1 Reagenzien, Materialien und Geräte für das mikrobiologische Arbeiten..	150
3.2 Methoden für das mikrobiologische Arbeiten.....	155
3.2.1 Allgemeine Methoden.....	155
3.2.2 Herstellung der cDNA aus Hybridomzellsedimenten.....	157
3.2.3 PCR zur Amplifizierung der V _H und V _L	157
3.2.4 Klonierung neuer DNA in den TOPO [®] TA-Vektor.....	161
3.2.5 Klonierung neuer DNA in den Vektor pIT2#2.....	161
3.2.6 Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i>	162
3.2.7 Elektropolarisation.....	163
3.2.8 Extraktion und Reinigung der DNA aus Bakterienzellen.....	163
3.2.9 PCR für das Screening der ausgewählten Klone.....	164
3.2.10 Synthese und Reinigung von löslichen scFv.....	164
3.2.11 Indirekt kompetitiver ELISA für scFvs.....	166
3.2.12 Bestimmung der Affinitätskonstanten der scFv-Fragmente.....	167
VI Abkürzungsverzeichnis.....	169
VII Literaturverzeichnis.....	174

I Einleitung und Problemstellung

Das Bundesamt für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz wirbt mit dem Slogan „Sichere Lebensmittel zu gewährleisten ist eine tägliche Verpflichtung für alle Beteiligten.“ Um dieser Verpflichtung nachzugehen, gibt es in Deutschland und in der Europäischen Union zahlreiche Verordnungen für gesetzliche Höchstmengen von Schadstoffen in Lebensmitteln und ein ausgedehntes Lebensmittelkontrollsystem. Da Lebensmittel in großem Maßstab hergestellt, im- und exportiert und konsumiert werden, müssen robuste und vor allem schnelle Verfahren zur Detektion von chemischen und biologischen Kontaminationen in Lebensmitteln eingesetzt und entwickelt werden. Hauptsächlich kommen hierbei die validierten chromatographischen Methoden, wie die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Gaschromatographie (GC), mit einer Vielzahl von Detektoren zum Einsatz. Ein Nachteil dieser Methoden ist die zeit- und kostenintensive Probenvorbereitung und -reinigung. Alternativ können immunologische Verfahren zum schnellen Screening von Lebensmitteln zum Einsatz kommen, die auf eine Probenaufreinigung verzichten. Immunologische Methoden sind häufig weniger genau, dafür aber schneller und einfacher durchzuführen als chromatographische.

Ziel dieser Arbeit war es, schnelle immunanalytische Verfahren zur Detektion von Mykotoxinen in Getreide und von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs) in Trinkwasser zu entwickeln. Bei der qualitativen und quantitativen Bestimmung von Mykotoxinen stand die Methodenentwicklung im Vordergrund, bei der Detektion von PAKs in Trinkwasser lag der Schwerpunkt auf der Entwicklung neuer hoch affiner Antikörper.

Mykotoxine sind sekundäre Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen, die u. a. Reis, Kaffee, Wein, ölhaltige Samen und Getreide befallen. Sie zeichnen sich nicht nur durch ihre akute Toxizität aus, sondern sind meist auch mutagen und kanzerogen. Schimmelpilze können Feldfrüchte schon auf dem Feld oder später bei der Lagerung befallen. Im Fall von Getreide ist der erste Verarbeitungsschritt nach der Ernte meist das Mahlen. Der Müller muss beim Ankauf des Getreides schnell und zuverlässig entscheiden können, ob das Getreide durch Mykotoxine kontaminiert ist. In der Europäischen Union und in Deutschland liegen für acht Mykotoxine bzw. Mykotoxinklassen gesetzlich vorgeschriebene Höchstmengen vor. Die Grenzwerte für die Aflatoxine und Ochratoxin A liegen im unteren $\mu\text{g}/\text{kg}$ -Bereich, sind damit besonders streng und stellen eine hohe Anforderung an die Entwicklung einer Methode zum Nachweis solch geringer Kontaminationen dar. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der immunanalytischen Detektion von Aflatoxinen, Ochratoxin A und Zearalenon in Getreide

und Getreideprodukten. Die qualitative und quantitative Analyse soll mittels Chemilumineszenz-Durchfluss-Mikroarray durchgeführt werden. Als Ausleseplattform für den Mikroarray soll der am Institut für Wasserchemie entwickelte *Munich Chip Reader 3* (MCR 3) dienen. Diese Problemstellung schließt die Synthese und Charakterisierung von geeigneten Mykotoxinderivaten, die Chipherstellung, die Assayoptimierung, sowie die Validierung der neuen Methode und die Messung von Realproben ein.

Die zweite Aufgabenstellung bestand in der Entwicklung immunanalytischer Methoden zur Detektion von PAKs im Trinkwasser. PAKs kommen ubiquitär in der Umwelt vor, sind toxikologisch sehr bedenklich und werden daher als prioritäre Umweltschadstoffe angesehen. Die Trinkwasserverordnung belegt das besonders toxische Benzo[a]pyren (B[a]P) mit einem Grenzwert von 10 ng/L. Um eine laufende Kontrolle des Trinkwassers zu gewährleisten, ist das Interesse an schnellen immunanalytischen Methoden groß. Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit sollte auf der Antikörperentwicklung liegen, da bisher kein Antikörper generiert werden konnte, dessen Affinität den strengen gesetzlichen Höchstmengen von 10 ng/L für B[a]P in Trinkwasser gerecht wird. Vorangegangene Arbeiten lassen vermuten, dass der herkömmliche Weg zur Herstellung monoklonaler Antikörper keine ausreichend affinen Antikörper generieren kann, um eine Nachweisgrenze von 10 ng/L für B[a]P zu erreichen. Deshalb war die Produktion von rekombinanten Antikörpern auf Basis der genetischen Information von anti-B[a]P-Antikörper produzierenden Hybridomzellen angedacht. Es sollten neue monoklonale anti-B[a]P-Antikörper generiert werden, wobei ein Chip-basiertes Screeningverfahren zur schnellen Detektion von positiven Klonen entwickelt werden sollte. Anschließend sollten die affinsten Klone ausgewählt werden, um eine rekombinante Antikörperbibliothek aufzubauen. Die genetische Rekombination verschiedener leichter und schwerer Ketten könnte einen Weg zu hoch affinen rekombinanten Antikörperfragmenten (scFv) darstellen. Neben der Herstellung der rekombinanten Antikörper sollten diese und die monoklonalen Antikörper bezüglich ihrer Affinität und Selektivität charakterisiert werden. Außerdem sollten immunanalytische Techniken zur Detektion von B[a]P in Trinkwasser entwickelt werden. Neben den klassischen direkten und indirekten *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISA) sollten ein Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay (FPIA) und ein Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) basierter Assay entwickelt werden.

II Theoretische Grundlagen

1 Getreiderelevante Mykotoxine

1.1 Vorkommen, Bedeutung und Klassifizierung

Schimmelpilze leisten, neben Bakterien und Hefen, einen entscheidenden Beitrag zur Biodegradation. Sie zersetzen organische Rückstände und tragen damit zur Mineralisierung und Humusbildung bei. Diese StoffwechsellLeistungen können technologisch und medizinisch von Nutzen sein. Allerdings verursachen Schimmelpilze auch die Vernichtung von Futter- oder Nahrungsmitteln. Vor allem in feuchtwarmen Regionen der Erde werden große Teile der Ernte (z. B. Getreide, Nüsse oder Soja) durch Pilzwachstum unbrauchbar (Mücke, 2004). Dabei können Schimmelpilze nicht nur Erntegüter vernichten, sondern auch Vergiftungen durch Mykotoxine hervorrufen. Mykotoxine sind sekundäre Stoffwechselprodukte von imperfekten Pilzen und Ascomyceten (Mücke, 2004). Es ist nicht immer möglich, die Mykotoxine von weiteren Sekundärmetaboliten, wie den Antibiotika, eindeutig zu unterscheiden. Zum einen können Mykotoxine antibiotisch aktiv sein (z. B. Patulin), zum anderen können auch Antibiotika toxische Nebenwirkungen haben (z. B. Streptomycin).

Die durch Mykotoxine hervorgerufenen Vergiftungen (Mykotoxikosen) sind schon seit dem 9. Jahrhundert bekannt. Bei der damals häufig auftretenden Krankheit „Sankt-Antonius-Feuer“ oder dem „Heiligen Feuer“ handelte es sich um Ergotismus, der Mutterkornvergiftung durch verpilztes Getreide (De Costa, 2002). Ausschlaggebend für die Mykotoxinforschung der Neuzeit war allerdings erst die sog. *Turkey-X-Disease* 1960 in Großbritannien (Blount, 1961). Damals verendeten 100000 Truthähne und Enten, nachdem sie mit verseuchtem Getreide gefüttert wurden. Die daraufhin entdeckten Difuranocoumarine wurden nach deren Erzeugern, den Schimmelpilzen *Aspergillus Flavus*, Aflatoxine genannt. In den Jahren 1960 bis 1975, auch als „Mykotoxin-Goldrausch“ bekannt, wurde die Mykotoxinforschung intensiviert (Maggon, 1977). Mittlerweile sind ca. 400 Verbindungen bekannt, die unter dem Namen Mykotoxin geführt werden (Bennett, 2003).

Die *Food and Agriculture Organization* (FAO) der Vereinten Nationen schätzt die Kontaminationsrate von Lebensmitteln mit Mykotoxinen weltweit auf etwa 25 %. Im Lebensmittelbereich sieht auch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) in Mykotoxinen eine signifikante Quelle für Vergiftungen von Mensch und Tier (WHO, 2002). Unter den chemischen Giften (Mykotoxine, Phycotoxine und Phytotoxine) hebt die WHO die Mykotoxine besonders hervor, da diese große Mengen an Erntegütern kontaminieren.

Die Regulierungen für Mykotoxinhöchstmengen in Lebensmitteln sind weltweit sehr unterschiedlich (FAO, 2003), wobei die Zahl der Verordnungen ständig zunimmt. Innerhalb der EU sind die zulässigen Höchstmengen für Mykotoxine in Lebensmitteln über die „Verordnung (EG) Nr. 1881/2006“ festgelegt. Zusätzlich gilt in Deutschland die „Mykotoxin-Höchstmengenverordnung“ (MHmV, 2004). Geregelt sind Grenzwerte für Aflatoxin B1, Aflatoxin M1, die Summe der Aflatoxine B1, B2, G1 und G2, Ochratoxin A, Zearalenon, Deoxynivalenol, Summe der Fumonisine B1 und B2 und Patulin. Außerdem sind Grenzwerte für T-2- und HT-2-Toxin angedacht. Im Folgenden wird genauer auf die Mykotoxine eingegangen, die von der deutschen Mykotoxin-Höchstmengenverordnung erfasst werden, wobei der Schwerpunkt auf den in dieser Arbeit behandelten Aflatoxinen, Ochratoxin A und Zearalenon liegt.

1.1.1 Aflatoxine

Aflatoxine werden hauptsächlich von den Schimmelpilzen *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* gebildet und kommen vor allem in den Tropen und Subtropen vor (Shephard, 2008). Die Mykotoxine Aflatoxin B1 (AFB1) und Aflatoxin B2 (AFB2) werden von *A. flavus* gebildet. *A. parasiticus* produziert neben AFB1 und AFB2 auch Aflatoxin G1 (AFG1) und Aflatoxin G2 (AFG2). Die Einteilung in die Gruppen B (blau) und G (grün) erfolgte aufgrund ihrer Fluoreszenz.

A. flavus und *A. parasiticus* befallen eine ganze Reihe von Lebensmitteln: Reis, Mais, Nüsse, Baumwolle und Getreide wie Hafer, Weizen und Gerste (Romero-Gonzales, 2009; Urusov, 2010). Auch wenn ein Pilzbefall nicht notwendigerweise zur Bildung von Mykotoxinen führt, gibt es zahlreiche Bemühungen, den Pilzbefall schon auf dem Feld zu verhindern (Cleveland, 2003). Des Weiteren wird während der Lagerung von Lebensmitteln versucht, die Entstehung und das Wachstum von sog. Lagerpilzen zu verhindern.

Neben den Aflatoxinen B1, B2 und G1, G2 sind die Aflatoxine M1 und M2 (AFM1, AFM2) von Bedeutung. Säugetiere wandeln die Mykotoxine AFB1 und AFB2, die durch die Nahrung aufgenommen werden, durch Hydroxylierung in die Metaboliten AFM1 und AFM2 um (Parker, 2009; Manetta, 2005). Da diese hauptsächlich durch die Muttermilch abgegeben werden, wurden sie mit M für Milch bezeichnet. AFM1 und AFM2 stellen nicht nur in der Milch eine Gefahr dar, sondern gelangen auch in sämtliche Milchprodukte (Käse, Joghurt, usw.), da sie durch die Nachbehandlung der Milch nicht entfernt werden können.

In Abbildung 1 sind die sechs wichtigsten Vertreter der bisher 20 bekannten Aflatoxine dargestellt.

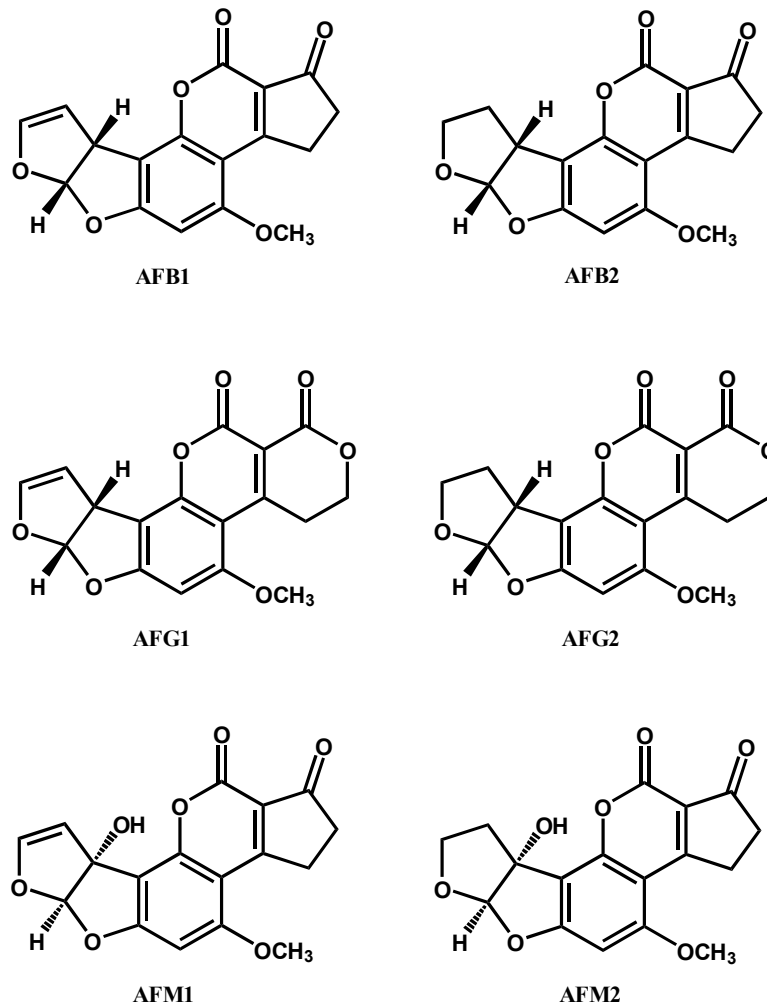


Abbildung 1: Chemische Struktur der bedeutendsten Vertreter der Aflatoxine.

Auf den ersten Blick wird deutlich, dass die Aflatoxine strukturell sehr ähnlich sind, was die Entwicklung von spezifischen Antikörpern gegen ein Aflatoxin sehr schwierig macht (siehe Kap. III.1.4.1). Aflatoxine sind Coumarine, die mit weiteren heterozyklischen Fünf- und Sechsringen anelliert sind. Sie lassen sich in die Dihydrofuranofurane B1, B2 und M1, sowie die Tetrahydrofuranofurane B2, G2 und M2 unterteilen. Die Aflatoxine sind hitzebeständig und im Sauren äußerst stabil, weshalb sie durch Nachbehandlung von kontaminierten Lebensmitteln kaum zu entfernen sind (Cazzaniga, 2001). Aufgrund der zyklischen Laktone sind sie im Basischen allerdings hydrolyseempfindlich.

Aflatoxine sind akut toxische, immunsuppressive, mutagene, teratogene und karzinogene Substanzen (Peraica, 1999; Hussein, 2001). Dabei gehört AFB1 zu den stärksten chemischen Kanzerogenen überhaupt. Beim Menschen wird die letale Dosis von AFB1 auf 1-10 mg/kg geschätzt (Mücke, 2004). Hinsichtlich der akuten und chronischen Vergiftung durch Aflatoxine stehen Schädigungen der Leber im Vordergrund. Bei Untersuchungen in Kenia

und Swasiland wurde sogar ein synergistischer Effekt von Aflatoxinen und Hepatitis B-Viren bei der Entstehung von Leberkrebs nachgewiesen (Henry, 2002). Die Toxizität nimmt in der Reihenfolge B1>G1>B2>G2 ab. Dies ist auf die Biotransformation der Aflatoxine zurückzuführen (Eaton, 1994). Die Oxidation der Doppelbindung am äußeren Furanring von AFB1 und AFG1 führt zu den reaktiven 8,9-Epoxiden. Die Epoxide können Nucleinsäuren alkylieren und entfalten damit eine hohe mutagene und kanzerogene Wirkung. Deshalb wurden die Aflatoxine 1987 von der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) als „krebserregend beim Menschen (Kategorie I)“ eingestuft.

Aufgrund der hohen akuten Toxizität und der Kanzerogenität gelten nach der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Europäischen Union und der deutschen Mykotoxinhöchstmengenverordnung besonders niedrige Grenzwerte. Für die in dieser Arbeit relevanten Lebensmittel (Getreide und Getreideerzeugnisse) gilt für AFB1 ein Grenzwert von 2 µg/kg und für die Summe der Aflatoxine B1, B2, G1 und G2 ein Grenzwert von 4 µg/kg.

1.1.2 Ochratoxine

Ochratoxine werden von zahlreichen Penicillien und Aspergillien, wie dem *Penicillium verrucosum* und dem *Aspergillus ochraceus*, gebildet (Thirumala-Devi, 2000). Weitaus am häufigsten und auch am toxischsten ist das in Abbildung 2 dargestellte Ochratoxin A (OTA). Erstmals wurde OTA 1965 bei *A. ochraceus* nachgewiesen, der meist Getreide, Erdnüsse und Gemüse befällt (Mücke, 2004). Neben OTA kann in seltenen Fällen das nicht chlorierte Ochratoxin B in Lebensmitteln nachgewiesen werden (Pohland, 1992). OTA ist anders als die Aflatoxine häufig in Lebensmitteln unserer Klimaregion zu finden. Eine Untersuchung der amtlichen Lebensmittelüberwachung Deutschland ergab bei einer Zahl von 301 untersuchten Getreideproben 4 % positive Proben (Mücke, 2004). Die mittlere Konzentration an OTA lag dabei zwischen 0.1 und 15.4 µg/kg. Deshalb kann OTA in Deutschland in nahezu allen Humanblutseren nachgewiesen werden (Rosner, 2000).

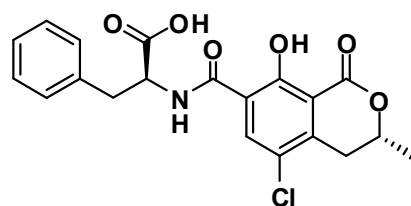


Abbildung 2: Chemische Struktur von Ochratoxin A (OTA).

Bei dem Grundgerüst von OTA handelt es sich um ein Iso-Coumarin, das mit der Aminosäure β -Phenylalanin über eine Amidbindung verknüpft ist. OTA ist wie auch die Aflatoxine sehr hitzebeständig und im Sauren stabil, aufgrund des zyklischen Esters im Basischen aber labil.

Der LD₅₀ von OTA liegt bei Ratten und Mäusen bei über 10 mg/kg. Folglich ist die akute Toxizität von OTA als toxisch bis sehr toxisch einzustufen. OTA ist potentiell hepatotoxisch und nephrotoxisch und wirkt außerdem mutagen, kanzerogen, teratogen und immunsuppressiv (Dirheimer, 1991). Auf dem Balkan wurde ein Zusammenhang zwischen der Ochratoxinaufnahme und endemischen Erkrankungen und Tumoren der Niere nachgewiesen (De Groene, 1996). 1993 wurde OTA durch die IARC als „möglicherweise krebserregend beim Menschen (Kategorie 2B)“ eingestuft.

Die Grenzwert für OTA in Getreide liegt nach der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Europäischen Union und der deutschen Mykotoxinhöchstmengenverordnung bei 5 μ g/kg. Für Getreideprodukte zum direkten Verzehr liegt der Grenzwert für OTA sogar bei 3 μ g/kg. Dies ist nach den Grenzwerten für Aflatoxine der strengste Grenzwert für Mykotoxine in Getreide. Die Entwicklung neuer Methoden für die Quantifizierung der Aflatoxine und OTA stellt daher in der Mykotoxinanalytik die größten Herausforderungen an den Analytiker dar.

1.1.3 Fusarientoxine

Die Pilzgattung *Fusarium* generiert ein breites Spektrum an strukturell sehr unterschiedlichen Mykotoxinen. Die bekanntesten Vertreter sind die Trichothecene, Fumonisine und Zearalenon (siehe Abbildung 3). Die Schimmelpilze der Gattung *Fusarium* sind in den gemäßigten Klimazonen Europas die bedeutendsten Mykotoxinproduzenten. Vor allem Hafer, Mais und Weizen sind in Europa stark vom Fusarienbefall betroffen und verursachen Ernteeinbußen (Krska, 2001).

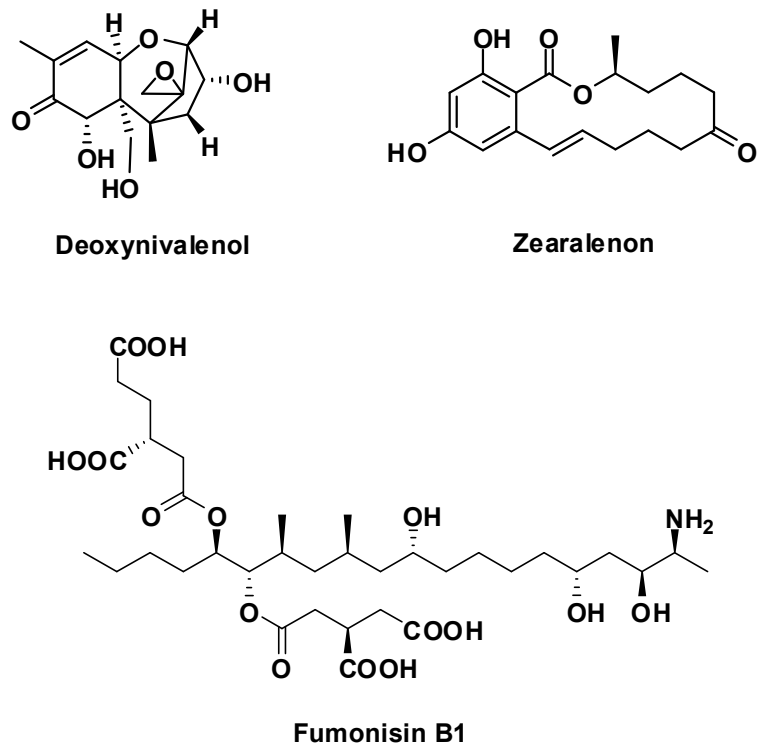


Abbildung 3: Gesetzlich relevante Mykotoxine der Pilzgattung *Fusarium*: Deoxynivalenol (DON), Zearalenon (ZEA) und Fumonisin B1.

Zearalenon (ZEA) ist ein makrozyklisches Lakton (siehe Abbildung 3), das hauptsächlich von Schimmelpilzen der Gattung *Fusarium graminearum* und *Fusarium culmorum* gebildet wird (Cramer, 2007). Diese Pilze kommen in allen Klimazonen Europas vor und befallen bevorzugt Getreide, wie Mais, Weizen, Gerste, Hafer und Roggen. Es kommt auch zur Verschleppung von ZEA in die Milch von Säugetieren. Da zur Bierherstellung Gerste und Weizen verwendet wird, kann ZEA häufig im Bier nachgewiesen werden (Maragou, 2008). In einer im Jahre 2005 veröffentlichten Studie zu ZEA in Getreide, Getreideprodukten, sowie in Milch, zeigte sich, dass in Deutschland in mehr als der Hälfte aller Produkte ZEA nachgewiesen werden konnte (Kappenstein, 2005). Mit Ausnahme des Maismehls und Maiskeimöls lagen jedoch alle Werte unterhalb der gesetzlichen Grenzwerte. ZEA ist das wichtigste Mykotoxin mit östrogenener Wirkung. Es ist ein nicht steroides Mykotoxin, das aber kompetitiv an intrazelluläre Östrogenrezeptoren bindet (Kuiper-Goodman, 1987). Obwohl in Ratten bei einer Langzeitstudie bereits eine kanzerogene Wirkung von ZEA nachgewiesen wurde (Fink-Gremmels, 1994), wurde ZEA durch die IARC als „nicht krebserregend beim Menschen (Kategorie 3)“ eingestuft.

Die deutsche Mykotoxinhöchstmengenverordnung schreibt für ZEA in Getreide zum direkten Verzehr lediglich einen Grenzwert von 50 µg/kg vor. Innerhalb der EU gestalten sich die Grenzwerte etwas komplizierter (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Gesetzlich vorgeschriebene Höchstmengen für ZEA in Getreide durch die Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der EU.

Erzeugnis	Höchstmenge ZEA [µg/kg]
Unverarbeitetes Getreide (außer Mais)	100
Unverarbeiteter Mais	200
Zum menschlichen Verzehr bestimmtes Getreide	75
Zum menschlichen Verzehr bestimmter Mais	200
Brot, feine Backwaren, Kekse, usw.	50
Snacks und Frühstückscerealien aus Mais	50
Getreidebeikost für Säuglinge und Kleinkinder (auch aus Mais)	20

Die Gruppe der Trichothecene umfasst nach heutigem Kenntnisstand ca. 170 Substanzen (Grove, 1988; Grove 1993). Die bekanntesten Vertreter der Trichothecene sind Deoxynivalenol (DON), T-2 Toxin und HT-2 Toxin. Sie werden hauptsächlich von den Schimmelpilzen *Fusarium colmorum*, *F. graminearium*, *F. roseum*, *F. sporotrichioides* und *F. sambucinum* gebildet (Reiß, 1986). Trichothecene werden meist als Kontaminanten in Hafer, Mais, Weizen, Gerste und Reis gefunden. Traurige Berühmtheit erlangten die sog. T-Toxine zu Zeiten des kalten Krieges, da sie von der sowjetischen Armee zur chemischen Kriegsführung eingesetzt wurden (Seagrave, 1983).

Strukturell handelt es sich um tetrazyklische, sesquiterpenoide 12,13-Epoxytrichothec-9-en Ringsysteme, die vermutlich aufgrund der Epoxidfunktion giftig sind (Ehrlich, 1987). DON und das T-2 Toxin können sowohl die Protein- als auch der DNA-Synthese hemmen (Schneider, 2000). Außerdem wirken Trichothecene dermatotoxisch, neurotoxisch, hämorrhagisch, teratogen und immunsuppressiv (Mücke, 2004).

Bisher existiert in Europa nur für das Trichothecen DON ein gesetzlicher Grenzwert in Lebensmitteln. Die gesetzlich erlaubte Höchstmenge an DON in Getreide liegt bei 500 µg/kg, für Brot und Teigwaren bei 350 µg/kg. Für die Trichothecene T-2 und HT-2 Toxin sind Grenzwerte angedacht, aber bisher noch nicht eingeführt, obwohl das T-2 Toxin giftiger als DON ist. Während der LD₅₀ bei der Maus für DON 46 mg/kg beträgt, liegt er für das T-2 Toxin bei 4-7 mg/kg (Krska, 2001; Marquardt, 1994).

Die Fumonisine wurden 1988 das erste Mal beschrieben (Gelderbloom, 1988; Bezuidenhout, 1988). Sie werden hauptsächlich von *Fusarium verticillioides*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* und *Fusarium nygamai* gebildet (Rheeder, 2002). Die bedeutendsten Vertreter der Fumonisine sind das Fumonisin B1 (siehe Abbildung 3) und B2. Die Fumonisine sind von besonderem Interesse, da sie weltweit große Mengen an Getreide, vor allem Mais, kontaminieren. Fumonisin B1 wirkt hepatotoxisch und ist ein potentes Nierengift. Außerdem kann es bei dauerhafter Aufnahme über die Nahrung Krebs erzeugen (Mücke, 2004).

Die erlaubten Höchstmengen in Lebensmitteln unterscheiden sich zwischen EU und Deutschland. Die Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der EU legt für die Summe der Fumonisine B1 und B2 einen Grenzwert von 2000 µg/kg für unverarbeiteten Mais und 400 µg/kg für Mais oder Maisprodukte zum direkten menschlichen Verzehr fest. Die deutsche Mykotoxinhöchstmengenverordnung hingegen schreibt einen Grenzwert für die Summe der Fumonisine B1 und B2 für Maiserzeugnisse von 500 µg/kg vor. Für Cornflakes gilt ein strengerer Grenzwert von 100 µg/kg.

1.2 Analytik von Mykotoxinen

Eine analytische Methode muss im Wesentlichen nach folgenden Kriterien beurteilt werden: Richtigkeit, Präzision, Reproduzierbarkeit, Selektivität / Spezifität, Robustheit und Nachweisvermögen (Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze und Arbeitsbereich). Damit die Wirtschaftlichkeit gewährleistet bleibt, müssen Analyseverfahren auch sicher, preiswert, automatisierbar und schnell sein. Gerade in der Lebensmittelanalytik ist aufgrund des immensen Probenaufkommens stets ein Kompromiss zwischen optimaler Analysemethode und Wirtschaftlichkeit zu suchen.

Die Analytik von Mykotoxinen umfasst die Probenahme, die Probenvorbereitung, -extraktion und -aufreinigung, sowie die Trenn- und Detektionsverfahren. Da die relevanten Matrices und Mykotoxine sehr vielfältig sind, kommen zahlreiche, sehr unterschiedliche Methoden zum Einsatz. Im Folgenden soll auf relevante Methoden aller Teilbereiche der Mykotoxinanalytik genauer eingegangen werden.

1.2.1 Probennahme, -extraktion und -aufreinigung

Schimmelpilze können bereits auf dem Feld auftreten oder erst später während der Lagerung. Lagerpilze neigen zu inhomogener Verteilung im Erntegut und es ist nicht möglich, falsch negative oder falsch positive Analyseergebnisse gänzlich zu vermeiden (Biselli, 2006). Zu den durch Lagerpilze produzierten Mykotoxinen gehören die Aflatoxine und OTA. Pilze der Gattung *Fusarium* hingegen befallen Getreide großflächig und bereits auf dem Feld (Hart, 1998). Die daraus resultierende homogene Verteilung von Mykotoxinen (DON, ZEA, T-2 Toxin) erleichtert die Probenahme. Innerhalb der EU wird die Probenahme durch die Richtlinien der Europäischen Kommission EG Nr. 98/53 und 2002/26, sowie die Verordnungen EG Nr. 401/2006 und EU Nr. 178/2010 geregelt.

In der Mykotoxinanalytik liegen viele Proben als ganze Frucht vor. Im ersten Schritt müssen die Proben daher trocken oder nass vermahlen und homogenisiert werden (Biselli, 2006). Anschließend wird ein Aliquot entnommen und extrahiert. Zur Extraktion werden organische Lösungsmittel (Methanol, Acetonitril, Ethylacetat) in Kombination mit Wasser eingesetzt. Für die Mehrzahl der relevanten Mykotoxine wird mit 80 % Methanol oder 80 % Acetonitril in Wasser bei Raumtemperatur extrahiert (DIN EN 14123; Vendl, 2009). Lediglich für die gut wasserlöslichen Fumonisine aus Maiserzeugnissen zeigt eine Extraktion bei erhöhter Temperatur und saurem pH-Wert eine höhere Extraktionsausbeute (Lawrence, 2000; De

Girolamo, 2001). Häufig werden zum „Aussalzen“ von Proteinen Salze wie Natriumchlorid, Natriumsulfat oder Magnesiumsulfat zugegeben. Einen guten Vergleich dieser Methoden gibt MOL et al. (Mol, 2008). Neben der Flüssigextraktion ist auch eine überkritische Fluidextraktion (SFE) beschrieben (Liao, 2007). Aufgrund der hohen Kosten für die speziellen Extraktionsgeräte kommt die SFE jedoch nicht routinemäßig zum Einsatz.

Durch die Extraktion mit organischen Lösemitteln werden auch zahlreiche Komponenten der Lebensmittelmatrix gelöst. Deshalb benötigt die Mehrzahl aller Trenn- und Detektionsverfahren eine Probenaufreinigung. Hierbei kommen Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE), Festphasenextraktion (SPE), Immunoaffinitätsextraktion (IAE) und *Molecular Imprinted Polymers* (MIPs) zum Einsatz (Turner, 2009).

Durch eine LLE mit Hexan oder Cyclohexan können beispielsweise hydrophile Verunreinigungen wie Lipide und Cholesterin entfernt werden. Im kleinen Maßstab ist die LLE sehr effektiv, ist aber sehr zeitaufwendig und stark matrixabhängig (Kühn, 1995).

Für die Anreicherung von OTA und ZEA sind *Molecular Imprinted Polymers* (MIPs) beschrieben (Maier, 2004; Urraca, 2006; Urraca, 2008; Lucci, 2010). MIPs entstehen durch die Copolymerisation von Templat (Analyt oder analytähnliches Molekül) und Monomerbausteinen. Nach dem Herauslösen des Templats kann die frei werdende Struktur als Bindungsstelle für den Zielanalyten dienen. Probleme dieser Technologie liegen in der meist geringen Selektivität der MIPs aufgrund der starren Bindungsstelle und der fehlenden Reproduzierbarkeit des Herstellungsprozesses.

Heutzutage kommt hauptsächlich die SPE in Kombination mit chromatographischen Trennverfahren zum Einsatz. Bei der SPE werden Wegwerfkartuschen z. B. mit funktionalisiertem Silica-Gel befüllt. Meist handelt es sich bei der stationären Phase um hydrophobe Materialien wie Octadecyl-, Phenyl-, Pentafluorophenylsilane oder anionische und kationische Ionentauschmaterialien. Der mit Wasser oder Puffer verdünnte Probenextrakt wird über die Kartusche geleitet, wobei sich die meist hydrophoben Mykotoxine in der stationären Phase lösen und die Matrixbestandteile größtenteils mit Puffer abgewaschen werden können. Die Elution erfolgt mit organischen Lösemitteln wie Methanol oder Acetonitril. Dieses Verfahren wird für zahlreiche Mykotoxine in verschiedenen Matrices angewendet (Hernandez, 2006; Radova, 1998; Shephard, 1998). Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, dass es keine SPE-Kartusche gibt, mit der sich alle gesetzlich relevanten Mykotoxine aufreinigen lassen (Turner, 2009).

Neben der SPE kommt vor allem die Immunoaffinitätsextraktion (IAE), auch Immunoaffinitätschromatographie oder Immunoaffinitätsanreicherung genannt, zur

Aufreinigung von Lebensmittelextrakten zum Einsatz (Hage, 1998; Weller, 2000). Die IAE macht sich die selektive und sensitive Antikörper-Antigen-Wechselwirkung zu Nutze. Im ersten Schritt wird die Probe über Einwegkartuschen mit kovalent immobilisierten Antikörpern geleitet. Die Antikörper binden hoch selektiv den Analyten und die Probenmatrix kann unter milden Bedingungen abgewaschen werden. Durch Wechsel des pH-Werts, der Ionenstärke oder des Lösungsmittels (Methanol, Acetonitril) kann der Analyt eluiert werden. Vorteil der IAE gegenüber der SPE und den MIPs ist die hohe Selektivität. Die hohen Kosten für die Einwegkartuschen sind von Nachteil. Außerdem ist die Zugänglichkeit von Antikörpern ein limitierender Faktor für die breite Anwendung. Die IAE wird heutzutage routinemäßig für die Aufreinigung und Anreicherung von Mykotoxinen verwendet (Göbel, 2004; Castegnaro, 2006; Cervino, 2008b).

1.2.2 Trenn- und Detektionsverfahren

Für die qualitative und quantitative Analyse von Mykotoxinen in Lebensmitteln werden traditionell meist chromatographische Methoden wie die Hochleistungsflüssigkeits- (HPLC), Gas- (GC) und Dünnschichtchromatographie (TLC) eingesetzt (Rychlik, 2008; Olsson, 2002; Liang, 1996).

Die TLC wird meist als schnelles Screeningverfahren verwendet. Eine genaue Quantifizierung ist nur schwer möglich, da die visuelle Abschätzung der Fluoreszenz oder der Einsatz von Sprühreagenzien zur Visualisierung nicht reproduzierbar ist. Allerdings lassen sich Matrixbestandteile durch zweidimensionale TLC häufig vom Analyten abtrennen (Pittet, 2005), was die Reproduzierbarkeit erhöht. Da die TLC kostengünstig und mit geringem Geräteinsatz verbunden ist, wird sie insbesondere in Entwicklungsländern häufig angewendet (Mankar, 2005).

Da die Trichothecene nur schwach fluoreszieren und die klassischen HPLC-Detektoren (UV/vis und Fluoreszenz) wenig sensitiv für Trichothecene sind, sind einige Methoden für die GC beschrieben (Langseth, 1998; Krska, 2001). Allen GC-Methoden gemein ist die Derivatisierung der Hydroxylgruppen der Trichothecene mittels Trimethylsilan, Trifluoroacetyl oder verwandten Reagenzien (Ikediobi, 1971; Romer, 1978). Die Detektion erfolgt mittels Flammenionisationsdetektor (FID), Elektroneneinfangdetektor (ECD) oder Massenspektrometrie (MS). Die GC kommt allerdings aufgrund der starken Matrixeinflüsse selten in Routinelabors zum Einsatz.

Das gängigste Verfahren zur Quantifizierung von Mykotoxinen ist heutzutage die HPLC (Hoerger, 2009). Zum einen wird die Fluoreszenzdetektion und zum anderen die

Massenspektrometrie zur Detektion eingesetzt (Khayoon, 2008; Grió, 2010; Monbaliu, 2010). Bei der Fluoreszenzdetektion der Aflatoxine ist eine Nachsäulenderivatisierung notwendig, um die Aflatoxine B1 und G1 ausreichend sensitiv detektieren zu können. Diese erfolgt meist durch Oxidation von AFB1 und AFG1 (Qinto, 2009). Die Detektion mittels Fluoreszenzdetektor ist jedoch nur bedingt multianalytisch (Cervino, 2009). Die massenspektrometrische Detektion (LC-MS, LC-MS/MS) hingegen ermöglichte bereits die parallele Detektion von 87 Mykotoxinen (Sulyok, 2007). Für die HPLC-Analytik ist, wie auch bei der GC, eine intensive Probenvorbereitung und Reinigung mittels SPE oder IAE notwendig. Zusätzlich muss eine matrixabhängige Kalibrierung erfolgen, was die Methodenentwicklung und -validierung für die große Vielfalt an kontaminierten Lebensmitteln sehr aufwendig macht. Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Wiederfindung mittels LC-MS/MS stellt die Stabilisotopenverdünnungsanalyse dar (Cervino, 2008b). Die Wiederfindung kann hierbei anhand bekannter zugesetzter Mengen an stabilisotopenmarkierten Analyten korrigiert werden. Limitierender Faktor dieser Methode ist lediglich die Zugänglichkeit der stabilisotopenmarkierten Mykotoxine.

Neben den klassischen chromatographischen Methoden sind für die Detektion von Mykotoxinen auch die Kapillarelektrophorese (CE) mit Fluoreszenzdetektion (Maragos, 1995; Pena, 2002; Arroyo-Manzanares, 2010) oder in Kombination mit MS (Hines, 1995) möglich.

1.2.3 Immunanalytische Verfahren

Ein Nachteil der klassischen analytischen Techniken in der Mykotoxinanalytik ist die notwendige intensive Probenvorbereitung. Um diese zu umgehen, macht man sich die spezifische Antigen-Antikörper-Wechselwirkung zu Nutze. Antikörper können nicht nur Proteine und andere große Strukturen, sondern auch Haptene, wie die Mykotoxine, selektiv und sensitiv erkennen. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahrzehnten zahlreiche immunologische Methoden zur qualitativen und semi-quantitativen Mykotoxinanalytik entwickelt. Methoden wie *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA; Barna-Vetro, 1996), Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay (FPIA; Cruz-Aguado, 2008; Shim, 2004), Oberflächenplasmonenresonanz (SPR; van der Gaag, 2003) oder elektrochemische Immunosensoren (Alarcon, 2006) benötigen neben der Flüssig-Fest-Extraktion meist keine oder nur sehr einfache Probenvorbereitungsschritte, wie die Flüssig-Flüssig-Extraktion. ELISA-Test-Kits werden vielfach angewendet, sind einfach durchzuführen und für die Vor-Ort-Analytik verwendbar (Zheng, 2005). Auch zahlreiche Teststreifen für die schnelle Vor-Ort-Analytik wurden entwickelt (Schneider, 1995; Ho, 2002; Tang, 2009). Teststreifen sind

sehr einfach aufgebaut und erlauben eine schnelle Analytik um einen bestimmten Grenzwert. Sie werden in den Probenextrakt eingetaucht bzw. einige Tropfen Extrakt werden darauf gegeben. Antikörper, die sich in lyophilisierter Form auf dem Teststreifen befinden, lösen sich in dem Extrakt und wandern mittels Kapillarkräften in eine Zone, auf der sich immobilisierter Analyt befindet. Dort findet eine Kompetitionsreaktion zwischen evtl. in der Probe vorhandenem Analyten und gebundenem Analyten statt. Je nach Konzentration an freiem Analyten färbt sich der Teststreifen mehr oder weniger stark, was eine einfache optische Kontrolle ermöglicht.

Limitierender Faktor für immunologische Methoden ist die Zugänglichkeit von affinen Antikörpern. In den letzten Jahrzehnten wurden daher zahlreiche Antikörper gegen Mykotoxine produziert. Einige Beispiele affiner Antikörper für gesetzlich relevante Mykotoxine sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Beispiele für Antikörper gegen Mykotoxine und deren Sensitivität (ausgedrückt in Nachweisgrenze (LOD) und/oder Testmittelpunkt (IC₅₀)).

Antigen	LOD	IC ₅₀	Quelle
AFB1	/	3 ng/L	Cervino, 2008a
	/	2.1 µg/L	Li, 2009
	/	1.2 ng/L	Zhang, 2009a
OTA	42 ng/L	0.45 µg/L	Gyöngyösi-Horvath, 1996
	0.12 µg/L	1.2 µg/L	Cho, 2005
	/	0.32 µg/L	Liu, 2008
ZEA	/	14 µg/L	Yuan, 1997
	10 µg/L	/	Pichler, 1998
	/	0.8 µg/L	Burmistrova, 2009
DON	200 µg/L	/	Casale, 1988
	/	600 µg/L	Nicol, 1993
	50 µg/L	/	Sinha, 1995
Fumonisine	50 µg/L	630 µg/L	Azcona-Olivera, 1992
	/	20 µg/L	Yu, 1999
	10 ppb	220 ppb	Min, 2010

Für alle gesetzlich relevanten Mykotoxine in Getreide existieren somit zahlreiche Antikörper, die die Entwicklung immunologischer Methoden ermöglichen. Viele dieser Methoden beruhen auf dem Prinzip des direkt oder indirekt kompetitiven ELISA. Abbildung 4 zeigt das Prinzip des indirekt kompetitiven ELISAs. Hierbei wird der Analyt auf einer Oberfläche immobilisiert. Als Oberfläche können Kunststoff, Glas, Metall und viele weitere Materialien

dienen. Je nach Oberfläche erfolgt die Immobilisierung der Analyten kovalent (Glas, Gold) oder adsorptiv (Kunststoff). Zur Adsorption von kleinen Molekülen in Mikrotiterplatten (MTP) werden die Haptene meist an Proteine gekoppelt. Nach der Immobilisierung des Haptens erfolgt die Konkurrenz. Der Primärantikörper wird mit der Probe inkubiert und anschließend auf die immobilisierten Analyten gegeben. In Abhängigkeit von der Analytkonzentration in der Probe binden mehr oder weniger Primärantikörper an die Oberfläche. Nach einem Waschschrift wird Peroxidase(POD)-markierter Sekundärantikörper zugegeben, der an die Primärantikörper binden kann. Im letzten Schritt wird durch Substratzugabe eine Farbreaktion ausgelöst, die mittels Absorptionsmessung verfolgt werden kann. Anstatt einer Farbreaktion kann auch eine Chemilumineszenzreaktion katalysiert werden. Auch eine Fluoreszenzauslesung oder ein Radioimmunoassay sind möglich.

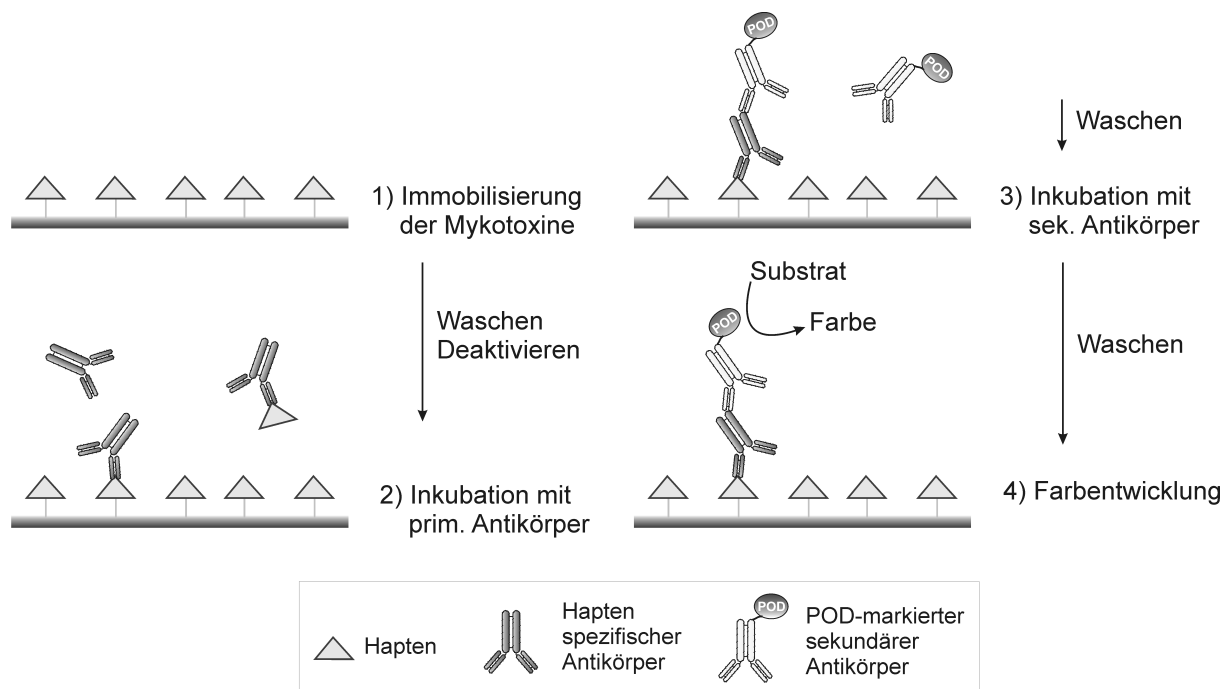


Abbildung 4: Prinzip des indirekt kompetitiven ELISAs: 1) Die Haptene werden immobilisiert (indirekter ELISA). 2) Es erfolgt eine Inkubation der Probe mit dem primären Antikörper (Konkpetition). 3) Die primären Antikörper werden von POD-markierten sekundären Antikörpern erkannt. 4) Durch Zugabe von Substrat wird eine Farbreaktion ausgelöst.

Wird im ersten Schritt nicht der Analyt, sondern der Primärantikörper immobilisiert, so spricht man von einem direkten ELISA. In Abbildung 5 ist der direkt kompetitive ELISA dargestellt. Da Mykotoxine kleine Moleküle sind, besitzen sie nur eine Epitop (Antikörperbindungsstelle), weshalb kein *Sandwich*-ELISA verwendet werden kann. Deshalb

wird POD direkt an das Hapten gekoppelt. Die Konkurrenz findet dann zwischen dem freien Analyten in der Probe und dem Analyt-POD-Konjugat statt. Im letzten Schritt kann wieder eine Farbreaktion erfolgen.

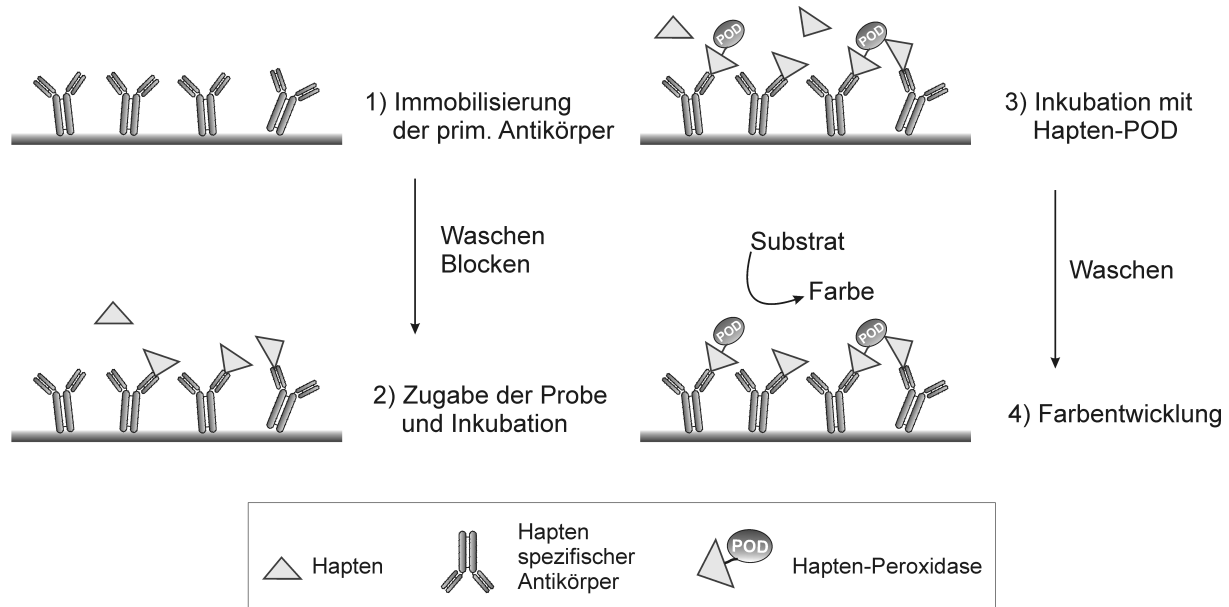


Abbildung 5: Prinzip des direkt kompetitiven ELISAs: 1) Die Primärantikörper werden immobilisiert (direkter ELISA). 2) Es erfolgt eine Inkubation mit der Probe. 3) Anschließend wird mit POD-markiertem Analyten inkubiert (Konpetition). 4) Durch Zugabe von Substrat wird eine Farbreaktion ausgelöst.

Sowohl beim direkten, als auch beim indirekt kompetitiven ELISA ergeben sich für die Kalibrierung sigmoidale Kurvenverläufe. Diese werden am besten durch die 4-Parameter-Logistikfunktion beschrieben (Gottschalk, 2005; Findlay, 2007). Folgende Punkte sind für die Kalibrierung zu beachten: Der Nullpunkt (Blank) darf nicht in die Kalibrierfunktion mit eingehen. Die optimale Anzahl an Kalibrierpunkten beträgt fünf bis acht, wobei der mittlere Kalibrierpunkt in der Nähe des Testmittelpunkts (IC_{50}) liegen sollte (Findlay, 2007).

Eine moderne Methode, die das Prinzip des ELISAs nutzt, ist die Mikroarray-Technologie. Der Begriff Mikroarray setzt sich zum einen aus dem Wort *mikro*, was klein heißt, und zum anderen aus dem Wort *array* zusammen, was frei übersetzt so viel wie die Anordnung in einem Raster bedeutet. Bei der Herstellung einer Messeinheit auf einem Chip beispielsweise aus Glas oder Kunststoff werden Sonden in einem festen Raster immobilisiert. Abbildung 6 zeigt ein mögliches Raster für einen Mikroarraychip.

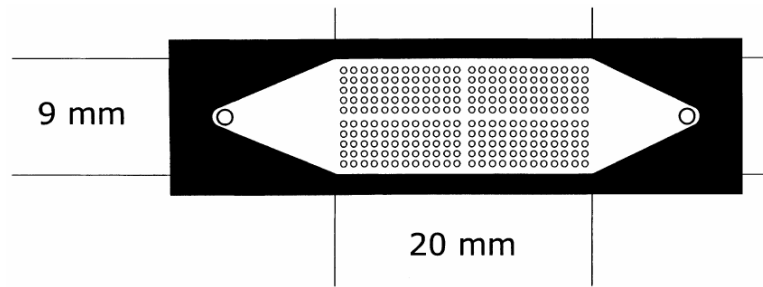


Abbildung 6: Beispiel eines Mikroarraychips (Weller, 1999).

Als Sonden kommen Antikörper, DNA, RNA und viele weitere biologische Rezeptoren zum Einsatz. Aber auch die Immobilisierung von Antigenen, wie Viren, Bakterien oder kleinen Analyten (Haptene) ist möglich. Die x-y-Koordinaten jeder Sonde sind genau definiert und bekannt. Das Auslesen des Mikroarrays erfolgt über Fluoreszenz-, Chemilumineszenz-, elektrochemische oder Oberflächenplasmonenresonanz-Messungen. Jeder gemessene Spot kann einem entsprechenden Analyten zugeordnet werden, die qualitative und quantitative Messung ist also parallel möglich. Durch die parallele Quantifizierung verkürzt sich die Analysenzeit um ein Vielfaches. Die kleinen Chipformate, und damit der geringe Reagenzienverbrauch, erlauben den Einsatz kompakter und mobiler Analysengeräte. Aus diesen Gründen werden Mikroarrays in vielen Bereichen wie der Medizin, der Lebensmittelchemie und der Umweltanalytik für Screening-Verfahren eingesetzt (Ekins, 1998; Feng, 2004; Sashwati, 2006). Für die Detektion von Mykotoxinen wurde am *Naval Research Laboratory* (NRL) bereits ein Mikroarray mit Fluoreszenzdetektion für die Detektion von AFB1 und OTA in Mais und anderem Getreide entwickelt (Ngundi, 2005; Sapsford, 2006). Auch die parallele Detektion von OTA und DON ist mit diesem Biosensor, wenn auch bei erhöhten Nachweisgrenzen, demonstriert worden (Ngundi, 2006).

Am Institut für Wasserchemie wurden im letzten Jahrzehnt Mikroarray-Auslesegeräte entwickelt. Der ursprünglich entwickelte *Parallel Affinity Sensor Array* (PASA, paralleler Affinitätssensorarray; Weller, 1999) wurde zum Munich Chip Reader 3 (MCR 3; Kloth, 2009b) weiterentwickelt. Der MCR 3 ist ein vollautomatisches Auslesegerät für Chemilumineszenz-Mikroarrays und ermöglichte bereits die parallele Quantifizierung von 13 Antibiotika in Milch (Kloth, 2009a).

2 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs) sind aromatische Verbindungen, die aus mindestens zwei anellierten Ringsystemen bestehen, welche in einer Ebene liegen. Insgesamt sind mehrere hundert Verbindungen bekannt, die zu den PAKs zählen. Sie sind unpolar, meist ungeladen und bilden farblose, gelbe oder grünliche Kristalle. Des Weiteren besitzen sie einen geringen Dampfdruck und hohe Schmelz- und Siedepunkte. Viele PAKs zeigen eine starke Fluoreszenz. Im Folgenden soll auf einige Vertreter der PAKs genauer eingegangen werden. Ein Schwerpunkt liegt dabei auf dem als Leitsubstanz verwendeten Benzo[a]pyren (B[a]P).

2.1 Vorkommen und Bedeutung

PAKs sind ubiquitäre Umweltkontaminanten, die durch eine Vielzahl von natürlichen und anthropogenen Quellen erzeugt werden (Vo-Dinh, 1998). Sie entstehen durch unvollständige Verbrennung, Verkokung oder Verschwelung von organischem Material. Als anthropogene Ursachen gelten hauptsächlich Kohleverbrennungsanlagen, Verbrennungsmotoren und Kokereien. Aber auch gegrillte oder geröstete Nahrungsmittel und Zigarettenrauch können Expositionsquellen für den Menschen sein (Gundel, 1995; Houessou, 2007). Natürliche Quellen für PAKs sind Torf, Kohle und Rohöl (Nießner, 2010). Auch Schwelbrände und Vulkanausbrüche sorgen für einen natürlichen Eintrag von PAKs in die Umwelt. PAKs werden meist partikelgebunden in die Atmosphäre eingetragen. Durch nasse oder trockene Deposition, sowie Auswaschung kommt es anschließend zum Eintrag in die Geo- und Hydrosphäre (Nießner, 2010). In Oberflächenwässern können deshalb häufig erhöhte Konzentrationen von PAKs nachgewiesen werden. Meist gelangen PAKs allerdings nur in geringen Konzentrationen bis ins Grundwasser. Als Hauptursache für PAK-kontaminiertes Trinkwasser gelten in Deutschland geteerte Wasserrohrleitungen (Matschulat, 2005). Bis Anfang der 1970er Jahre wurden Rohrleitungen zum Korrosionsschutz mit Teer ausgekleidet. Da noch immer nicht alle Leitungen ausgewechselt oder mit Zementmörtel ausgekleidet wurden, kommt es vor allem bei Druckstößen, bei Veränderung von Biofilmen oder bei Umkehr der Fließrichtung in Rohrleitungen zu erhöhten PAK-Belastungen von Trinkwasser (Maier, 2000). Neben den unsubstituierten PAKs existiert auch eine Vielzahl von Derivaten mit Heteroatomen, wie Stickstoff (Nitro-, Amino-PAKs) und Sauerstoff (Aldehyde, Ketone, Epoxide; Letzel, 1999; Schauer, 2003). Auch methylierte aromatische Ringsysteme werden

zu den PAKs gerechnet. Diese Derivate entstehen bei der Verbrennung von fossilen Brennstoffen, Biokraftstoffen und durch photochemische Reaktionen in der Atmosphäre (Schauer, 2004). Da es bekannt ist, dass zahlreiche PAKs Lungen-, Haut- und Prostatakrebs verursachen können (Rybicki, 2006; Hecht, 2010), sowie als endokrin aktive Substanzen wirken (Kumar, 2010), sind in vielen Ländern Richtlinien mit gesetzlich erlaubten Höchstmengen an PAKs erlassen worden. In der EU ist durch die Richtlinie 98/83/EC der Europäischen Kommission ein Grenzwert von 100 ng/L für die Summe der PAKs Benzo[b]fluoranthen, Benzo[k]fluoranthen, Benzo[ghi]perylen und Indeno[1,2,3-cd]pyren in Trinkwasser festgelegt. Außerdem gilt für die Leitsubstanz Benzo[a]pyren ein noch strengerer Grenzwert von 10 ng/L. In den USA wurde von der *U.S. Environmental Protection Agency* (EPA) eine Liste von 16 unsubstituierten PAKs, den sog. 16 EPA PAKs, als prioritäre Umweltkontaminanten festgelegt (siehe Abbildung 7).

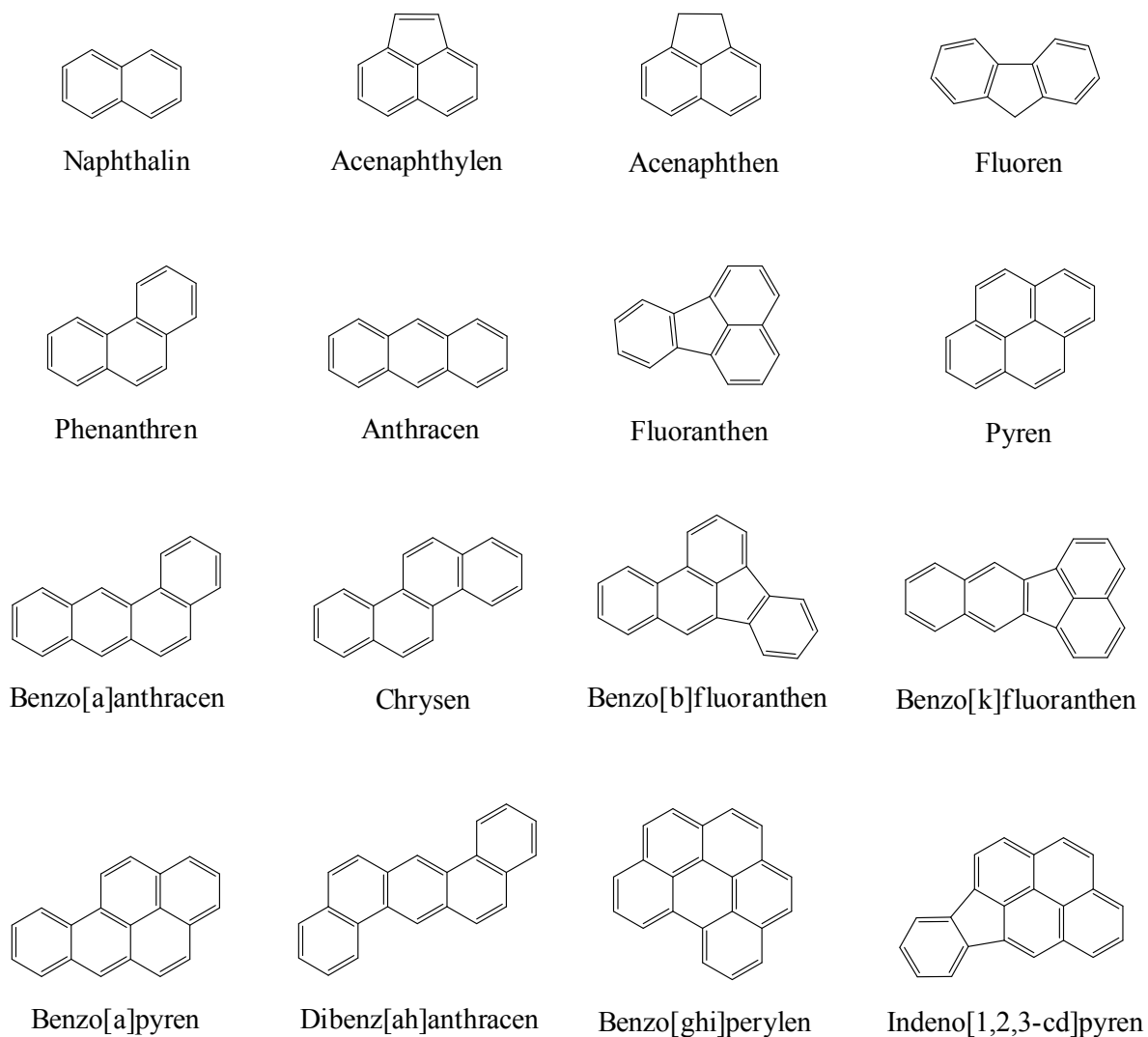


Abbildung 7: Strukturen der 16 EPA PAKs und deren Trivialnamen.

Wasser-, Luft- und Bodenproben werden häufig auf diese 16 EPA PAKs untersucht, da es unmöglich ist, alle existierenden PAKs zu qualifizieren und quantifizieren. Die 16 EPA PAKs beinhalten Zwei- bis Sechsring-PAKs und geben damit einen guten Überblick über die Gesamtbelastung einer untersuchten Probe.

Bereits im Jahre 1775 konnte der Arzt Sir Percival Pott einen Zusammenhang zwischen Ruß und dem sog. Schornsteinfegerkrebs nachweisen (Potter, 1963). Heute geht man davon aus, dass vor allem PAKs für diesen Krebs verantwortlich waren. Bei langfristiger PAK-Aufnahme kommt es zur Bildung von PAK-DNA-Addukten, die Krebs verursachen können (Ovrebo, 1995; Pavanello, 2004). Der aufgrund seiner hohen Kanzerogenität am besten untersuchte PAK ist Benzo[a]pyren (B[a]P). Der nach IUPAC eigentlich Benzo[d,e,f]chrysen zu bezeichnende PAK B[a]P ist der bekannteste Vertreter der stark kanzerogenen Vier- bis Siebenring-PAKs. Obwohl B[a]P nur 1 bis 20 % an der Gesamtkonzentration der PAKs in belasteten Proben ausmacht, hat es sich als Leitsubstanz etabliert (Ravindra, 2008). Abbildung 8 zeigt die enzymatische Metabolisierung, wie sie im Menschen nach der Aufnahme von B[a]P abläuft. Im ersten Schritt wird B[a]P durch die Cytochrom P450-Enzyme CYP1A1 und CYP1B1 zum B[a]P-7,8-epoxid umgesetzt (Shimada, 1998). Anschließend kann das B[a]P-7,8-epoxid durch die mikrosomale Epoxidhydrolase (mEH) zum B[a]P-7,8-dihydrodiol umgesetzt werden. Dieses wird in seltenen Fällen über die Aldol-Keto-Reduktase 1C (AKR1C) zu einem Katechol-Intermediat umgesetzt und anschließend bildet sich durch eine autokatalytische Reaktion das B[a]P-7,8-dion (Burczynski, 2000). B[a]P-7,8-dion kann direkt an die DNA binden oder indirekt über die Bildung von weiteren reaktiven Spezies (Flowers, 1996).

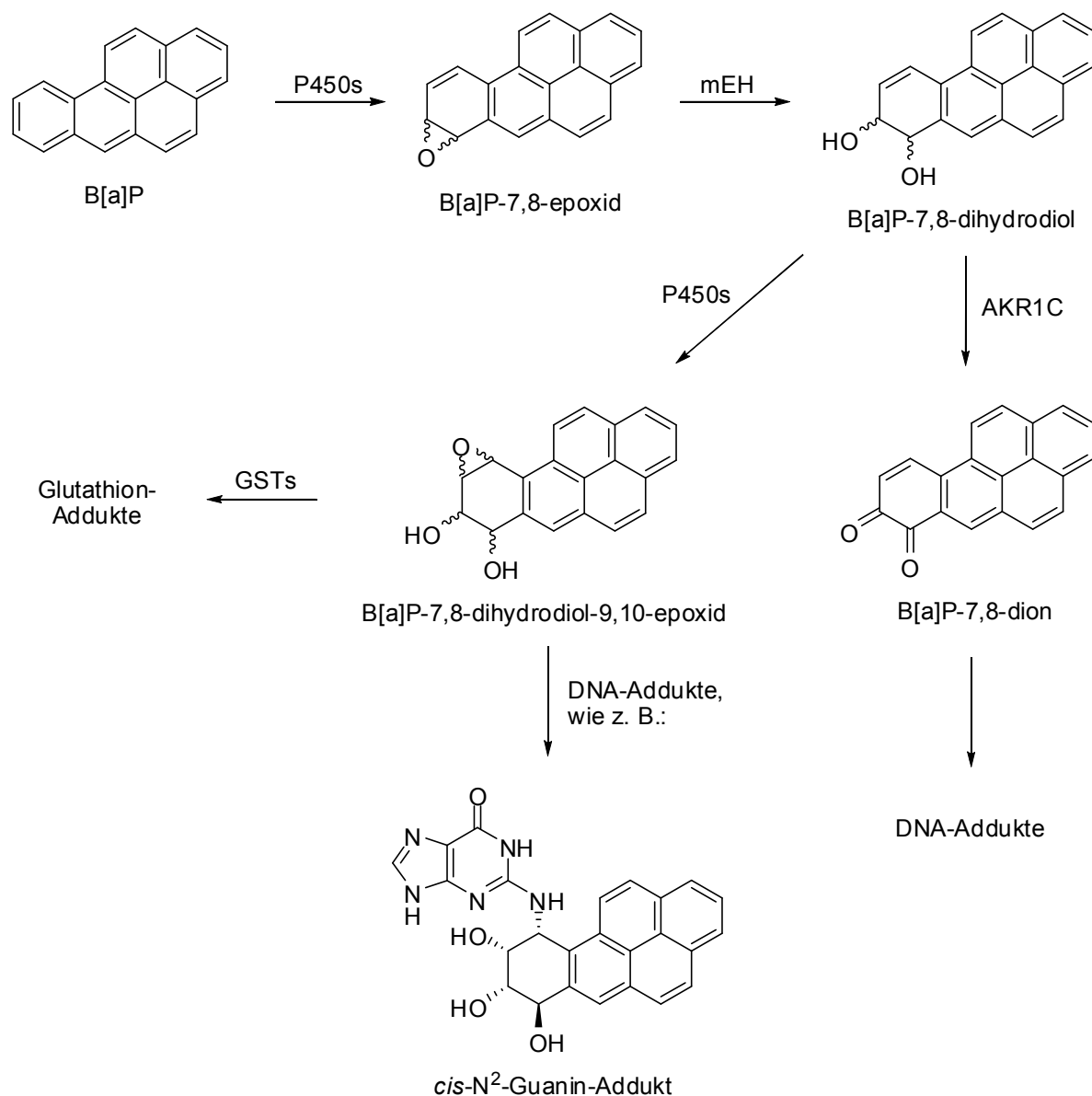


Abbildung 8: Schematische Darstellung der enzymatischen Umsetzung von B[a]P durch Cytochrom P450 und durch die Aldo-Keto-Reduktase 1C (AKR1C). Anschließend können die Metaboliten über die Bindung an Glutathion ausgeschieden werden oder an die DNA binden. Beispielhaft gezeigt ist die Bindung an die Base Guanin.

Hauptsächlich wird B[a]P-7,8-dihydrodiol mittels CYP1A1, CYP1A2 oder CYP1B1 zum B[a]P-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid umgesetzt, das kovalent an DNA binden kann (Sims, 1974). Das Hauptprodukt dieser Reaktion ist das (+)-*anti*-B[a]P-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (Yang, 1976). Dieses ist auch das am meisten mutagene und kanzerogene Produkt der B[a]P-Metabolisierung (Wood, 1984; Levin, 1986). Das B[a]P-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid kann entweder über die Bindung an Glutathion mittels Glutathion-S-Transferase (GSTs) aus dem Organismus entfernt werden (Entgiftung) oder an die DNA binden (Sundberg, 1997;

Weinstein, 1976; Melendez-Colon, 1999). Reagiert es mit der DNA, so kommt es meist zu einer Bindung an die N²-Position des Guanins (Alexandrov, 2010). Die Bindung des B[a]P-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid an DNA wurde vor kurzem von SATTERWHITE et al. mit einem elektrochemischen Immunosensor eingehender untersucht (Satterwhite, 2011). In der Immunhistochemie werden anti-B[a]P-diolepoxid-Antikörper verwendet, um die Bindung von B[a]P-Derivaten an die DNA nachzuweisen (Santella, 1999). Die Bindung an die DNA erklärt die mutagene und kanzerogene Wirkung von B[a]P (Denissenko, 1996; Yakovleva, 2006).

2.2 Analytik von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen

2.2.1 Klassische Trenn- und Detektionsverfahren

Da PAKs ubiquitär auftreten, gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Matrices, wie Böden, Stäube, Wasser, Sedimente, Abgaskondensate, Lebensmittel, Zigarettenrauch oder aquatische Schwebstoffe. Die Konzentrationen der meisten PAKs liegen im unteren ppt-Bereich, was deren quantitative Analyse sehr kosten- und zeitintensiv macht. Vor der Wahl des richtigen Analysenverfahrens für eine gezielte Anwendung sollten folgende Punkte geklärt werden:

- Um welche Probenmatrix handelt es sich?
- Welche Art der Probennahme kommt in Frage?
- Wie wird die Probe vorbereitet?
- Welches Verfahren soll für die qualitative und quantitative PAK-Analyse eingesetzt werden?

Flüssige und gasförmige Proben können meist direkt extrahiert werden. Feststoffe müssen im ersten Schritt getrocknet und homogenisiert und anschließend extrahiert werden. Zur Extraktion wurde in der Vergangenheit meist die Soxhlet-Extraktion verwendet, die jedoch große Mengen an organischen Lösemitteln benötigt (Malawska, 2002). Aus diesem Grund wurden zahlreiche weitere Extraktionsmethoden, wie die Ultraschall-unterstützte Flüssigextraktion (UASE; Aamot, 1996), die überkritische Fluidextraktion (SFE; Methode 3561 der EPA), die beschleunigte Flüssigextraktion (ASE; Wilcke, 1999; Dreyer, 2005) und die Fließbettextraktion (FBE; Gfrerer, 2002) entwickelt. Neben der Probenextraktion haben all diese Verfahren auch das Ziel der Anreicherung der Analyten.

Traditionelle Trenntechniken in der PAK-Analytik sind die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und die Gaschromatographie (GC; Simon, 2010). HPLC und GC sind sehr sensitiv, benötigen aber eine intensive Probenvorbereitung und -aufreinigung. Hierzu werden unter anderem die Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE; Brum, 2008), die Festphasenextraktion (SPE; Prieto-Blanco, 2010), die Festphasennanoextraktion (SPNE; Wang, 2008) und *Molecular Imprinted Polymers* (MIPs; Traviesa-Alvarez, 2007) eingesetzt. Zur Detektion der PAKs in HPLC-Verfahren kommen UV-Vis- und Fluoreszenzdetektoren zum Einsatz (Fetzer, 1995; Simon, 2007). Die Detektion bei GC-Verfahren erfolgt hauptsächlich mittels massensensitiven Detektoren (MS; Simon, 2006a; Simon, 2006b; Britten, 2008) und Flammenionisationsdetektoren (FID; Bagheri, 2003). Die Selektivität, Sensitivität und Auflösung in GC-Verfahren ist größer als in HPLC-Verfahren (Poster, 1998; Lee, 2001; Santos, 2002). Dies ist vor allem dann von Bedeutung, wenn z. B. in Kohle und Schweröl Hunderte von Substanzen gleichzeitig untersucht werden müssen. Auch die mögliche Kopplung von GC und MS ist in der PAK-Analytik gegenüber der HPLC mit Fluoreszenzdetektion im Vorteil. Allerdings wird die HPLC zur Probenaufreinigung und -fraktionierung der GC häufig vorgeschaltet. Dies ist auch deshalb von großem Nutzen, da in GC-Verfahren eine intensivere Probenvorbereitung notwendig ist, als in HPLC-Verfahren.

2.2.2 Immunanalytische Verfahren

Immunoassays sind bekanntermaßen auch für kleine Analyten sehr sensitiv. Außerdem kommen sie meist ohne aufwendige Probenvorbereitungsschritte, wie Probenaufreinigung und Anreicherung des Analyten aus. Zur kontinuierlichen und einfachen Überwachung von z. B. Trinkwasser sind immunologische Verfahren eine kostengünstige Alternative zu den herkömmlichen Methoden, wie HPLC und GC. Der Schlüssel zu einem immunanalytischen Verfahren ist ein selektiver und sensitiver Antikörper (der theoretische Hintergrund zum *Enzyme-linked immunosorbent assay* ist in Kapitel II.1.2.3 erläutert). Sowohl bei der selektiven, als auch bei der sensitiven Erkennung von PAKs durch Antikörper, gibt es Schwierigkeiten. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der PAKs ist es nicht möglich, Antikörper zu entwickeln, die nur einen PAK erkennen. Die Kreuzreaktivitäten zu ähnlich aufgebauten PAKs sind meist sehr hoch. Ein weiteres Problem liegt darin, dass die Vier- bis Siebenring-PAKs äußerst hydrophob sind, was die Entwicklung sensitiver Antikörper erschwert. In den letzten beiden Jahrzehnten wurden zahlreiche Immunoassays für B[a]P entwickelt (Roda, 1991; Roda, 1994; Li, 1999; Quelven, 1999; Knopp, 2000; Scharnweber,

2001; Fähnrich, 2002; Moore, 2004; Matschulat, 2005; Spier, 2009). Keiner dieser Immunoassays erreicht allerdings eine Bestimmungsgrenze von 10 ng/L B[a]P in Trinkwasser. Neben den klassischen Immunoassays wurden auch andere immunologische Verfahren, wie Mikrowaagen (Liu, 1999), Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) - Biosensoren (Gobi, 2004; Dostalek, 2007), *polarization modulation reflection absorption infrared spectroscopy* (PM-RAIRS; Boujday, 2009) und elektrochemische Immunosensoren (Wang, 2011) entwickelt. Mit SPR-Biosensoren wurden bisher Nachweisgrenzen von 50 ng/L B[a]P erreicht. Allerdings wurde bisher keine Messung von Realproben demonstriert. Auch ein faseroptischer Biosensor zur Detektion von B[a]P wurde vielfach vorgestellt (Vo-Dinh, 1987; Alarie, 1990). Hierbei werden B[a]P-spezifische Antikörper auf dem Probenkopf des optischen Sensors immobilisiert und dieser wird in die Probe eingetaucht. Die Detektion erfolgt über eine Fluoreszenzmessung, indem über die Glasfaser ein Laserstrahl eingekoppelt wird, der das gebundene B[a]P anregt. Anschließend wird über dieselbe Glasfaser das Fluoreszenzsignal eingefangen und über einen Strahlteiler zum Detektor geleitet. Dieser Biosensor wurde bereits regenerierbar gestaltet. Unter Beteiligung des Instituts für Wasserchemie und Chemische Balneologie wurde ein Säulentest entwickelt, der für Benzo[a]pyren in Wasser Nachweisgrenzen von 4 ng/L erreicht (Beloglazova, 2011). Mit dem neuen Verfahren, das Anreicherung und Detektion in einer Säule vereint, ist eine Detektion von B[a]P im gesetzlich relevanten Bereich möglich.

2.2.3 Marktstudie zu kommerziell erhältlichen Test-Kits

Im Rahmen des vom BMBF geförderten Projektes (Förderungskennzeichen: 02WU0969) wurde eine Marktstudie zu kommerziell erhältlichen Antikörpern und Test-Kits im Bereich PAK-Analytik durchgeführt. Kommerziell erhältlich sind vier Antikörper gegen B[a]P, bzw. gegen PAKs, wobei zwei monoklonal und zwei polyklonal sind (siehe Tabelle 3). Alle Produkte werden nur für Forschungszwecke angeboten. Bezüglich der Sensitivität und Selektivität sind nur für das Produkt anti-Benzo[a]pyren (BAP-13) Daten erhältlich (Scharnweber, 2001). Mit einer Nachweisgrenze von 300 ng/L ist dieser Antikörper jedoch weit von der gesetzlich vorgeschriebenen Höchstmenge von 10 ng/L entfernt.

Neben B[a]P-spezifischen Antikörpern werden auch Antikörper gegen das B[a]P-Derivat Benzo[a]pyrendiolepidoxid angeboten. B[a]P-Derivate können an die DNA binden, was unter anderem zu Krebs führen kann. Um nachweisen zu können, dass B[a]P oder andere PAKs an die DNA gebunden haben, wurden anti-B[a]P-diolepidoxid-Antikörper entwickelt. Diese kommen in der Immunhistochemie zum Einsatz. Es existieren Antikörper, die entweder freies oder auch DNA-gebundenes B[a]P-diolepidoxid erkennen und damit unterscheiden können.

Tabelle 3: Kommerziell erhältliche Antikörper gegen PAKs, sowie gegen B[a]P und B[a]P-Derivate.

Antikörperbezeichnung	Charakteristika	Firma
anti-Benzo[a]pyren	polyklonal	Antikörper-online
anti-Benzo[a]pyren (BAP-13)	monoklonal	Antikörper-online
anti-PAK	polyklonal, für Westernblot und Immunhistochemie	Antikörper-online
anti-PAK Klon (4i314)	monoklonal	Biomol
anti-Benzo[a]pyrendiolepidoxid, Klone 6A485, 6A486, 9H69	monoklonal	Biomol
Kaninchen anti-Benzo[a]pyrendiolepidoxid	polyklonal	Acris-antibodies
anti-Benzo[a]pyrendiolepidoxid, Klone 8D11, 5D11	monoklonal	Acris-antibodies
anti-Benzo[a]pyrendiolepidoxid	monoklonal	Antikörper-online

Neben den PAK-spezifischen Antikörpern, sind drei Test-Kits kommerziell erhältlich. In Tabelle 4 sind diese und zwei weitere Test-Kits, deren Produktion eingestellt wurde, aufgeführt.

Tabelle 4: Kommerziell erhältliche Test-Kits für die PAK-Analytik (kursiv: Produkte, deren Produktion eingestellt wurde).

Produkt	Charakteristika	Firma
PAK ELISA Kit	nur für Forschungszwecke	Antikörper-online
RaPID Assay PAK Test Kit	für Wasseranalyse, Nachweisgrenze für Phenanthren beträgt 0.93 µg/L	SDIX
RaPID Assay Carcinogenic PAKs in Soil Application	für Bodenanalyse, die Nachweisgrenze für B[a]P beträgt 20 ppb und der IC ₅₀ liegt bei 320 ppb	SDIX
<i>EnviroGard™ PAK in Water Test Kit</i>	<i>Für Wasseranalyse, die Nachweisgrenze für B[a]P beträgt 4 ppb</i>	<i>EnSys</i>
<i>PAK RiSc™ Soil Test</i>	<i>für Bodenanalyse, die Nachweisgrenze für B[a]P beträgt 8.3 ppb</i>	<i>EnSys</i>

Neben den genannten Produkten, gab es sog. „DTech-Tests“, die jedoch keine zuverlässigen Werte lieferten und bereits 1999 vom Markt genommen wurden. „EnviroGard™“ wurde 1996 von Millipore an EnSys verkauft. EnSys wurde anschließend von SDIX aufgekauft, wobei die Produktion von „EnviroGard™“ eingestellt wurde. „PAK RiSc™ Soil Test“ von EnSys (jetzt SDIX) ist ebenfalls nicht mehr auf dem Markt. Kommerziell erhältlich sind neben dem „PAK ELISA Kit“ von Antikörper-online nur noch die sog. „RaPID Tests“ von SDIX. Die „RaPID Tests“ verwenden magnetische Partikel als Träger für PAK-spezifische Antikörper (Plaza, 2005). Das Prinzip ist das eines direkt kompetitiven ELISAs. An die primären Antikörper sind PAK-Peroxidase-Konjugate gebunden, die von eventuell vorhandenen freien Analyten in einer Probe verdrängt werden können. Die Detektion gebundener PAK-Peroxidase-Konjugate erfolgt mittels Farbreaktion (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) und anschließender Absorptionsmessung (Kim, 2001).

Insgesamt sind sehr wenige Produkte im Bereich PAK-spezifische Antikörper und Test-Kits für die PAK-Analytik vorhanden. Ein Problem stellt die geringe Nachfrage nach solchen

Produkten sowie die fehlende Akzeptanz dar. Frau Dr. P. Krämer stellt die Situation folgendermaßen dar (Krämer, 2010):

„Bisher war das Probenaufkommen im Bereich der Wasseranalytik jedoch nicht hoch genug und ein Screening nach wenigen, ausgesuchten Analyten war oft nicht gefragt. Der Markt für die entsprechenden Test-Kits ist daher finanziell nicht sehr lohnend. Außerdem ist auch die Akzeptanz von Seiten der Wasseranalytiker und von Seiten der Behörden für die Technologie immer noch nicht gegeben.“

Neben der Entwicklung hoch affiner Antikörper gegen B[a]P, sowie von geeigneten Testverfahren, ist auch die Verbreitung der Information um deren Eignung (Werbung) von großer Bedeutung. Ein Hilfsmittel, um die Akzeptanz unter Wasseranalytikern zu steigern, kann die Teilnahme mit neuen immunanalytischen Verfahren an Ringversuchen sein. Der große Vorteil von Antikörper-basierten Verfahren ist nach wie vor, dass keine Probenvorbereitungsschritte, wie Probenaufreinigung und Analytanreicherung notwendig sind. Außerdem heben sie sich durch geringen Zeit- und Kostenaufwand pro Analyse von den klassischen Verfahren ab.

3 Antikörper

Antikörper sind Serumproteine, die nach Eindringen von körperfremden Substanzen in ein Wirbeltier (Vertebrat) von dessen B-Lymphocyten und Plasmazellen gebildet werden. Die auch Immunglobuline (Ig) genannten Antikörper stammen von den B-Lymphocyten ab und werden von Plasmazellen sezerniert. Die Bindung von Antikörpern an Antigene hat zunächst zur Folge, dass das Antigen blockiert wird. Außerdem kann der gebundene Antikörper von Phagocyten erkannt werden oder das Komplementsystem aktivieren, was zur Vernichtung des Antigens führt. Jedes Wirbeltier kann 10^8 bis 10^9 verschiedene Antikörper produzieren (Di Noia, 2007). Jeder Antikörper wiederum kann einem bestimmten B-Lymphocyten zugeordnet werden. Der Klonselektionstheorie (Burnet, 1957) nach, läuft die Immunantwort wie folgt ab: Dringt ein fremdes Makromolekül (Immunogen, Antigen), wie z. B. ein Virus in das Wirbeltier ein, so kann es zufällig durch einen bereits im Wirbeltier vorhandenen Antikörper, der an einen B-Lymphocyten gekuppelt ist, gebunden werden. Die Bindung löst die Teilung und damit die Vermehrung des B-Lymphocyten aus, der spezifisch das eingedrungene Antigen bindet. Dieser Vorgang wird als klonale Selektion bezeichnet. Es kommt zur gezielten Vermehrung derjenigen Zellen, die die Abwehr des eingedrungenen Antigens ermöglicht. Einige der B-Lymphocyten entwickeln sich nun weiter zu Plasmazellen, die keine membrangebundenen (mIg), sondern freie Antikörper produzieren (Ig). Während der Teilung der B-Lymphocyten kommt es zu einer extrem hohen Mutationsrate (somatische Hypermutation), die eine Expression von höher affinen Antikörpern zur Folge haben kann (Tonegawa, 1983). Bei der Kompetition mit anderen B-Lymphocyten überleben nur diejenigen Zellen, die das Antigen am besten binden können. Neben der klonalen Selektion besteht damit auch die Möglichkeit der Affinitätsmaturation, was den Abwehrmechanismus der Wirbeltiere sehr effektiv macht (Alt, 1987; Milstein, 1996). Die affinsten B-Lymphocyten können auch in Abwesenheit des Antigens fortbestehen. Dieses immunologische Gedächtnis garantiert eine schnelle Immunantwort bei erneutem Eindringen desselben Antigens.

3.1 Typen und Strukturen von Antikörpern

Die Immunglobuline werden in die Klassen IgA, IgD, IgE, IgM und IgG unterteilt. Die konstanten Regionen der schweren Ketten unterscheiden sich von Klasse zu Klasse und werden entsprechend der Klasse als α , δ , ϵ , μ oder γ genannt. Die leichten Ketten hingegen sind gleich und entweder vom Typ κ oder λ . Damit besitzen die unterschiedlichen Klassen

dieselbe Spezifität, aber unterschiedliche Effektorfunktionen (Honjo, 2002; Manis, 2002). Nach Eindringen eines Immunogens werden zunächst IgM gebildet. Diese sind Pentamere und können damit an viele Epitope auf der Immunogenoberfläche (z. B. Proteine auf einer Bakterienoberfläche) gleichzeitig binden. Epitope sind immunologische Erkennungsstellen, an die der Antikörper bindet. Durch die multivalente Bindung (Avidität) wird eine stärkere Bindung an das Antigen erreicht. Ca. zehn Tage nach der ersten Immunantwort nimmt die Konzentration von IgGs im Serum stark zu. Auch IgA, IgD oder IgE gleicher Spezifität können gebildet werden, wobei die Konzentration an IgGs im Serum 100 bis 100000 fach über der von IgA, IgD oder IgE liegt. Dieser Prozess läuft über die sog. *class-switch recombination* (CSR, Klassenwechsel-Rekombination) ab. Eine Übersicht über den Mechanismus der CSR ist von CHAUDHURI und ALT vorgestellt worden (Chaudhuri, 2004). Die IgGs sind im Vergleich zu IgMs besser wasserlöslich und zeichnen sich durch eine größere Segmentflexibilität aus. Da IgGs im Serum in den höchsten Konzentrationen auftreten (ca. 12 mg/mL, was ca. 80 % der Gesamtmenge an Antikörpern im Serum entspricht) und bessere Diffusionseigenschaften als IgMs besitzen, werden sie in der Immunanalytik bevorzugt eingesetzt. In Abbildung 9 ist die Struktur eines IgGs schematisch dargestellt.

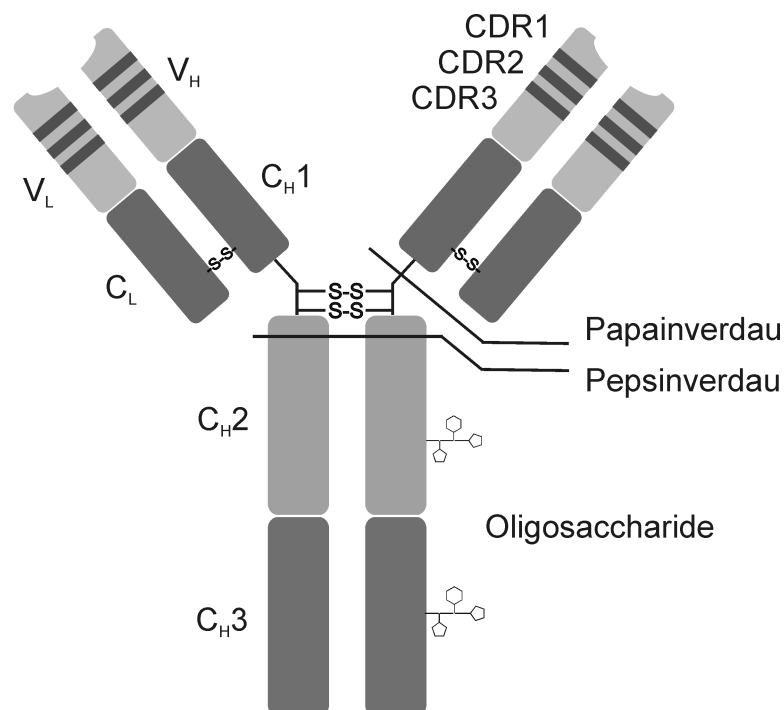


Abbildung 9: Struktur eines Immunoglobulins des Typs G. C: konstante Region, V: variable Region, L: leichte Kette, H: schwere Kette, CDR: *complementarity determining region* (Antikörperbindungsstelle).

Antikörper werden auch als Glykoproteine bezeichnet, da sie je nach Wirtstier unterschiedliche Glykolisierungsmuster aufzeigen. Für die analytische Anwendung spielen die Oligosaccharide an der Antikörperoberfläche im Allgemeinen keine Rolle. Bei einer klinischen Anwendung können körperfremde Glykolisierungsmuster allerdings zu Abwehrreaktionen der injizierten Antikörper führen (Stöger, 2005). Jedes IgG Molekül besteht aus zwei identischen schweren (H) Ketten (ca. 55 kDa) und zwei identischen leichten (L) Ketten (ca. 22 kDa), die über Disulfidbrücken zu einem Tetramer (ca. 150 kDa) verbunden sind (Kuby, 2007). Die leichten und schweren Ketten sind aus β -Faltblättern aufgebaut und über jeweils eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft. Die beiden schweren Ketten sind in der sog. Hinge-Region über mindestens zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden (Zhang, 2009b). Sowohl die schweren, als auch die leichten Ketten lassen sich in variable und konstante Segmente unterteilen. In einem Wirbeltier werden zur Bindung unterschiedlicher Antigene nur Teile der variablen Segmente eines Antikörpers verändert, was die Kodierung des ganzen IgG im Genom wesentlich vereinfacht und die immense Vielfalt von Antikörpern erklärt. Die für die Bindung zuständigen Domänen werden als *complementarity determining regions* (CDRs, Antikörperbindungsstellen) oder als hypervariable Regionen bezeichnet. Es existieren jeweils 3 CDRs in der leichten und der schweren Kette des variablen Teils.

Bei dem Verdau von IgGs mit dem Enzym Pepsin entsteht das in Abbildung 10 dargestellte Antigen bindende Fragment $F(ab')_2$, sowie der konstante Teil F_c (Smith, 1990). Ersetzt man den F_c -Teil eines Tierantikörpers durch den eines Menschen, entstehen sog. humanisierte Antikörper, die als therapeutische Antikörper Anwendung finden.

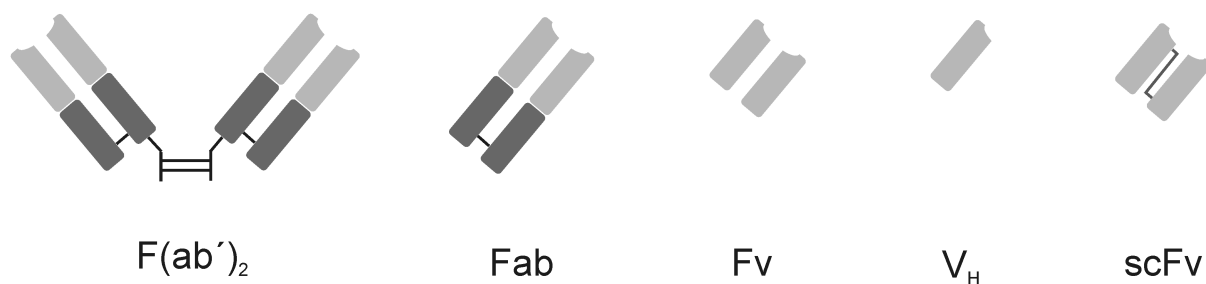


Abbildung 10: Schematische Darstellung von Antikörperfragmenten. $F(ab')_2$: Antigen bindendes Fragment, das z. B. nach einem Pepsinverdau eines IgG erhalten wird; Fab: Antigen bindendes Fragment, das z. B. durch einen Papainverdau eines IgG erhalten wird; Fv: variables Fragment; V_H : variables Fragment der schweren Kette; scFv: *single-chain fragment variable* (einkettiges variables Fragment).

Durch einen Papainverdau erhält man das Antigen bindende Fragment Fab. Fab-Fragmente lassen sich dimerisieren, sodass bifunktionelle Antikörperfragmente hergestellt werden können (Plückthun, 1997). Das variable Fragment Fv lässt sich nicht generieren, da die leichte und schwere Kette nicht miteinander verknüpft sind. Durch rekombinante Techniken können allerdings Linker eingefügt werden und es entstehen scFv-Antikörper (*single-chain fragment variable*, einkettiges variables Fragment). Die Herstellung von scFv und deren Anwendung ist in Kapitel II.3.3 näher erläutert. Eine weitere interessante Klasse von Antikörpern sind die so genannten *heavy chain* Antikörper (HCAs). Diese werden von der Säugetierfamilie der Kamele (*Camelidae*) produziert. Kamele, Lamas oder auch Alpakas stellen Antikörper her, die nur aus konstanten schweren und variablen schweren Ketten bestehen (Hamers-Casterman, 1993). Bei einer Spaltung mit Papain bleiben folglich die in Abbildung 10 dargestellten V_H-Fragmente. Diese sind mit einem Molekulargewicht von ca. 16 kDa noch kleiner als scFv-Antikörper. V_H-Antikörper aus Kamelen zeichnen sich durch eine vergleichsweise geringe Immunogenität, gute Wasserlöslichkeit und hohe Stabilität aus und durchdringen Gewebe sehr schnell, weshalb sie von medizinischem Interesse sind (van der Linden, 1999; Arbabi-Ghahroudi, 1997; Cortez-Retamozo, 2002; Cortez-Retamozo, 2004).

3.2 Herstellung poly- und monoklonaler Antikörper

Als polyklonales Serum wird die Gesamtheit der sich im Serum befindenden Antikörper bezeichnet, die von einer Vielzahl an B-Zellen hergestellt werden. Dringt ein Fremdkörper in einen Organismus ein, so werden meist verschiedene Antikörper gegen diesen gebildet. Jeder dieser Antikörper zeigt andere Sensitivitäten und Selektivitäten und erkennt unterschiedliche Epitope (Bindungsstellen) des Antigens. Da die Antikörper von verschiedenen B-Zellen abstammen, bezeichnet man sie als polyklonales Serum oder als polyklonale Antikörper. Zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern wird ein Wirbeltier mit dem Antigen wiederholt immunisiert (siehe Abbildung 11). Um eine ausreichende Menge an Serum zu generieren, werden meist größere Wirbeltiere wie Hasen, Ziegen oder Pferde verwendet. Das entnommene Serum wird entweder direkt in Immunoassays verwendet, oder vor dem Einsatz über Protein A/G-Säulen gereinigt.

Polyklonale Antikörper werden heutzutage vor allem gegen Antikörper anderer Wirbeltierspezies hergestellt (Sekundäntikörper). Dies ist möglich, da die konstanten Domänen in den einzelnen Wirbeltierspezies stark konserviert sind, sodass sich z. B. in Pferden Antikörper gegen Mausantikörper generieren lassen. Sekundäntikörper werden

häufig mit Tracern, wie Peroxidase, gekoppelt und zur Detektion von Primärantikörpern verwendet.

Die Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen kleine Moleküle (Haptene) erfordert eine Kopplung an Trägerproteine, um eine Immunantwort auszulösen. Die in dieser Arbeit behandelten Mykotoxine und PAKs zählen aufgrund ihres Molekulargewichts zu den Haptenen und müssen vor der Immunisierung ebenfalls an Proteine gekoppelt werden, da sie alleine lediglich eine toxische Wirkung entfalten, aber keine Immunantwort auslösen können. Bei der Immunisierung mit Hapten-Protein-Konjugaten gibt es Hinweise, dass eine hohe Kopplungsdichte von Haptenen auf der Trägerproteinoberfläche die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Herstellung von Antikörpern gegen Haptene erhöht (Li, 2010). Die Erzeugung von Antikörpern gegen Haptene stellt somit eine größere Herausforderung dar, als die Herstellung von Antikörpern gegen Makromoleküle.

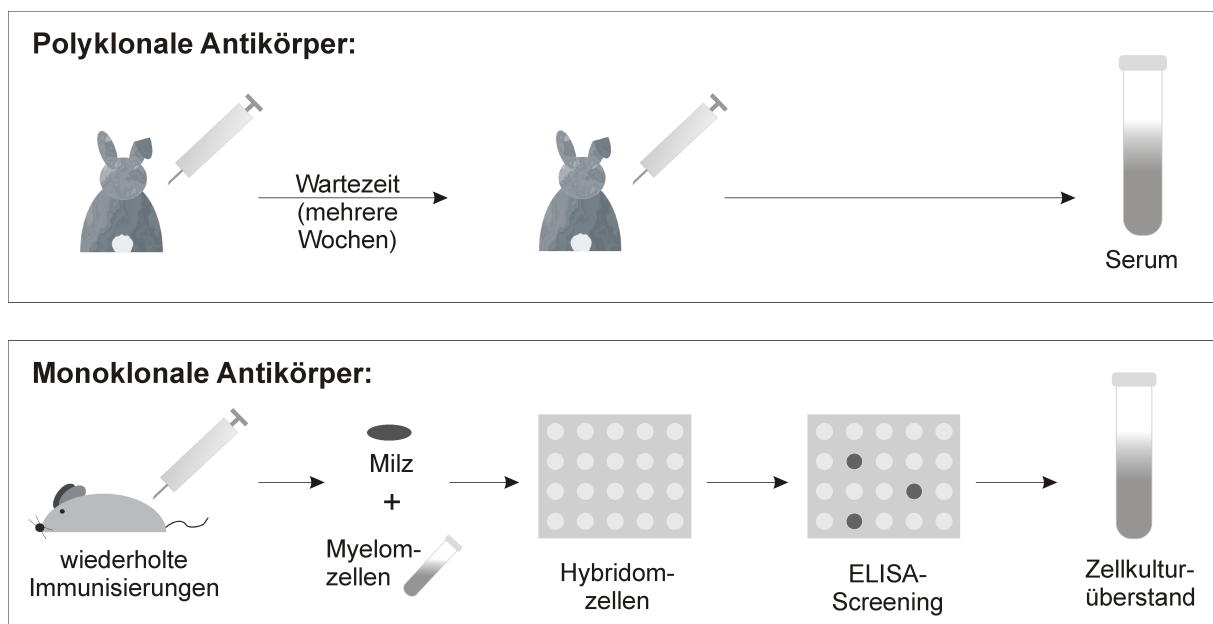


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Herstellung poly- und monoklonaler Antikörper.

Ein Nachteil von polyklonalen Antikörpern besteht darin, dass mit dem Tod des Wirtstieres die Antikörperquelle verloren geht. KÖHLER und MILSTEIN haben im Jahre 1975 ein Verfahren entwickelt, das es ermöglicht, basierend auf Milzzellen von immunisierten Tieren „unsterbliche“ Hybridomzellen herzustellen und somit eine Konservierung der Antikörperquelle vorzunehmen (Köhler, 1975). In diesem Verfahren werden Milzzellen der zuvor immunisierten Wirtstiere (meist Mäuse) mit Myelomzellen zu sog. Hybridomzellen verschmolzen und vereinzelt. Jede Hybridomzelle produziert dann nur noch einen Antikörper,

der als monoklonaler Antikörper bezeichnet wird. Hybridomzellen können über mehrere Jahrzehnte aufbewahrt werden und in beliebigen Volumina kultiviert werden. Ein weiterer Vorteil monoklonaler Antikörper gegenüber polyklonalen Antikörpern besteht darin, dass gezielt nach Klonen gesucht werden kann, die sehr selektiv sind.

Die Herstellung monoklonaler Antikörper ist allerdings mit ungleich höherem Aufwand verbunden als die Produktion polyklonaler Antikörper. Vor allem das Screening der Zellkulturüberstände (ZKÜs) der vereinzelt Hybridomzellen nach spezifischen Antikörpern und die Charakterisierung der positiven Klone sind äußerst aufwendig. Dennoch überwiegen die Vorteile der monoklonalen Antikörper gegenüber den polyklonalen, weshalb es sich heutzutage bei der Mehrheit der hergestellten Antikörper um monoklonale handelt.

3.3 Herstellung rekombinanter Antikörper

Neben der Herstellung von poly- und monoklonalen Antikörpern kommt die rekombinante Technologie zum Einsatz. Mittels gentechnischer Methoden werden hierbei Vektoren geschaffen, die genetische Informationen über Antikörper enthalten. Diese Vektoren können z. B. in Bakterien oder Hefe transferiert werden und somit können Antikörper theoretisch ohne die Verwendung von Versuchstieren in großen Mengen hergestellt werden. Der Durchbruch der rekombinanten Technologie gelang mit bedeutenden Arbeiten über die Aufklärung von Antikörpersequenzen und der Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Isolation von Antikörpergenen (Kabat, 1991; Larrick, 1989), sowie mit der Möglichkeit, rekombinante Antikörperfragmente in Bakterien zu exprimieren und richtig zu falten (Skerra, 1988; Better, 1998). KABAT et al. haben nach intensiver Recherche in Proteindatenbanken festgestellt, dass die Aminosäuresequenzen von Antikörpern innerhalb einer Spezies vor und nach den komplementären Bindungsregionen stark konserviert sind. In Tabelle 5 sind die Aminosäuresequenzen der Enden der variablen Regionen für Mausantikörper dargestellt. Basierend auf diesen Sequenzen lassen sich Primer für die PCR erzeugen, die genutzt werden können, um die wesentliche genetische Information für Antikörperfragmente aus einem komplexen Genpool zu isolieren.

Tabelle 5: Relevante Aminosäuresequenzen für das Primerdesign nach KABAT et al. (Kabat, 1991).

VL-κ	1	2	3	4	5	6	7	
<i>LB1</i>	D	I	Q	L	T	Q	P	
<i>LB2</i>	D	I	V	L	T, S	Q	S	
<i>LB3</i>	D	I	V	I, L	T	Q	S	
<i>LB4</i>	D	I	V	L	T	Q	S	
<i>LB5</i>	D	I	V	M	T	Q	S	
<i>LB6</i>	D	I	K, Q	I, M	N, T	Q	S	
<i>LB7</i>	D	I	Q	M	I, T	Q	S	
<i>LB8</i>	D	I	Q	M	T	Q	T	
<i>LB9</i>	D	I	V	L	I, N	Q	S	
<i>LB10</i>	D	I	E, V	L	T	Q	S	
<i>LB11</i>	D	I	L, V	M	T	Q	S	
<i>LB12</i>	D	I, V	L, V	M	T	Q	T	
<i>LB13</i>	D	I	V	M	T	Q	A, S	
<i>LB14</i>	D	I	V	I	T	Q	D, E	
<i>LB15</i>	D	I	V	M	T	Q	I, M, L, P	
<i>LB16</i>	D	I	V	M	T	Q	P	
<i>LB17</i>	D	I	L	L	T	Q	S	
VL-λ	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>LBλ</i>	D	A	V	V	T	Q	E	S
VH	1	2	3	4	5	6	7	
<i>HB1</i>	D, E	V	N, Q	L	Q	E	S	
<i>HB2</i>	E	V	Q	L	Q	Q	S	
<i>HB3`</i>	Q	V	Q	L	K	E, Q	S	
<i>HB4</i>	E	V	Q	L	Q	Q	S	
<i>HB5</i>	Q	V	Q	L	Q	Q	S	
<i>HB6`</i>	Q	V	Q	L	Q	Q	S	
<i>HB7`</i>	Q	V	H	V	K	Q	S	
<i>HB8`</i>	E	V	K, N	L, V	V	E	S	
<i>HB9`</i>	D, E	V	K, M	L, V	V	E	S	
<i>HB10`</i>	E	V	Q	L, V	V	E	S	
<i>HB11`</i>	D, E	V	H, Q	L	V	E	S	
<i>HB12</i>	E	V	K	L	M	E	S	
<i>HB13`</i>	E	V	Q	L	V	E	S	
<i>HB14`</i>	E	V	K	L	L	E	S	
<i>HB15`</i>	E	V	K	L, V	E	E	S	
<i>HB16`</i>	Q	V	T	L	K	E	S	
<i>HB17</i>	Q	V	Q	L	Q	Q	P	
<i>HB18`</i>	D	V	N	L	E	E, Q	S	
<i>HB19`</i>	E	V	K	V	I	E	S	
102	103	104	105	106	107	108	VL-κ	
A, P, S, T	K	L	E	I	K	R	<i>LF1`</i>	
A, P, S, T	K	L	E	I	K	R	<i>LF4</i>	
A, P, S, T	K	L	E	L	K	R	<i>LF5</i>	
102	103	104	105	106	107	108	VL-λ	
A, P, S, T	K	L	T	V	L	G	<i>LFλ</i>	
107	108	109	110	111	112	113	VH	
T	T	V	T	V	S	S	<i>HF1</i>	
T	T	L	T	V	S	S	<i>HF2</i>	
T	L	V	T	V	S	A	<i>HF3</i>	
T	S	V	T	V	S	S	<i>HF4</i>	

Als Quelle für rekombinante Antikörper werden meist sog. kombinatorische Genbibliotheken aufgebaut. Eine Bibliothek enthält die genetische Information für eine Vielzahl von Antikörpern. Aus dieser werden in einem aufwendigen Prozess (*Biopanning*) diejenigen Informationen isoliert, die Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen (Zielanalyt) kodieren. Die Ausgangsmaterialien für eine Bibliothek zur Herstellung rekombinanter Antikörper können sehr unterschiedlich sein (siehe Abbildung 12).

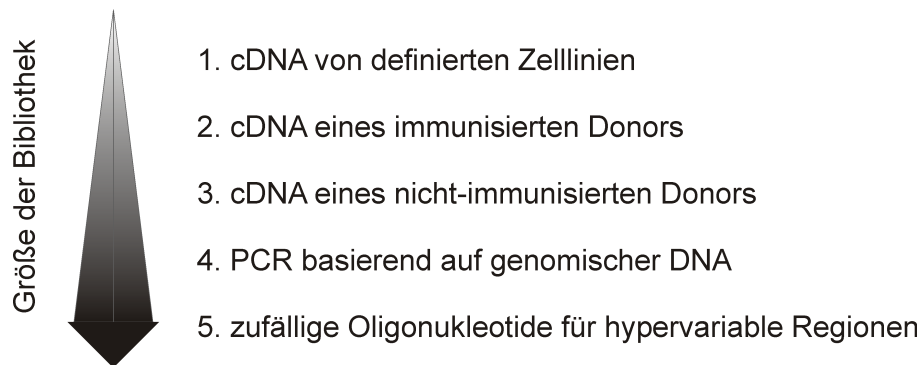


Abbildung 12: Darstellung der Ausgangsmaterialien für die Herstellung rekombinanter Antikörper und deren Auswirkung auf die Komplexität der daraus resultierenden Antikörperbibliothek (übersetzt aus Breitling, 1999).

Es kann von bereits spezifischer Information wie der cDNA von definierten Zelllinien (z. B. Hybridomzellen) ausgegangen werden oder von vollkommen unspezifischer Information, wie zufälligen Oligonukleotiden für hypervariable Regionen. Je nach Wahl der Ausgangsbedingungen, ergeben sich verschieden komplexe Bibliotheken. Wird von Hybridomzelllinien ausgegangen, ist die Komplexität der Antikörper-Bibliothek aufgrund der sehr eingeschränkten Information gering. Nach der Herstellung rekombinanter Antikörper basierend auf Hybridomzellen können diese allerdings durch gentechnische Verfahren wie der Affinitätsmaturation hinsichtlich ihrer Sensitivität und Selektivität verbessert werden (Yau, 2005). Wird dahingegen von der cDNA eines immunisierten, bzw. nichtimmunisierten Donors ausgegangen, so ergibt sich eine wesentlich komplexere Bibliothek und die Aussicht auf eine erfolgreiche Herstellung neuer, affiner Antikörper ist hoch.

Die Isolierung von spezifischen Antikörpern aus großen Bibliotheken erfolgt meist mittels Phagendisplay (Wark, 2006). Das Phagendisplay erlaubt es, die natürlich ablaufende klonale Selektion *in vitro* durchzuführen (McCafferty, 1990; Clackson, 1991). Hierbei werden Bakterien, die Vektoren mit der Antikörperinformation tragen, mit speziellen Phagen infiziert. Bei diesem Vorgang vereint sich die DNA der Phagen mit dem antikörperkodierenden Vektor,

was bei einer Neubildung der Phagen dazu führt, dass ein Antikörperfragment über das Oberflächenprotein pIII kovalent an den Phagen gekoppelt wird. Der Genotyp wird somit mit dem Phänotypen physikalisch verbunden, was im folgenden Schritt eine Selektion ermöglicht. Da das Antikörperfragment an der Phagenoberfläche präsentiert wird, ist es möglich, diejenigen Phagen, die einen spezifischen Antikörper tragen, an ein immobilisiertes Antigen zu binden und die nichtbindenden Phagen durch einfaches Waschen zu entfernen. Dieser Vorgang wird als *Biopanning* bezeichnet (Pande, 2010). Neben dem Phagendisplay werden auch andere Methoden wie das Ribosomendisplay oder mRNA-Display angewandt, um eine Selektion vorzunehmen (Hoogenboom, 2005).

Tabelle 6: Literaturbekannte scFv gegen Haptene.

Hapten	Quelle
Fumonisin B1	Lauer, 2005
Deoxycholin	Kobayashi, 2005
Testosteron, Estradiol, Fluoresceinisothiocyanat, Nitrophenylacetylacetatderivate	Persson, 2006
11-Deoxycortisol	Kobayashi, 2006
2-Phenyl-5-oxazolin	Scotti, 2006
2,3,7,8-Tetrachloro- <i>p</i> - dibenzodioxin (TCDD)	Park, 2006
Methamidophos	Li, 2006
Domoinsäure	Shaw, 2008
Aflatoxin B1	Pansri, 2009
Aflatoxin B1	Yang, 2009
Estradiol-17 β	Kobayashi, 2008 Kobayashi, 2010
Ivermectin	Zhang, 2010
Palytoxin	Garet, 2010

Die rekombinante Herstellung ganzer IgG-Moleküle gestaltet sich aufgrund ihrer Größe schwierig. Da zur Bindung eines Antigens allerdings nur das Fv-Fragment notwendig ist, hat sich die rekombinante Herstellung von Fab- oder scFv-Fragmenten durchgesetzt. In Tabelle 6 sind einige aktuelle Beispiele von scFv-Antikörpern gegen Haptene aufgeführt. In einem scFv-Antikörper werden die schwere und leichte Kette des Fv-Fragments durch einen

künstlich eingeführten Linker aus 12 bis 20 Aminosäuren verknüpft, da keine natürlichen Disulfidbrücken vorhanden sind. Neben rekombinanten Antikörpern gegen Mykotoxine und andere Toxine wurden im letzten Jahrzehnt vor allem scFv-Fragmente gegen Hormone und Pestizide hergestellt. Als Ausgangsmaterial für den Aufbau von Antikörperbibliotheken wurde fast ausschließlich cDNA von immunisierten Donoren (Maus, Kaninchen) verwendet. Von PERSSON et al. wurde gezeigt, dass sich durch eine Immunisierung mit mehreren Immunogenen auch rekombinante Antikörper gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Antigene herstellen lassen (Persson, 2006). Dennoch wird ersichtlich, dass sich die Herstellung von rekombinanten Antikörpern ohne die Verwendung von Versuchstieren bisher nicht durchgesetzt hat. Die Kombination von traditionellen Methoden der Antikörperherstellung mit rekombinanten Techniken scheint am erfolgversprechendsten zu sein.

Rekombinante Antikörper besitzen gegenüber den herkömmlichen poly- oder monoklonalen Antikörpern einige Vorteile: Zum einen sind sie wesentlich kleiner (bessere Diffusionseigenschaften) und können dadurch z. B. in der klinischen Anwendung wesentlich schneller und tiefer in Gewebe eindringen. Zum anderen können sie direkt mit weiteren Proteinen (Enzymen), Peptiden oder Rezeptoren fusioniert werden, was ihnen neue Eigenschaften verleiht. Üblicherweise werden an rekombinante Antikörper sog. Peptid-*Tags* angebracht, die eine einfache und schnelle Affinitätsreinigung ermöglichen. Eine Verknüpfung von Antikörperfragment mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) wiederum kann eine einfache Detektion der Antikörper möglich machen.

3.4 Charakterisierung von Antikörpern

Zur Charakterisierung von Antikörpern kommt je nach Zielsetzung eine Vielzahl an Methoden zum Einsatz. Für eine analytische Anwendung steht meist die Untersuchung der Affinität und Selektivität der Antikörper im Vordergrund. Zur Qualitätskontrolle und für die klinische Anwendung ist auch eine strukturelle Untersuchung (Aminosäuresequenz, Glykolisierungsmuster, usw.) wichtig.

Eine weit verbreitete Methode zur strukturellen Charakterisierung von Antikörpern stellt die Massenspektrometrie (MS) dar. Neben der Aminosäuresequenz können auch die Disulfidbrücken und das Glykolisierungsmuster untersucht werden. Die Masse von intakten IgGs lässt sich durch weiche Ionisierungsmethoden (Elektrospray-Ionisation, ESI; Matrix-unterstützte Laserdesorption/ionisation, MALDI) gekoppelt mit *time-of-flight*-MS (TOF-MS) bestimmen (Fenn, 1989; Karas, 1988). Allerdings wird durch die Bestimmung der Masse von ganzen IgGs wenig strukturelle Informationen erhalten, weshalb eine Vielzahl weiterer MS-

Methoden entwickelt wurden, die sich am besten in *middle-up*, *bottom-up*, *top-down* und *middle-down* untergliedern lassen (Zhang, 2009b). Bei der *middle-up* Methode wird das intakte Protein vor der MS-Analyse in mehrere große Fragmente gespalten, was durch Reduktion der Disulfidbrücken (Yang, 2007) oder durch enzymatischen Verdau mit Papain (Yan, 2007), Pepsin (Sun, 2001) oder Lys-C (Gadgil, 2006) erfolgen kann. Die Fragmente werden meist mit RP-HPLC-Systemen aufgetrennt und können anschließend aufgrund ihrer geringeren Masse mit höherer Massengenauigkeit im MS analysiert werden. Diese Methode hat sich vor allem für die Identifizierung von post-translationalen chemischen Modifikationen bewährt (Chumsae, 2007). Allerdings kann damit nicht die exakte Position (Aminosäure) ermittelt werden, an der die chemische Modifikation stattgefunden hat. Die Aufklärung der Aminosäuresequenz und die exakte Position der Modifikation können mit der aufwendigeren *bottom-up* Methode erfolgen (Johnson, 2007; Ying, 2007), bei der das Protein mittels Proteasen in kleine Peptide gespalten und anschließend mittels LC/MS/MS analysiert wird. Aufgrund der großen benötigten Probenmenge und des erheblichen Zeitaufwands der *bottom-up* Methode, haben sich die *top-down* und *middle-down* Methoden etabliert (Zhang, 2009b). Hierbei wird das intakte Protein (*top-down*) oder ein in wenige Bruchstücke gespaltenes Protein (*middle-down*) in das MS überführt und anschließend darin fragmentiert (Siuti, 2007; Zhang, 2009b). Die strukturelle Information ist hierbei nicht so hoch wie bei *bottom-up* Methoden, allerdings sind der Zeitaufwand und die benötigte Probenmenge wesentlich geringer. Neben den massenspektrometrischen Methoden kommen auch Gelelektrophorese, Western-Blot, Kapillarelektrophorese, Kristallstrukturanalyse, Gelpermeationschromatographie (GPC), asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (AF⁴), analytische Ultrazentrifugation und zahlreiche weitere Methoden zum Einsatz (Makvandi-Nejad, 2010; Matschulat, 2006; Oda, 2009).

Zur Bestimmung von Sensitivität und Selektivität werden fast ausschließlich Oberflächenplasmonenresonanz (SPR), direkter bzw. indirekter ELISA in der Mikrotiterplatte und der Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay (FPIA) verwendet (Alvarez-Rueda, 2007; Cervino, 2009; Makvandi-Nejad, 2010). Neben diesen Verfahren kann die Affinitätskonstante auch mittels Mikrokolorimetrie bestimmt werden. Da die Änderung der freien Standardreaktionsenthalpie bei der Bindung von Antigen an den Antikörper sehr klein ist, werden Antikörpermengen im Milligrammbereich benötigt, was die Mikrokolorimetrie für Screeningzwecke unpraktikabel macht.

Für die Bestimmung der Affinitätskonstante mittels SPR wird die Antikörper-Antigen-Wechselwirkung am Gleichgewicht häufig vereinfacht wie folgt beschrieben:

$$K_b = \frac{[AkAg]}{[Ak] \cdot [Ag]} \quad (\text{Gleichung 1})$$

mit	K_b	Affinitätskonstante
	$[AkAg]$	Konzentration des Antikörper-Antigen-Komplexes
	$[Ak]$	Konzentration des freien Antikörpers
	$[Ag]$	Konzentration des freien Antigens.

Diese Gleichung gilt, wenn jeweils nur ein Antikörper ein Antigen bindet. Durch SPR-Experimente lassen sich Assoziations- und Dissoziationsverhalten von Antikörpern bestimmen. Aus diesen können wiederum die Affinitätskonstanten errechnet werden, die im Allgemeinen in der Größenordnung von 10^4 M^{-1} bis 10^{10} M^{-1} liegen, was einer Bindungsenergie von 25 kJ/mol bis 65 kJ/mol entspricht (Voet, 2002).

Zur Bestimmung der Sensitivität kommt neben der SPR vor allem aufgrund des geringen Geräteaufwandes meist der klassische ELISA in der Mikrotiterplatte zum Einsatz. Bei der Kalibrierung von Enzymimmunoassays erhält man bei halblogarithmischer Auftragung sigmoidale Kurvenverläufe, die sich mit der sog. 4-Parameter-Logistikfunktion am besten beschreiben lassen (Findlay, 2007):

$$Y = \frac{(D - A)}{\left[1 + \left(\frac{X}{C} \right)^B \right]} + A \quad (\text{Gleichung 2})$$

mit	X	Analytkonzentration
	Y	Signalintensität
	A	Obere Asymptote
	B	Steigung am Testmittelpunkt
	C	Testmittelpunkt oder IC_{50} -Wert
	D	Untere Asymptote.

Die Nachweisgrenze wird nach einer Variation der Empfehlung von IUPAC berechnet, indem man die dreifache Standardabweichung des Blindwertes vom Blindmittelwert subtrahiert. Die Subtraktion wird notwendig, da das Signal bei direkten und indirekten Immunoassays mit steigender Analytkonzentration abnimmt.

Die Selektivität von Antikörpern wird mittels Kreuzreaktivität gegenüber dem Analyten strukturell ähnlichen Molekülen ausgedrückt. Die Berechnung der Kreuzreaktivität ist nach JOHNSTON und EISEN wie folgt definiert (Johnston, 1976):

$$\text{Kreuzreaktivität [\%]} = \frac{K_B}{K_A} \cdot 100 \% \quad (\text{Gleichung 3})$$

K_B entspricht hierbei der Affinitätskonstante des Kreuzreaktanden und K_A der Affinitätskonstante des Zielanalyten. Vereinfacht kann auch das Verhältnis der Testmittelpunkte der Kalibrierkurven des Kreuzreaktanden und des Zielanalyten verwendet werden (Weller, 1992).

III Ergebnisse und Diskussion

1 Mikroarray für die parallele Detektion von Mykotoxinen

1.1 Herstellung der Mikroarraychips

Für die Herstellung eines Mikroarrays zur Detektion von Mykotoxinen in Getreide gibt es prinzipiell die Möglichkeit eines direkten und eines indirekten ELISA-Formats. Die Immobilisierung von Haptenen ermöglicht einen indirekt kompetitiven ELISA und eröffnet die Möglichkeit, den Chip regenerierbar zu gestalten. Auch ein direkter ELISA ist regenerierbar, allerdings ist es in einem Multianalytverfahren schwierig, geeignete Regenerationsbedingungen für alle Primärantikörper zu schaffen, ohne diese zu deaktivieren. Außerdem kann die Erweiterung um neue Analyten eine Suche nach neuen Regenerationsbedingungen verlangen, was im indirekten ELISA einfacher zu bewerkstelligen ist. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit das indirekte Format gewählt. Das Prinzip des indirekt kompetitiven ELISAs mit Chemilumineszenzdetektion ist in Abbildung 13 dargestellt.

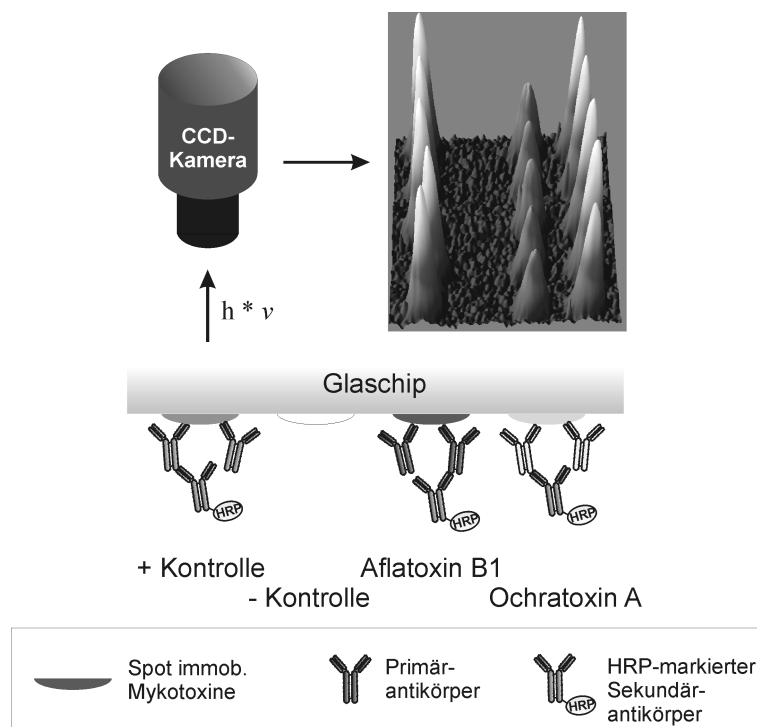


Abbildung 13: Das Prinzip des indirekten ELISAs auf dem Mikroarraychip (unten) und die Chemilumineszenzaufnahme mittels CCD-Kamera (oben).

Die Mykotoxine wurden als Sonden auf dem derivatisierten Glaschip kovalent immobilisiert. Anschließend wurde die Probe mit den Primärantikörpern inkubiert und über den Chip geleitet, auf dem die Competition stattfand. Im nachfolgenden Schritt wird Meerrettichperoxidase (HRP) markierter Sekundärantikörper über den Chip gespült, der im letzten Schritt mit den Substraten Wasserstoffperoxid und Luminol ein Chemilumineszenzsignal erzeugte. Die Detektion sollte mittels der Chemilumineszenzreaktion erfolgen, da diese äußerst sensitiv ist (Tsunoda, 2009). Limitierender Faktor der Chemilumineszenz ist lediglich die geringe Quantenausbeute der Reaktion (Lowry, 2008). Das Hintergrundsignal ist bei der Fluoreszenzdetektion meist höher als bei Chemilumineszenzmessungen, da das eingestrahelte Licht auch den Hintergrund zum Fluoreszieren bringt. Da die Chemilumineszenzreaktion ohne externe Lichtquelle auskommt, ist das Hintergrundsignal sehr gering und das Auslesegerät kann kompakter gestaltet werden. Hier zeigt sich auch ein weiterer Vorteil des indirekten ELISAs: Der Tracer HRP kommt nicht in direkten Kontakt mit der Probe, was beim direkten ELISA der Fall wäre. Somit kann die Aktivität des Tracers nicht durch die Matrix beeinflusst werden.

Als Basis für die Herstellung der Mikroarraychips diente ein Glasobjektträger, wie er in der Lichtmikroskopie verwendet wird, da dieses Substrat einfach und kostengünstig zu beschaffen ist. Glas kommt auch deshalb zum Einsatz, weil es für das bei der Chemilumineszenzreaktion entstehende Licht durchlässig ist. Die Derivatisierung von Glasoberflächen für die Immobilisierung von Haptenen ist in der Literatur ausführlich beschrieben und es wurde in dieser Arbeit auf bekannte Verfahren zurückgegriffen (Wolter, 2007; Kloth, 2009a; Saucedo-Friebe, 2010), die leicht modifiziert wurden. Wie auch schon bei der Testung von Antibiotika in Milch, war eine Kopplung der Mykotoxine an die terminalen Epoxidgruppen eines derivatisierten Glasobjektträgers angedacht. Die erfolgte Derivatisierung der Glasoberflächen ist in Abbildung 14 schematisch dargestellt.

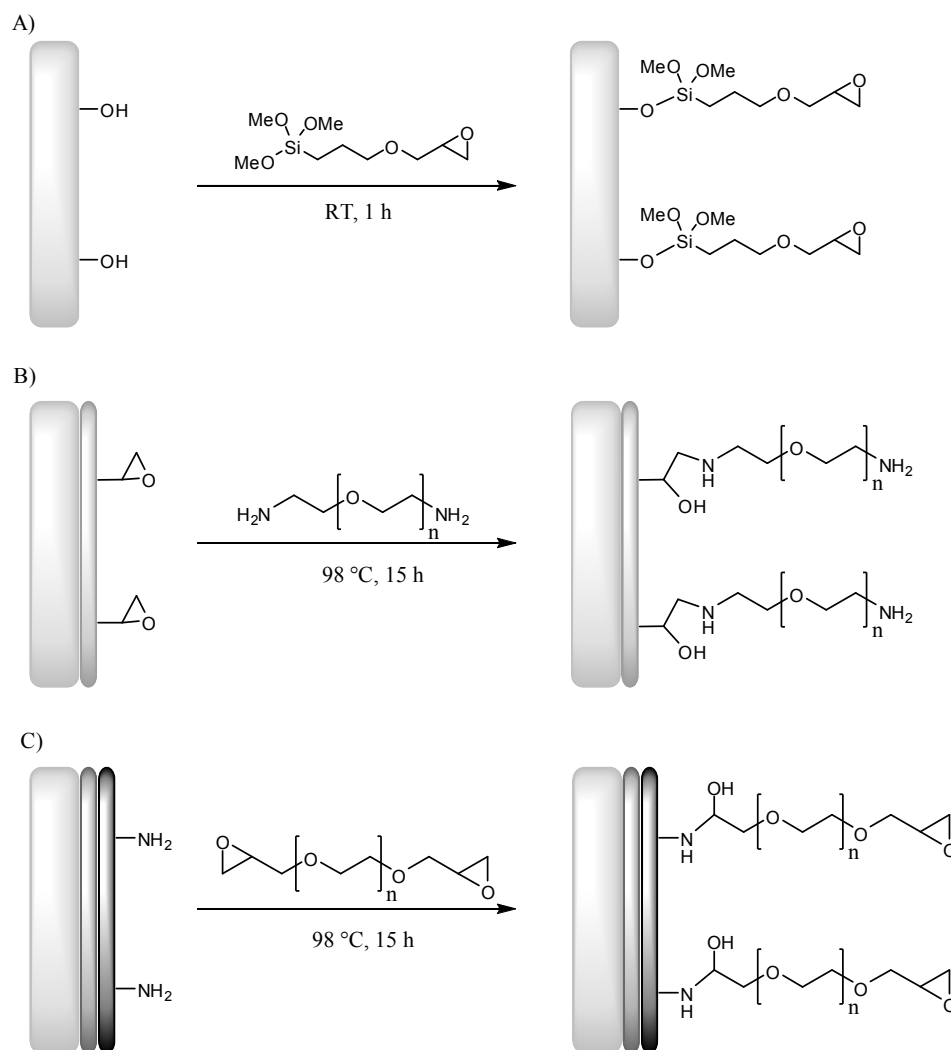


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Derivatisierung der Glasobjektträger. A) Silanisierung mit GOPTS; B) Beschichtung mit Diamino-PEG; C) Kopplung von Diepoxy-PEG.

Die Chips wurden zunächst mit Salzsäure und Schwefelsäure angeätzt. Hierbei wurde die von CRAS et al. beschriebene Methode verwendet (Cras, 1999), wobei die Chips zunächst 30 min in einem 1:1 Methanol:Salzsäure-Gemisch und anschließend 30 min in konzentrierter Schwefelsäure inkubiert wurden. Von CRAS et al. wurde gezeigt, dass diese Methode im Vergleich zu sieben anderen Methoden die reinsten und ebenmäßigsten Oberflächen schufen. Im Vergleich zu vorhergehenden Methoden (Wolter, 2007; Kloth, 2009a) konnte auf die Reinigung mittels Tween verzichtet werden und die Arbeitszeit erheblich verkürzt werden. Anschließend erfolgte die Derivatisierung der terminalen Silanolgruppen mit 3-Glycidyloxypropyl-trimethoxysilan (GOPTS). Abbildung 15 zeigt den Einfluss der Inkubationszeit auf die Signalintensität in der anschließenden Chemilumineszenzmessung der Positivkontrolle Dinitrotoluol (DNT).

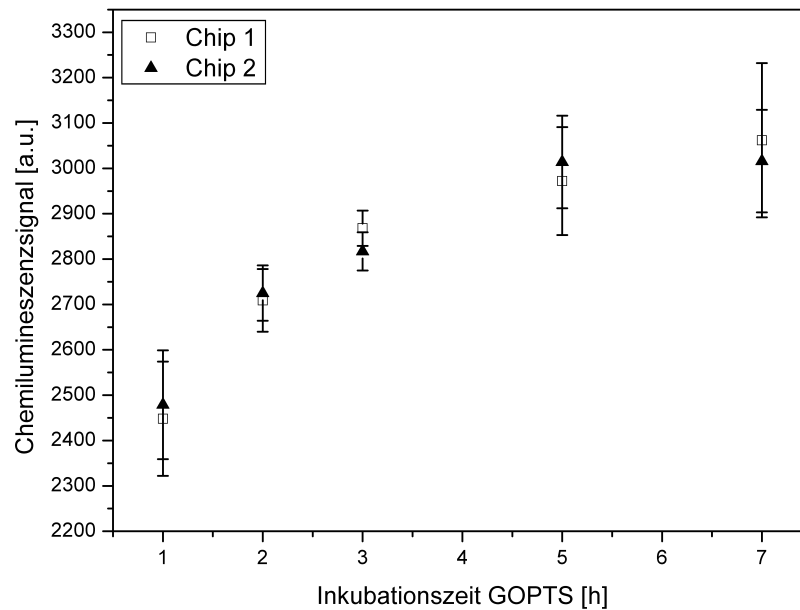


Abbildung 15: Einfluss der Inkubationszeit mit GOPTS auf die Signalstärke der Positivkontrolle DNT ($m = 5$, $s = 1$).

Bisher wurde für GOPTS stets eine Inkubationszeit von 1 h verwendet (Wolter, 2007; Kloth, 2009a). Aus der Literatur ist bekannt, dass nach einer Inkubationszeit von 1 h die Glasoberfläche nicht vollständig mit GOPTS belegt ist (Elbs, 2003), sondern eine Inkubationszeit von 5 h notwendig ist. Diese Ergebnisse konnten, wie in Abbildung 15 dargestellt, bestätigt werden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen einer Inkubationszeit von 3 h und 5 h, weshalb für die folgenden Experimente eine Inkubationszeit mit GOPTS von 3 h verwendet wurde.

Die Epoxidfunktionen der GOPTS-Schicht ermöglichten die nachfolgende kovalente Kopplung von Diaminopolyethylenglykol (DAPEG). Es ist bereits bekannt, dass die Derivatisierung mittels GOPTS und DAPEG im Vergleich zu anderen Materialien für die Oberflächenderivatisierung zu der geringsten unspezifischen Bindung von Proteinen führt (Piehler, 2000). Im letzten Schritt wurde Diepoxypolyethylenglykol (Diepoxy-PEG) an die Oberfläche gekoppelt.

In dieser Arbeit sollten Ochratoxin A (OTA), Zearalenon (ZEA) und die Summe der Aflatoxine B1, B2, G1 und G2 in Getreide qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Die kovalente Immobilisierung der Mykotoxine auf dem derivatisierten Glaschip erfolgte über einen Peptidlinker, wobei die Sequenz Lysin-Glycin-Serin-Glycin-Mykotoxin gewählt wurde. Über die primäre Aminogruppe der Seitenkette des Lysins sollte der Angriff auf die terminale Epoxidgruppe des derivatisierten Glaschips erfolgen. Serin wurde in die Peptidkette eingebaut,

um die Wasserlöslichkeit des gesamten Moleküls zu erhöhen. Dies ist für die Immobilisierung von großer Bedeutung, da für das Kontaktdruckverfahren bei der Herstellung der Mikroarrays wässrige Puffer verwendet werden, um ideale Tropfen auf der hydrophoben Oberfläche zu erzeugen. In Abbildung 16 ist die Immobilisierungsstrategie schematisch dargestellt.

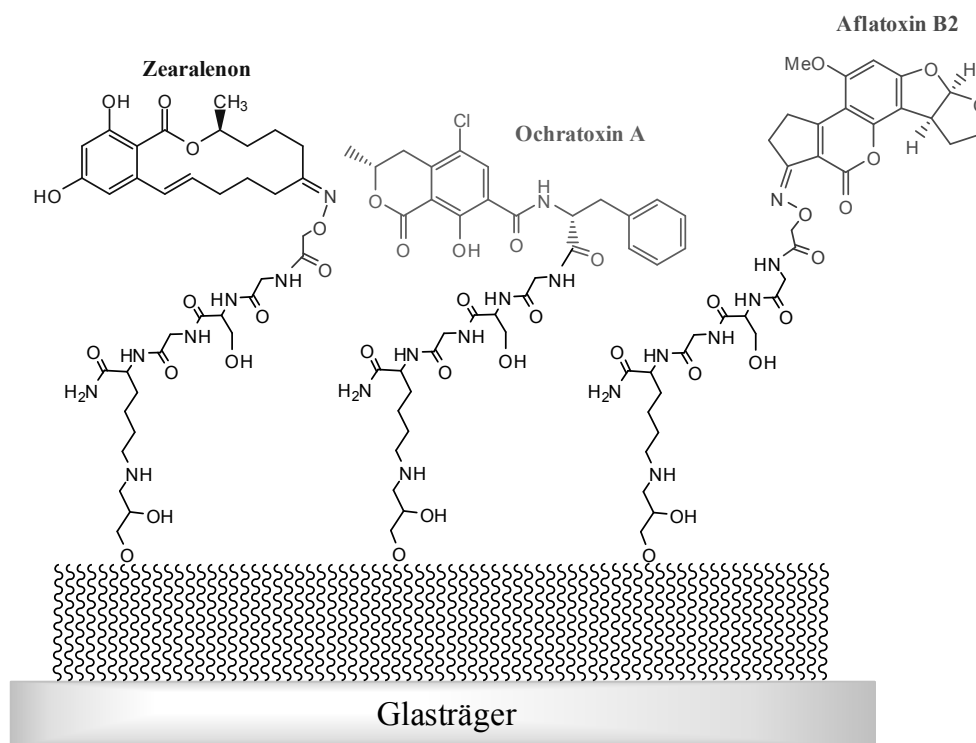


Abbildung 16: Immobilisierung der Mykotoxin-Peptid-Konjugate auf dem derivatisierten Glasobjektträger.

Bei OTA war bereits eine Carboxylgruppe vorhanden, die eine Kopplung an das erdachte Peptid ermöglichte. ZEA und Aflatoxin B2 (AFB2) mussten zunächst modifiziert werden, um eine Kopplung zu ermöglichen. Bei der Derivatisierung von Mykotoxinen sollte darauf geachtet werden, dass die Synthesen möglichst wenig Stufen beinhalten, da zum einen die Handhabung der toxischen Substanzen sehr aufwendig ist und zum anderen die Mykotoxine nur im Milligramm-Bereich käuflich zu erwerben sind. Da jeder Syntheseschritt unweigerlich zu Verlusten führt, können maximal 2 Stufen für die Derivatisierung von Mykotoxinen in Betracht gezogen werden.

Bei AFB2 und ZEA bot sich die Funktionalisierung der Ketogruppe mittels Carboxymethoxylamin (CMO) an. Die vorgenommene Modifikation ist in Abbildung 17 dargestellt.

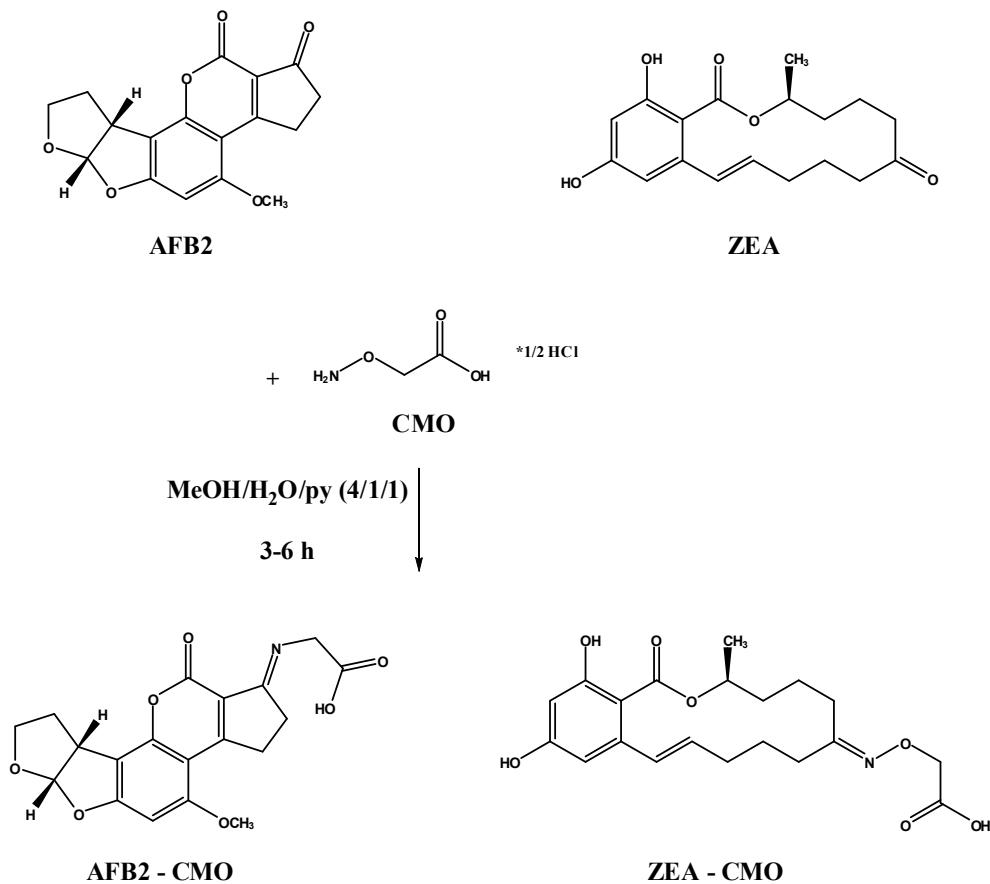


Abbildung 17: Derivatisierung von Aflatoxin B2 (links) und Zearalenon (rechts).

Die Synthese von AFB2-CMO ist bereits aus der Literatur bekannt (Chu, 1977a; Chu, 1977b; Cervino, 2007) und ist in einem Schritt durchführbar. Die Synthese von ZEA-CMO erfolgte analog zu der von AFB2-CMO. CMO wird im Überschuss zu dem in Pyridin gelösten Mykotoxin gegeben und 3 bis 6 h unter Rückfluss erhitzt.

Die Peptidsynthese (siehe Abbildung 18) wurde mittels Festphasensynthese (SPPS) durchgeführt, die hochreine Edukte erfordert, weshalb die Mykotoxinderivate vor der Kopplung an das Peptid mittels präparativer HPLC gereinigt wurden. SPPS wurde zum ersten Mal 1963 von R. B. Merrifield vorgestellt, der die Peptidsynthese durch die Verwendung von Polymerkügelchen als feste Phase stark vereinfachte (Merrifield, 1963). Dieser Weg ermöglicht nicht nur ein einfaches und schnelles Waschen nach jedem Syntheseschritt, sondern auch die automatisierte Herstellung von großen Peptidketten.

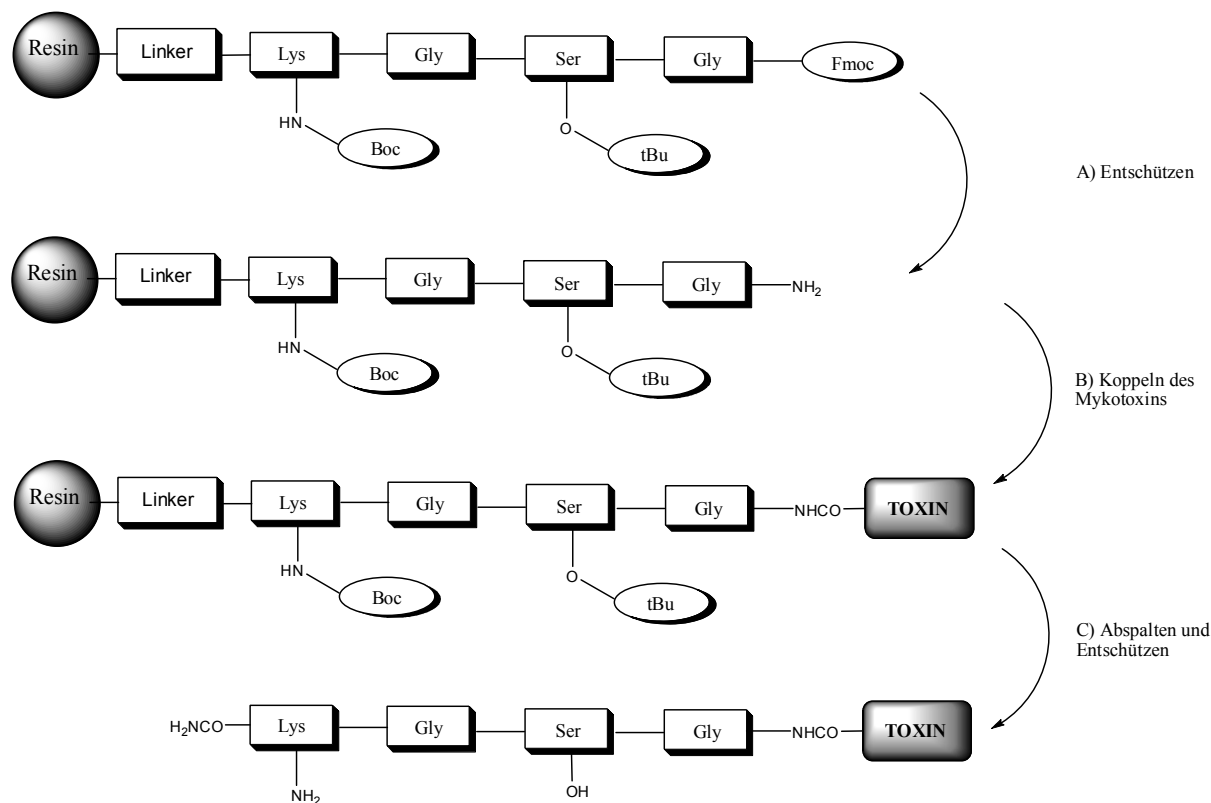


Abbildung 18: Festphasensynthese mit Kopplung der derivatisierten Mykotoxine.

Bei der SPPS wurden die angedachten Aminosäuren schrittweise an das Harz gekoppelt. Es wurde die von CARPINO et al. entwickelte Fmoc/tBu SPPS verwendet, die eine orthogonale Schutzgruppenmethode darstellt (Carpino, 1972; Amblard, 2006). Als temporäre Schutzgruppen dienten hierbei die im Alkalischen labilen Fmoc-Schutzgruppen und als permanente Schutzgruppen die im Sauren labilen Boc- und tBu-Schutzgruppen. Nach dem Demaskieren der letzten Aminosäure wurde das derivatisierte Mykotoxin gekoppelt. Das Mykotoxin-Peptid wurde im Sauren abgespalten, wobei auch die permanenten Schutzgruppen entfernt wurden. Die Aufreinigung erfolgte erneut mittels präparativer HPLC und die Produkte wurden lediglich mittels Massenspektrometrie charakterisiert, da die Produktmengen für eine NMR-Untersuchung nicht ausreichend groß genug waren. Als weitere indirekte Bestätigung der Struktur diente die Erkennung der Mykotoxine auf der Mikroarrayoberfläche durch die jeweiligen Primärantikörper.

Die Immobilisierung der Mykotoxin-Peptide erfolgte durch ein automatisiertes Kontaktverfahren (Barbulovic-Nad, 2006). Hierbei taucht eine Stahlnadel in die zu übertragende Lösung ein und nimmt dabei ein Volumen von 5 nL auf und setzt dieses an einer definierten Stelle auf dem Glaschip ab. Die Sonden wurden hierzu in Carbonatpuffer gelöst, der außerdem DMSO und Glycerin enthielt, um ein Verlaufen und schnelles Austrocknen der

übertragenen Tröpfchen zu verhindern (Sauceda-Friebe, 2010). Als Negativkontrolle wurde Immobilisierungspuffer und als Positivkontrolle Dinitrotoluol (DNT) verwendet. Nach der Fertigstellung der Mikroarray-Chips wurden diese bei Raumtemperatur unter Vakuum gelagert und innerhalb einer Woche verwendet. In Zukunft sollten weitere Lagerbedingungen getestet werden, um eine längere Haltbarkeit der Biochips zu gewährleisten.

1.2 Optimierung des Durchflussassays

Die Auslesung der Mikroarrays erfolgte an dem am Institut über die letzten zehn Jahre entwickelten *Munich Chip Reader 3* (MCR 3; Weller, 1999; Kloth, 2009b). Es handelt sich dabei um ein Benchtop-Gerät zur schnellen, automatisierten Auslesung von Chemilumineszenzmikroarrays. Der ursprüngliche Aufbau (siehe Abbildung 19) wurde leicht modifiziert.

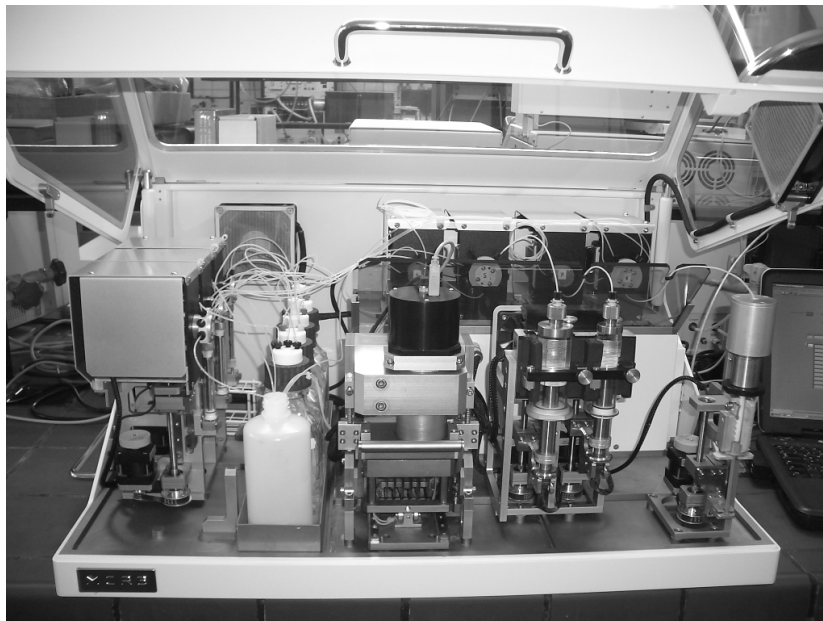


Abbildung 19: Der Munich Chip Reader dritter Generation (MCR 3).

Die Probenspritze, die ursprünglich aus Kunststoff bestand, wurde durch eine Glasspritze ersetzt, da die hydrophoben Mykotoxine an der Kunststoffspritze adsorbieren konnten und somit Verschleppungseffekte unvermeidbar waren.

Das vereinfachte, optimierte Programm benötigte für eine Messung 11 min und ist in Tabelle 7 schematisch dargestellt.

Tabelle 7: Programm des Durchflussassays mit einer Laufzeit von 11 min.

Zweck	Volumen	Zeit
1. Blocken	1000 μ L	46 s
2. Probe / Primärantikörper	je 500 μ L	18 s
3. Waschen und Inkubation	3000 μ L	85 s
4. Sekundärantikörper	1000 μ L	83 s
5. Waschen	2000 μ L	10 s
6. Substrat	400 μ L	6 s
7. Detektion	-	60 s
8. Regeneration	22.5 mL	346 s

Im ersten Schritt musste der Biochip mit Casein geblockt werden. Trotz der dichten PEG-Schicht war dieser Schritt notwendig, um das Hintergrundsignal aufgrund unspezifischer Bindungen zu minimieren. Anschließend erfolgte die Vorinkubation von Probe und Primärantikörper, wonach diese Lösung über den Chip geleitet wurde. Nach einem Waschschrift wurde der Mikroarraychip mit HRP-markiertem Sekundärantikörper inkubiert. Darufhin wurde durch Zugabe von Substratlösung die Chemilumineszenzreaktion ausgelöst, die wiederum über eine CCD-Kamera aufgenommen wurde. Da es sich bei der Substratlösung um zwei voneinander getrennte Lösungen (Luminol und Wasserstoffperoxid) handelt, die mit einer Pumpe aufgezogen und über den Chip geleitet wurden, erfolgte die Aufnahme der 400 μ L Substratlösung schrittweise. Es wurden jeweils abwechselnd 50 μ L Luminol und Wasserstoffperoxid aufgezogen, um eine Durchmischung der Substratlösungen zu gewährleisten, bevor die Lösung über den Chip geleitet wurde. Damit konnte eine ideale Chemilumineszenzausbeute garantiert werden.

Zuletzt folgte eine intensiver Wasch- und Regenerationsvorgang, der viel Zeit (ca. 6 min) und Lösungsmittel (22.5 mL) benötigte. Nur so war es möglich, ein konstantes Signal über mehrere Messzyklen zu erreichen. Zur Erlangung einer besseren Regenerationsfähigkeit wurde die Regenerationslösung in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung über den Chip gespült. Dadurch wurde ein wesentlich besserer Wascherfolg erzielt als durch das einseitige Spülen von Regenerationspuffer.

Es stellte sich heraus, dass im Vergleich zum traditionellen ELISA höhere Konzentrationen an Sekundärantikörper notwendig waren. Im ELISA benötigte man lediglich Verdünnungen von 1:5000 bis 1:8000, wohingegen bei den Messungen am MCR 3 eine Verdünnung von 1:1000 notwendig war. Es könnte deshalb in Zukunft aus Kostengründen sinnvoll sein, die

Primärantikörper direkt mit HRP zu koppeln. Dies würde auch die Messzeit verkürzen und das Auslesegerät ließe sich kleiner gestalten. Nachteilig wäre hierbei allerdings, dass der Tracer HRP in direkten Kontakt mit der Probe käme.

1.3 Messung von Zearalenon

Neben der Quantifizierung von Aflatoxinen und OTA, sollte auch ZEA in Getreideproben quantifiziert werden. Die Regenerierfähigkeit des Biochips für ZEA konnte aus bisher ungeklärten Umständen jedoch nicht bewerkstelligt werden. Im Folgenden sollen die Probleme und Lösungsansätze diskutiert werden.

In allen nachfolgend diskutierten Ergebnissen wurden sowohl der monoklonale Antikörper gegen ZEA 1B11 vom Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der LMU, als auch der käuflich erworbene monoklonale Antikörper gegen ZEA 11C9 der Firma *Antibodies-online* getestet. ZEA wurde wie auch Aflatoxin B2 als Derivat (ZEA-CMO) an ein Peptid gekoppelt und auf der Chipoberfläche immobilisiert. In ersten Regenerationsansätzen zeigte sich, dass das Signal von ZEA innerhalb weniger Zyklen auf Höhe der Negativkontrolle abfiel (siehe Abbildung 20).

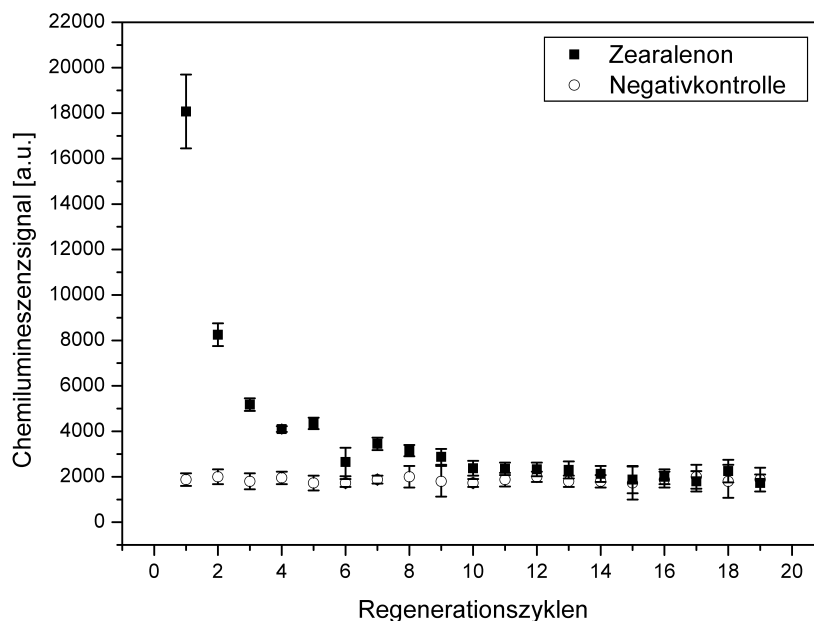


Abbildung 20: Schneller Signalabfall bei Regenerationsmessungen von ZEA auf dem Mikroarraychip (n = 19, m = 5, s = 1).

Dieser Abfall könnte mit einer chemischen Veränderung von ZEA durch Oxidation oder Reduktion funktioneller Gruppen in Zusammenhang stehen. Um dies auszuschließen, wurde

das ZEA-Peptid sowohl mit einer Luminol-Wasserstoffperoxidlösung, als auch mit Regenerationspuffer inkubiert und anschließend mittels analytischer HPLC mit UV/Vis-Detektion untersucht. Hierbei konnte keine Verschiebung der Retentionszeit oder eine Abnahme der Peakfläche des ZEA-Peptids festgestellt werden. Dies deutete darauf hin, dass ZEA gegenüber Oxidation und Reduktion stabil war. Allerdings war das ZEA-Peptid auf dem Mikroarraychip an eine feste Phase gebunden, wodurch sich die Reaktionskinetik änderte. Deshalb wurde über einen frisch hergestellten Biochip zunächst Regenerationspuffer und Luminol-Wasserstoffperoxidlösung gespült und anschließend wurden Regenerationsexperimente durchgeführt. Sollte ZEA chemisch verändert werden, so müsste das Signal von Beginn an niedrig sein, was allerdings nicht der Fall war. Es zeigte sich dasselbe Bild, wie in Abbildung 20 dargestellt, was darauf schließen lässt, dass ZEA chemisch stabil ist.

Es schien unwahrscheinlich, dass das ZEA-Peptid von der Chipoberfläche abgewaschen wurde, da AFB₂- und OTA-Peptid ein stabiles Signal lieferten (siehe Kapitel III.1.4.2). Dennoch wurde ein neues, um Glycin-Lysin erweitertes, ZEA-Peptid synthetisiert. Die Einführung der Aminosäuren Glycin und Lysin sollten einen Angriff zweier freier primärer Aminogruppen (2 Lysine) an die Chipoberfläche ermöglichen und somit eine kovalente Immobilisierung garantieren. Doch auch diese Strategie führte nicht zum gewünschten Erfolg, da das Signal trotz der erweiterten Funktionalisierung des ZEA stets sehr stark abnahm.

Eine weitere Ursache für den starken Signalabfall könnte der Primärantikörper sein. Durch die Regeneration könnte der Fc-Teil des Primärantikörpers denaturiert werden, wodurch eine Bindung des Sekundärantikörpers verhindert würde. Ist der Regenerationspuffer allerdings nicht stark genug, um die Bindung zum ZEA aufzuheben, so würde das Signal rasch abnehmen. In Tabelle 2 sind alle getesteten Regenerationsbedingungen dargestellt.

Tabelle 8: Glycin/HCl-basierte wässrige Regenerationspuffer mit verschiedenen Zusätzen an Natrium-dodecylsulfat (SDS), Acetonitril (ACN), Dimethylsulfoxid (DMSO) und Tween.

Puffer	Glycin [mM]	NaCl [mM]	SDS [% (w/v)]	ACN [% (v/v)]	DMSO [% (v/v)]	Tween [% (w/v)]	pH
1	100	100	0.1				3
2	100	100	0.1				1.8
3	100	100	0.1	50			1.8
4	100	100	0.1		1		2.3
5	100	100	0.1		2		2.3
6	100	100	1				2.3
7	100	100	0			0.1	1.8

Bei Puffer 1 handelt es sich um den Regenerationspuffer, der für AFB₂ und OTA eine ausreichende Regeneration ermöglicht. Puffer 2 bis 7 sind Variationen von Puffer 1, in denen entweder der pH-Wert gesenkt oder verschiedene Zusätze an organischen Lösungsmitteln bzw. Tensiden hinzugefügt wurden. Auf eine Verwendung von alkalischen Puffern wurde verzichtet, da diese die Chipoberfläche, ähnlich wie die Säulenmaterialien in der *reversed-phase* Chromatographie, stark belasten und hydrolysieren. Außerdem ist der Laktoring des ZEA im Alkalischen wenig stabil. Die Verwendung unterschiedlicher Regenerationsbedingungen führte allerdings in keinem Fall zu einem besseren Regenerationsverhalten von ZEA.

In Zukunft könnte für ZEA eine andere Chipoberfläche (DAPEG mit NHS-Aktivierung) und auch andere ZEA-Derivate getestet werden, da die Verwendung von ZEA-Peptiden auf Epoxy-PEG-Oberflächen nicht zum gewünschten Erfolg zu führen scheint.

1.4 Validierung und Messung von Realproben

1.4.1 Kreuzreaktivitäten

Für die Entwicklung einer parallelen Detektion von Aflatoxinen und OTA galt es zunächst deren Kreuzreaktivitätsverhalten zu untersuchen. Es kamen der käuflich zu erwerbende monoklonale Antikörper gegen Ochratoxin A von Soft Flow Biotechnology, sowie der am Institut hergestellte monoklonale Antikörper 1F2 gegen Aflatoxin zum Einsatz (Cervino, 2008a). Die Bestimmung der Kreuzreaktivität erfolgte im indirekten ELISA unter

Verwendung von AFB1-BSA bzw. OTA-BSA als *Coating*-Antigen. Die IC₅₀-Werte für die Mykotoxine AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 und OTA wurden in einzelnen Experimenten ermittelt, wobei aufgestockte Haferextrakte verwendet wurden. Zur Berechnung der Kreuzreaktivität wurde der Quotient der IC₅₀-Werte bezüglich AFB1 bestimmt, wobei die Kreuzreaktivität für AFB1 auf 100 % gesetzt wurde. Es zeigte sich, dass der Antikörper 1F2 mit 57 % (AFG2) bis 103 % (AFB2) eine hohe Kreuzreaktivität gegenüber allen Aflatoxinen hat (siehe Tabelle 9). Deshalb eignet sich dieser besonders zur Bestimmung der Summe der Aflatoxine. Die Kreuzreaktivität gegenüber OTA liegt bei 0 %. Umgekehrt war keine Kreuzreaktivität des anti-OTA-Antikörpers gegenüber den Aflatoxinen messbar. Die Voraussetzungen für eine parallele Quantifizierung von Aflatoxinen und OTA waren damit gegeben.

Tabelle 9: Kreuzreaktivitäten des anti-Aflatoxin Antikörpers 1F2

Antigen	Kreuzreaktivität [%]
Aflatoxin B1	100
Aflatoxin B2	103
Aflatoxin G1	78
Aflatoxin G2	57
Ochratoxin A	0

Eine weitere Schlussfolgerung aus dem Kreuzreaktivitätsverhalten des Antikörpers 1F2 war, dass nicht AFB1, sondern AFB2 (Kreuzreaktivität von 103 %) auf der Chipoberfläche immobilisiert werden konnte. Dies hatte zwei Vorteile: Zum einen konnte die Synthese des Aflatoxin-Peptids mit dem weniger toxischen und damit für den Experimentator angenehmeren AFB2 erfolgen. Zum anderen bestand keine Gefahr der Oxidation des Olefins des AFB1 auf der Chipoberfläche.

1.4.2 Regenerierbarkeit der Mikroarraychips

Die Herstellung der Mikroarraychips ist ein zeit- und arbeitsintensiver Vorgang. Neben der Chipherstellung erfordert v. a. die Synthese und Charakterisierung der Hapten-Derivate ein gut ausgestattetes Labor, sowie geschultes Personal. Wirtschaftlich betrachtet, macht eine Messung folglich nur dann Sinn, wenn der Mikroarray regenerierbar ist.

Bei der Optimierung der Regenerierung gibt es hauptsächlich zwei Faktoren zu beachten: Zum einen müssen die Primärantikörper von der Oberfläche gelöst werden und zum anderen

muss ein Anlagern von Matrixbestandteilen (engl. *biofouling*) verhindert werden. Als optimaler Regenerationspuffer stellte sich der Glycin-HCl-Puffer (pH 3) mit einem Zusatz von Natriumdodecylsulfat heraus. Messungen ohne Matrix zeigten, dass der Chip ohne signifikanten Signalabfall bis zu 40 Zyklen regenerierbar war. Kam allerdings Haferextrakt zum Einsatz, so war der Mikroarraychip lediglich bis zu 30 Zyklen stabil (siehe Abbildung 21). Vom dreißigsten bis zum vierzigsten Regenerationszyklus nahm das Signal von OTA um ca. 7 % und das von AFB2 um ca. 4 % ab. Deshalb wurde nachfolgend jeder Chip für 30 Messungen verwendet.

In Abbildung 21 ist außerdem zu erkennen, dass die erste Messung stets niedrigere Werte lieferte, als die nachfolgenden. Dieser Effekt ist darauf zurückzuführen, dass der Chip eine gewisse Inkubationszeit benötigt, bis sich die PEG-Oberfläche vollständig „gelöst“ hat.

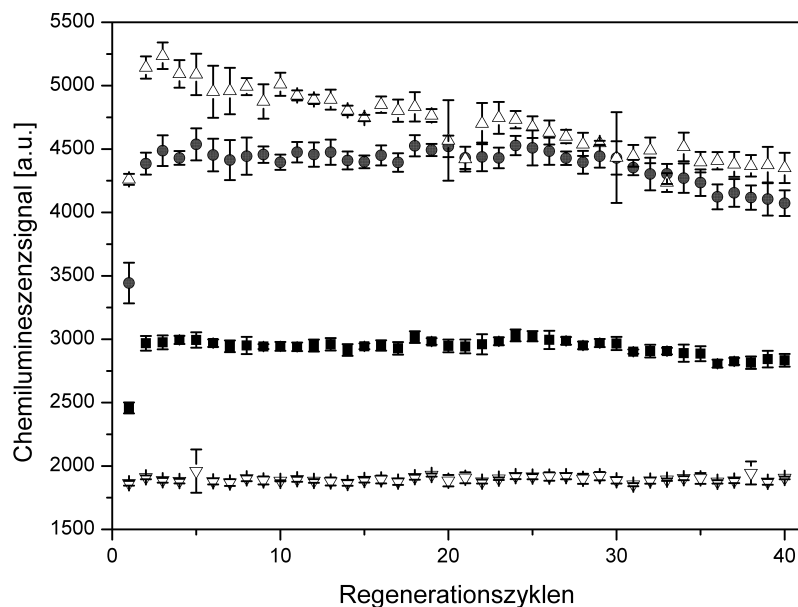


Abbildung 21: Testung der Regenerierbarkeit des Mykotoxinchips mit Hafermatrix: (●) OTA, (■) AFB2, (△) Positivkontrolle DNT, (▽) Negativkontrolle (n = 30, m = 5, s = 1).

Das Signal der Positivkontrolle nahm vom ersten bis zum dreißigsten Zyklus um ca. 14 % ab. Dies war allerdings nicht von Bedeutung, da die Positivkontrolle lediglich zur qualitativen Kontrolle diente. Das Signal war nach der dreißigsten Messung immer noch signifikant vom Untergrund zu unterscheiden, sodass eine qualitative Qualitätskontrolle stets möglich war.

Während der Optimierung des Programms für eine optimale Regeneration des Mikroarraychips stellten sich folgende Strategien als Schlüssel zum Erfolg heraus. Die Regenerierung benötigt große Mengen an Reagenzien (22.5 mL) und ist mit erheblichem

Zeitaufwand (ca. 6 min) verbunden. Kürzere Regenerationszeiten waren bei Verwendung von Getreideextrakten nicht erfolgreich. Des Weiteren stellte sich heraus, dass die Regenerationsfähigkeit des Chips umso besser war, je geringer die Belegung der Oberfläche war. Die zu immobilisierende Mykotoxinkonzentration sollte stets so optimiert werden, dass das Chemilumineszenzsignal nicht über 5000 a. u. liegt. Ein Grund für die schwierigere Regeneration bei hoher Oberflächenbelegung könnte sein, dass jeder Antikörper 2 Antigene binden kann und so schwieriger zu entfernen ist. Der Effekt der Avidität und damit größerer Affinität von IgGs ist aus der Oberflächenplasmonenresonanz bei der Quantifizierung von kleinen Molekülen bekannt (Pope, 2009).

1.4.3 Durchführung kompetitiver Immunoassays

Nachdem die Regenerierfähigkeit des Mikroarraychips sichergestellt war, wurden für AFB1 und OTA parallel kompetitive Immunoassays durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte in mit Mykotoxinen versetztem Haferextrakt und nicht in PBS-Puffer, da die Matrixeinflüsse der Realproben dadurch simuliert werden konnten. Als Standardmethode hat sich die Extraktion mit 80 % (v/v) Acetonitril in Wasser etabliert (Spanjer, 2008). Die Extraktion, auch für die Realproben, erfolgte allerdings mit 80 % Methanol in Wasser (DIN EN 14123). Diese Methode wird für immunanalytische Methoden verwendet, da Antikörper einen, im Vergleich zu z. B. Acetonitril, geringen Aktivitätsverlust in methanolhaltigen Lösungen zeigen (Zeck, 2001). Außerdem wurde Kochsalz zugegeben, um Proteine durch das so genannte „Aussalzen“ zu entfernen (Mol, 2008). Der Extrakt musste außerdem nach der Extraktion um den Faktor vier auf einen Methanolgehalt von 20 % mit PBS-Puffer verdünnt werden, um eine ausreichende Antikörperaktivität zu gewährleisten. Insgesamt führt dieses Extraktionsverfahren zu einem Verdünnungsfaktor von 16. Die ohnehin niedrigen Grenzwerte für Aflatoxine und OTA von 4 µg/kg bzw. von 5 µg/kg werden damit auf einen Wert von 0.25 µg/L und 0.31 µg/L gesenkt. Die verwendeten Antikörper müssen daher äußerst sensitiv sein.

Für die Kalibrierung wurden mit PBS verdünnte Haferextrakte (20 % Methanol) mit 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 und 5 µg/L AFB1 und OTA versetzt. Die erhaltenen Kalibrierkurven sind in Abbildung 22 dargestellt.

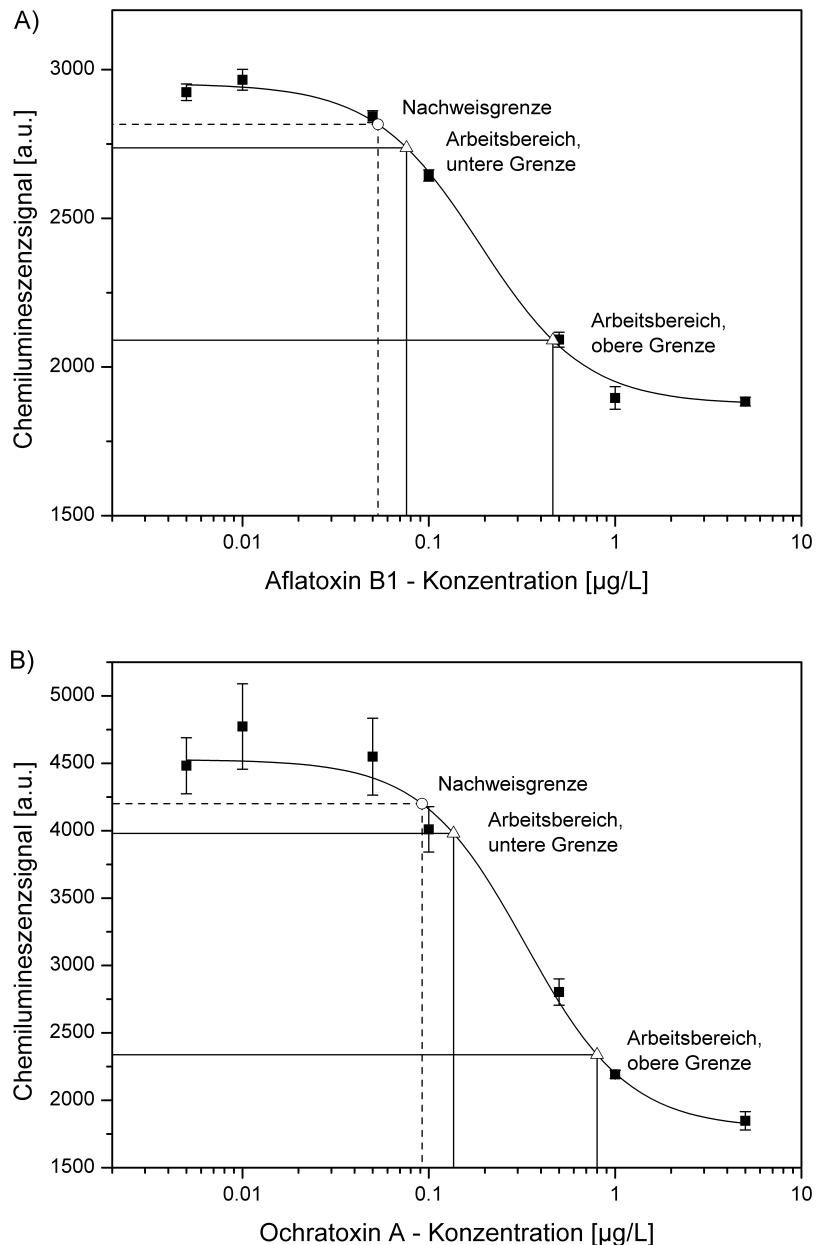


Abbildung 22: Kalibrierkurven für Aflatoxin B1 (A) und Ochratoxin A (B) mit berechneten Arbeitsbereichen und Nachweisgrenzen ($n = 7$, $m = 5$, $s = 1$).

Für die Bestimmung der Nachweisgrenze (IUPAC) wurde eine Hafer-Blankprobe zehn Mal hintereinander gemessen. Von dem Mittelwert dieser zehn Messungen wurde deren dreifache Standardabweichung subtrahiert und der erhaltene Wert in die Kalibrierkurve eingesetzt. Die Nachweisgrenze für AFB1 lag bei $0.053 \mu\text{g/L}$, was bei einem Verdünnungsfaktor von 16 $0.9 \mu\text{g/kg}$ entspricht. Für OTA lag die Nachweisgrenze bei $0.092 \mu\text{g/L}$ bzw. $1.5 \mu\text{g/kg}$. Im Vergleich dazu zeigt z. B. der fluoreszenzbasierte Array Biosensor des *Naval Research Laboratory* (NRL) höhere Nachweisgrenzen. Für AFB1 liegt die Nachweisgrenze in einer

Einzelanalyse bei 5.1 µg/kg und für OTA bei 3.8 µg/kg (Ngundi, 1995; Sapsford, 2006). Bei einer Multianalyse liegt die Nachweisgrenze für OTA sogar bei 15 µg/kg (Ngundi, 2006). Die Messung im gesetzlich relevanten Bereich ist somit mit dem NRL Biosensor nicht möglich. Außerdem unterstreicht der Vergleich der neuen Methode mit dem NRL Biosensor die hohe Sensitivität von Chemilumineszenzmessungen mit dem MCR 3.

Als Arbeitsbereich wurde der lineare Bereich der Kalibrierkurven zwischen 80 % und 20 % der oberen Asymptote definiert. Dieser lag für AFB1 bei 0.10 - 0.53 µg/L bzw. 1.6 - 8.5 µg/kg und für OTA bei 0.15 - 0.74 µg/L bzw. 2.4 - 11.9 µg/kg. Die Arbeitsbereiche lagen somit genau in dem gesetzlich relevanten Bereich, da nach der deutschen Mykotoxin-Höchstmengenverordnung für die Summe der Aflatoxine ein Wert von 4 µg/kg und für OTA ein Wert von 5 µg/kg in Getreide nicht überschritten werden darf.

Zur Testung der Robustheit der Methode wurde eine Mehrtagesstudie durchgeführt. Innerhalb von fünf Tagen wurden drei Kalibrierkurven für AFB1 und OTA auf drei verschiedenen Mikroarraychips derselben Chipcharge aufgenommen. Die Ergebnisse der Mehrtagesstudie sind in Abbildung 23 dargestellt.

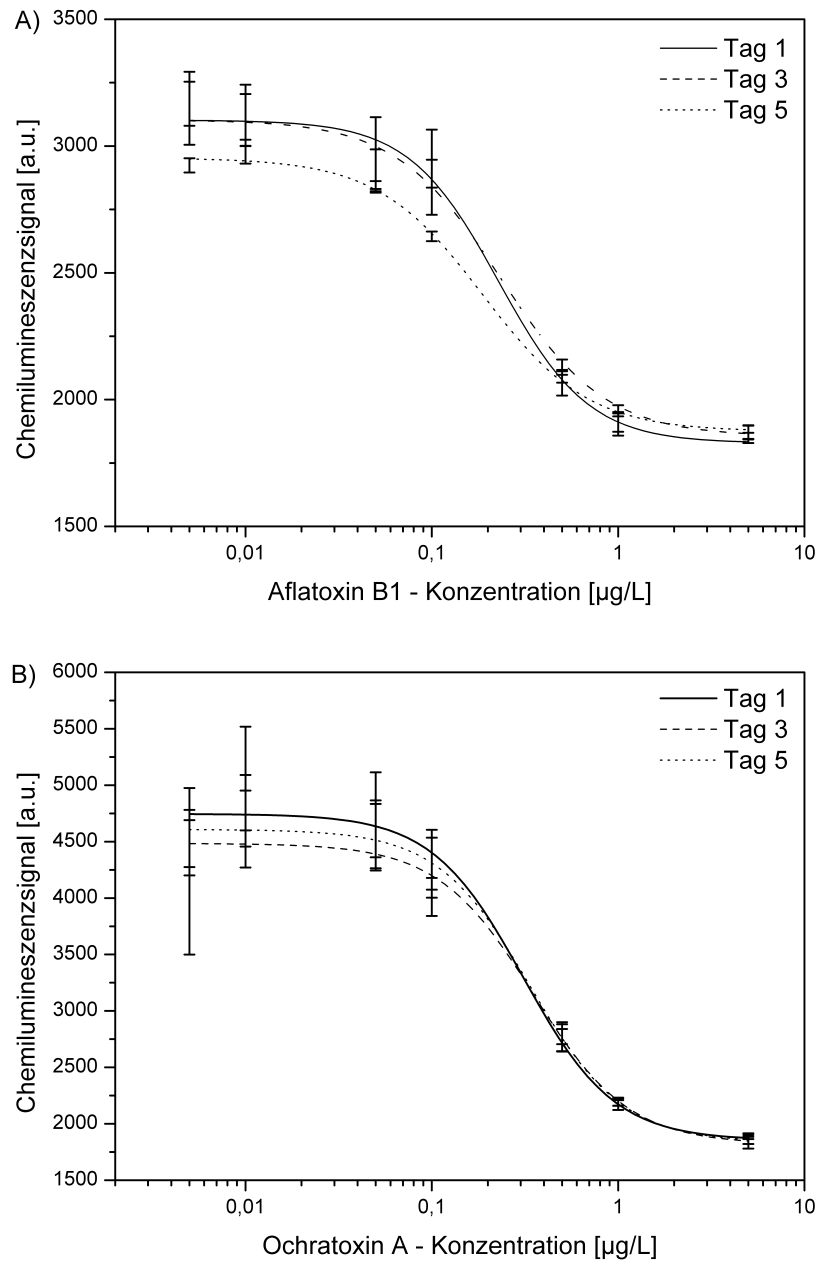


Abbildung 23: Mehrtagesstudie für Aflatoxin B1 (A) und Ochratoxin A (B).

Das Blanksignal war für beide Analyten am Tag 1, 3 und 5 innerhalb der Messgenauigkeit gleich groß. Dies deutet darauf hin, dass die Mikroarraychips mindestens 5 Tage lagerbar sind. Das Chemilumineszenzsignal wurde für den Vergleich in Abbildung 23 nicht normiert, was die hohe Robustheit der Methode unterstreicht.

In Tabelle 10 sind die IC_{50} -Werte, die Arbeitsbereiche und die Steigungen der Kalibrierkurven der Mehrtagesstudie dargestellt.

Tabelle 10: Vergleich der IC_{50} -Werte, der Arbeitsbereiche und der Steigung der Kalibrierkurven der Mehrtagesstudie (mit Interassay-Standardabweichung, $n = 3$, $s = 1$).

	Aflatoxine				Ochratoxin A			
	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Mittelwert	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Mittelwert
IC_{50} [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	3.66	3.38	3.00	3.35 ± 0.33	5.12	5.28	5.510	5.30 ± 0.20
Linearer Bereich [$\mu\text{g}/\text{kg}$]:								
Untere Grenze	1.58	1.53	1.22	1.44 ± 0.20	2.40	2.17	2.53	2.37 ± 0.18
Obere Grenze	8.45	7.47	7.41	7.78 ± 0.58	10.9	12.8	12.0	11.9 ± 0.9
Steigung	1.66	1.75	1.53	1.65 ± 0.11	1.83	1.56	1.78	1.72 ± 0.14

Im Falle des AFB1 lagen die Standardabweichungen für die IC_{50} -Werte, die Steigung und die obere Grenze des Arbeitsbereichs der Mehrtagesstudie unter 10 %. Die Standardabweichungen für die untere Grenze des Arbeitsbereichs lag bei 14 %. Bei OTA lagen die Standardabweichungen für alle Parameter unterhalb von 8 %. Dieser Vergleich zeigt, dass die neue Methode reproduzierbare Daten liefert.

Die Mehrtagesstudie wurde mit Chips aus derselben Chipcharge durchgeführt. Bei Verwendung anderer Chipchargen konnte der IC_{50} -Wert reproduziert werden, die Signalintensität der Blankmessung war allerdings nicht reproduzierbar. Dies ist auf die wenig automatisierte Chipproduktion zurückzuführen. In Zukunft sollten alle Schritte der Chipproduktion automatisiert werden, um vergleichbare Chipchargen zu erhalten.

1.4.4 Messung von Realproben

Für die Messung von Realproben wurde Haferextrakt zur Kalibrierung verwendet, da sich damit die besten Wiederfindungsraten für aufgestockte Hafer-, Weizen- und Roggenproben erzielen ließen. Wurden Roggen- oder Weizenextrakt verwendet, so kam es zur Überbestimmung aller aufgestockten Realproben.

In Tabelle 11 sind die Wiederfindungsraten für Aflatoxine und OTA aus parallelen Messungen dargestellt.

Tabelle 11: Wiederfindungsraten mit eigens aufgestockten Proben ($m = 5$, $s = 1$; 6*: Hierbei handelt es sich um Realproben, die mit je $1.5 \mu\text{g/kg}$ Aflatoxin B1, B2, G1 und G2 aufgestockt wurden).

Matrix	Aflatoxine			Ochratoxin A		
	Zugesetzte Konz. [$\mu\text{g/kg}$]	Gefundene Konz. [$\mu\text{g/kg}$]	Wiederfindung [%]	Zugesetzte Konz. [$\mu\text{g/kg}$]	Gefundene Konz. [$\mu\text{g/kg}$]	Wiederfindung [%]
Hafer	0	/	/	0	/	/
Hafer	1	1.4 ± 0.7	140 ± 70	3	2.6 ± 0.8	87 ± 27
Hafer	6	4.3 ± 0.8	72 ± 13	7	6.4 ± 0.7	91 ± 10
Hafer	6*	7.9 ± 1.9	132 ± 32			
Weizen	0	/	/	0	/	/
Weizen	1	1.5 ± 0.8	150 ± 80	3	3.1 ± 0.8	103 ± 27
Weizen	6	5.2 ± 0.5	87 ± 8	7	8.4 ± 3.6	120 ± 51
Weizen	6*	7.7 ± 0.9	128 ± 15			
Roggen	0	/	/	0	/	/
Roggen	1	1.6 ± 0.7	160 ± 70	3	3.6 ± 0.8	120 ± 27
Roggen	6	4.6 ± 0.9	77 ± 15	7	7.0 ± 0.8	100 ± 11
Roggen	6*	6.9 ± 1.2	115 ± 20			

Die Ergebnisse zeigen, dass die Blankproben für alle Matrices (Hafer, Weizen und Roggen) als solche identifiziert worden. Sämtliche Messwerte lagen unterhalb der Nachweisgrenze.

Im nächsten Schritt wurden Realproben mit $1 \mu\text{g/kg}$ AFB1 und $3 \mu\text{g/kg}$ OTA aufgestockt. Dies sollte eine belastete Probe simulieren, deren Belastung allerdings unterhalb der gesetzlich erlaubten Höchstmenge lag. Die Wiederfindungsraten lagen hierbei zwischen 140 und 160 % für AFB1. Die Überbestimmung ist dadurch zu erklären, dass die aufgestockte Menge von $1 \mu\text{g/kg}$ AFB1 nahe der Nachweisgrenze von $0.9 \mu\text{g/kg}$ lag. Für OTA lagen die Wiederfindungsraten zwischen 87 und 120 %.

Des Weiteren wurden Proben hergestellt, die belastete Proben simulieren sollten, deren Belastung oberhalb der gesetzlich erlaubten Höchstmengen lag. Dazu wurden Realproben mit $6 \mu\text{g/kg}$ AFB1 und $7 \mu\text{g/kg}$ OTA aufgestockt. Es ergaben sich Wiederfindungsraten von 72 bis 87 % für AFB1 und 91 bis 120 % für OTA.

Aufgrund des Kreuzreaktivitätsverhaltens des Antikörpers 1F2 eignet sich dieser zur Summenbestimmung der Aflatoxine. Deshalb wurden 3 verschiedene Proben mit je 1.5 µg/kg AFB1, B2, G1 und G2 aufgestockt und die Wiederfindungsraten bestimmt. Diese lagen zwischen 115 und 132 %. Die Bestimmung der Summe der Aflatoxine in Realproben ist damit in allen drei Matrices möglich.

Alle Wiederfindungsraten liegen sowohl für Aflatoxine, als auch für OTA in einem für ELISA-Tests akzeptablen Bereich. Die neue Methode scheint für ein Screeningverfahren zur Detektion von Aflatoxinen und OTA in Hafer, Weizen und Roggen geeignet zu sein. Die Wiederfindungsraten wurden an allen Tagen der Mehrtagesstudie gemessen. Aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit der Kalibrierkurven war es möglich z. B. die Werte für die aufgestockten Realproben von Tag 5 in die Kalibrierkurve von Tag 1 einzusetzen und die gleichen Wiederfindungsraten zu erhalten. Bei Verwendung einer Chipcharge ist somit eine Kalibrierung pro Woche ausreichend.

Die mit dem Mikroarray bestimmten Wiederfindungsraten wurden am Beispiel von aufgestockten Haferproben mit dem klassischen ELISA in der Mikrotiterplatte verglichen. In dem durchgeführten indirekten ELISA wurden dieselben Antikörperverdünnungen verwendet, wie in dem Chip-basierten Verfahren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 12: Bestimmung der Wiederfindungsraten mit dem traditionellen ELISA (m = 3, s = 1).

Matrix	Aflatoxine			Ochratoxin A		
	Zugesetzte Konz. [µg/kg]	Gefundene Konz. [µg/kg]	Wiederfindung [%]	Zugesetzte Konz. [µg/kg]	Gefundene Konz. [µg/kg]	Wiederfindung [%]
Hafer	0	/	/	0	/	/
Hafer	1	0.7 ± 0.0	70 ± 0	3	3.1 ± 0.4	103 ± 13
Hafer	6	4.0 ± 0.1	67 ± 2	7	5.4 ± 0.5	77 ± 7
Hafer	6*	6.2 ± 0.1	103 ± 2			

Die mit dem traditionellen ELISA erhaltenen Wiederfindungsraten liegen zwischen 67 und 103 %. Damit liegen sie in einem ähnlichen Bereich wie die Wiederfindungsraten der Mikroarraymessungen. Die Standardabweichungen im traditionellen ELISA (0 bis 13 %) fallen deutlich niedriger aus als bei den automatisierten Messungen mit dem MCR 3 (8 bis 80 %). Da sich die Standardabweichung für die Mikroarraymessungen aus der Interpotabweichung berechnet, ist diese mit 8 bis 80 % sehr groß. Das verwendete Kontaktverfahren für die Immobilisierung der Mykotoxine scheint deshalb wenig geeignet für

die reproduzierbare Herstellung von Mikroarraychips zu sein. Der große Vorteil der Chip-basierten Messung gegenüber dem Plattentest ist die kurze Messzeit von nur 11 min. Die Durchführung klassischer ELISAs benötigt dagegen mehrere Stunden.

Zur Validierung der Methode wurden auch die Wiederfindungsraten zweier zertifizierter Referenzmaterialien bestimmt. Für Aflatoxine konnten keine Referenzmaterialien für Hafer, Weizen oder Roggen kommerziell erworben werden. Für OTA existieren zwei Referenzmaterialien: die Blankprobe BCR-471 (OTA <0.6 µg/kg in Weizen) und das belastete Referenzmaterial „Ochratoxin A (2.7 ± 1.0 µg/kg) in Weizen“. Die mit dem Mikroarraychip gemessenen Wiederfindungsraten sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Messung von zertifizierten Referenzmaterialien mit Interassay-Standardabweichung (n = 2, m = 5, s = 1).

Matrix	Gegebene Konz. [µg/kg]	Gefundene Konz. [µg/kg]	Wiederfindung [%]
Weizen	blank	/	/
Weizen	2.7 ± 1.0	2.4 ± 1.0	89 ± 37

Beide Referenzmaterialien wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen gemessen. Die Blankprobe wurde als solche identifiziert. Der gemessene Wert lag unterhalb der Nachweisgrenze. Die Wiederfindungsrate für die kontaminierte Probe lag bei 89 %. Diese Ergebnisse zeigen, dass der neu entwickelte Chemilumineszenzmikroarray für die quantitative und qualitative Bestimmung von Mykotoxinen in Getreideproben, sowie zur Überprüfung der gesetzlich relevanten Grenzwerte gut geeignet ist.

2 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Benzo[a]pyren

Die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Benzo[a]pyren (B[a]P) sollte mittels Hybridomzelltechnik nach KÖHLER und MILSTEIN erfolgen (Köhler, 1975). Die Immunisierung der Mäuse und die Fusionierung mit Krebszellen, sowie die Kultivierung der Hybridomzellen wurden am Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt. Das Screening der Zellkulturüberstände (ZKÜs) erfolgte am Institut für Wasserchemie. Neben den klassischen Tests in der Mikrotiterplatte (MTP) wurde auch ein neues Chip-basiertes Verfahren getestet. Anschließend wurden die positiven Klone bezüglich ihrer Affinität und Selektivität charakterisiert.

2.1 Synthese von Hapten-Protein-Konjugaten

Haptene sind Moleküle, die zu klein sind, um in Wirbeltieren eine Immunantwort auszulösen. Die Produktion von Antikörpern ist deshalb nur über den Umweg der Kopplung des Haptens an ein großes Molekül möglich. Als Träger (engl. *carrier*) werden meist Proteine, wie Bovines Serumalbumin (BSA), Rinderthyroglobulin (TG) oder Schlüsselloch-Schnecken-Hämocyanin (KLH) verwendet. KLH wirkt als Immunogen besonders stark, da es aus einem wirbeltierfremden Organismus stammt. Allerdings wurde der natürliche Bestand der Schlüssellochnapfschnecke durch die Verwendung von KLH bereits stark dezimiert, weshalb auf den Einsatz von KLH verzichtet wurde. Für die Immunisierung wurden B[a]P-BSA-Konjugate und für die anschließende Testung B[a]P-BSA-, sowie B[a]P-Meerrettichperoxidase (HRP)-Konjugate verwendet.

B[a]P enthält keinerlei funktionelle Gruppen, über die eine Kopplung an ein Protein erfolgen könnte, weshalb über einen chemischen Linker eine Carboxylfunktion eingeführt werden musste. Zur Immunisierung sollten verschiedene B[a]P-Derivate verwendet werden, da keine bevorzugte Linkerposition ausgemacht werden konnte. Die Nummerierung der äußeren Kohlenstoffatome von B[a]P ist in Abbildung 24 dargestellt.

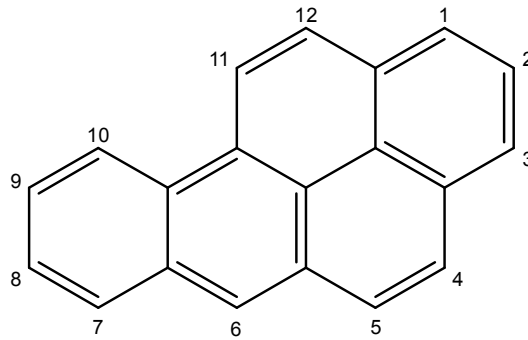


Abbildung 24: Struktur von Benzo[a]pyren.

Das Institut für Biochemische Umweltkarzinogene (Ahrensburg) synthetisierte im Auftrag des IWC 6-, 7- und 10-Benzo[a]pyren-Buttersäure. Der Buttersäurelinker garantiert, dass das Molekül B[a]P weit genug von der Proteinoberfläche entfernt ist, um einen optimalen Angriff des Antikörpers zu ermöglichen. Die Aktivierung der Carboxylgruppe der B[a]P-Derivate erfolgte mittels *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) in Dioxan. Anschließend wurde der in Dioxan gelöste NHS-Ester zu dem in Carbonatpuffer gelösten Protein gegeben, wobei hierbei die schlechte Wasserlöslichkeit der Haptene problematisch war. Die Kopplung an das Protein muss in wässrigem Puffer erfolgen, da das Protein in organischem Lösungsmittel denaturiert. Ein 1/1-Gemisch aus Puffer und Dioxan erwies sich als ideal, da sowohl die Struktur des Proteins erhalten blieb, als auch ausreichend hohe Kopplungsdichten erreicht werden konnten. Die Reinigung der Hapten-Protein-Konjugate erfolgte über Gelpermeationschromatographie (GPC). Zur anschließenden Bestimmung der Kopplungsdichte wurde Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) verwendet. In Abbildung 25 sind die Massenspektren von BSA (oben) und 7-B[a]P-BSA (unten) dargestellt.

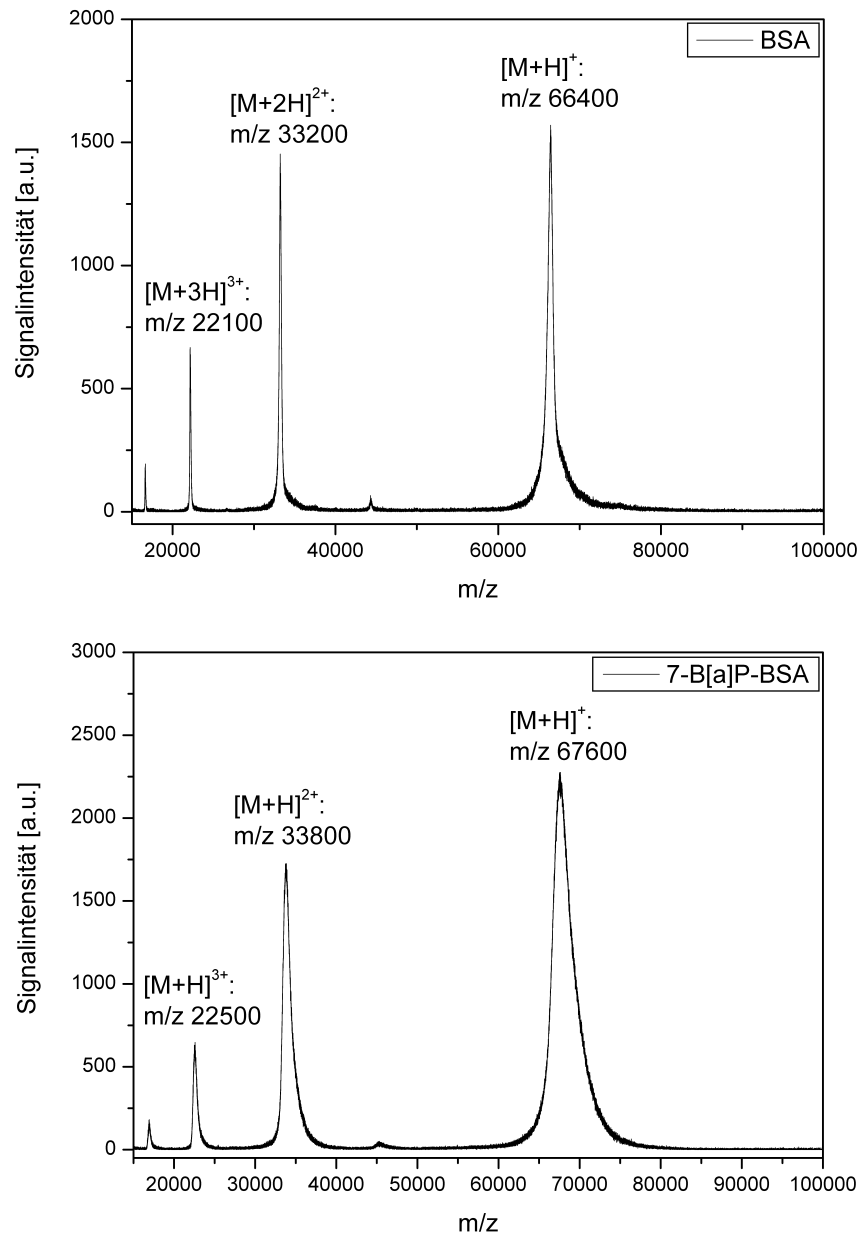


Abbildung 25: MALDI-MS-Spektren von BSA (oben) und 7-B[a]P-BSA (unten).

Das Maximum der Molmasse $[M+H]^+$ war im Falle von 7-B[a]P-BSA um ca. 1200 m/z höher als die von BSA. Daraus lässt sich eine mittlere Kopplungsdichte von 4 Molekülen B[a]P pro Molekül BSA errechnen.

In Tabelle 14 sind die mittleren Kopplungsdichten aller synthetisierten Hapten-Protein-Konjugate angegeben.

Tabelle 14: Mittlere Kopplungsdichte der synthetisierten Hapten-Protein-Konjugate.

Konjugat	Mittlere Kopplungsdichte
7-B[a]P-BSA	4
10-B[a]P-BSA	6
7-B[a]P-HRP	1-2
10-B[a]P-HRP	1-2
Chrysenyl-BSA	8
Benzo[a]anthracenyl-BSA	9
Pyrenyl-BSA	12
Fluoranthenyl-BSA	12

Die mittleren Kopplungsdichten waren bei allen Konjugaten relativ niedrig, für einen ELISA-Test allerdings ausreichend groß. Es stellte sich heraus, dass die Aufreinigung mittels GPC für die stark hydrophoben PAK-Konjugate ungeeignet war. Ein Großteil der Konjugate blieb an den GPC-Kartuschen haften und konnte nicht eluiert werden. In Zukunft sollte die Reinigung von PAK-Protein-Konjugaten daher über Dialyse erfolgen. Für das ZKÜ-Screening in der Mikrotiterplatte wurden sowohl 7-, als auch 10-B[a]P-BSA hergestellt. 7-, und 10-B[a]P-HRP kamen im Chip-basierten Screening zum Einsatz. Die mittlere Kopplungsdichte lag bei den HRP-Konjugaten nur zwischen eins und zwei, da die HRP lediglich drei zugängliche Lysinseitengruppen hat, über die eine Kopplung von B[a]P-Buttersäure möglich ist (Berglund, 2002). Neben den B[a]P-Derivaten wurden auch B[a]P ähnliche PAKs, wie Chrysen, Benzo[a]anthracen, Pyren und Fluoranthen an BSA gekoppelt. Die mittlere Kopplungsdichte lag zwischen acht und zwölf. Die B[a]P ähnlichen Hapten-Konjugate wurden zum Beschichten von MTPs für indirekt kompetitive ELISAs verwendet, mit dem Ziel sensitivere Assays zu generieren (siehe Kapitel III.2.5.3).

2.2 Immunisierung, Fusionierung und Zellkulturüberstandsscreening

Acht weibliche BALB/c Mäuse (10 Wochen alt) wurden mit 75 µg einer B[a]P-BSA Mischung in 200 µL Kochsalzlösung (154 mM) und 300 µL komplettem Freund'schen Adjuvans immunisiert. Bei der Mischung handelte es sich um 6-, 7-, und 10-B[a]P-BSA mit einer Kopplungsdichte von 26 Molekülen B[a]P pro Molekül BSA, die bereits bei der vorangegangenen Immunisierung zum Einsatz kam (Matschulat, 2005). Die Immunisierungen wurden nach 5 und 7 Wochen mit je 75 µg B[a]P-BSA-Mischung in unvollständigem Freund'schen Adjuvans wiederholt. In Abhängigkeit des Titers des Mäuseserums wurde der Zeitpunkt der Fusionierung bestimmt. Der Titer ist der Kehrwert der Serumverdünnung, die noch ein signifikantes Signal (Negativkontrolle plus deren dreifache Standardabweichung) im ELISA ergibt. Bei hohem Titer steigt die Wahrscheinlichkeit eine hohe Anzahl an antikörperproduzierende Hybridomzellen im Fusionsansatz zu erhalten. Lag der Titer oberhalb von 10^5 , wurde die Fusionierung eingeleitet. Jeweils vier Tage und ein Tag vor der Fusionierung wurden die Mäuse mit 30 µg B[a]P-BSA-Mischung hyperimmunisiert. Für die Fusionierung wurden die extrahierten Milzzellen der immunisierten Mäuse mit den Myelomzellen und Polyethylenglykol vermischt. Nach einer dreiwöchigen Selektion der fusionierten Zellen auf Hypoxanthin/Aminopterin/Thymidin (HAT)-Selektionsmedium, wurden die Zellen wiederholt durch Verdünnen vereinzelt und anschließend deren ZKÜ auf B[a]P-spezifische Antikörper untersucht.

Für das Screening von ZKÜs kommt hauptsächlich der indirekte ELISA in der MTP zum Einsatz (Mesci, 2007; Cervino, 2008a; Wang, 2009). Diese Methode ist einfach durchzuführen und benötigt nur geringen instrumentellen Aufwand. Außerdem sind parallele Messungen möglich, was den Zeitaufwand reduziert.

Das Screening von insgesamt 110 ZKÜs wurde zunächst im direkten und indirekten ELISA in der MTP durchgeführt. Beide Formate wurden sowohl mit 7-B[a]P- als auch 10-B[a]P-Proteinkonjugaten untersucht, wobei mit beiden Konjugaten die gleiche Anzahl an positiven Klonen identifiziert wurde (Daten nicht gezeigt). Die Kreuzreaktivität der Antikörper gegenüber beiden Konjugaten schien gleich groß zu sein, was die Vermutung bestätigte, dass es für die Immunisierung keine bevorzugte Linkerposition am B[a]P gibt. In allen weiteren Experimenten wurden daher nur die 10-B[a]P-Konjugate verwendet. In Abbildung 26 ist der Vergleich der Screenings des direkten und indirekten ELISAs in der MTP gezeigt.

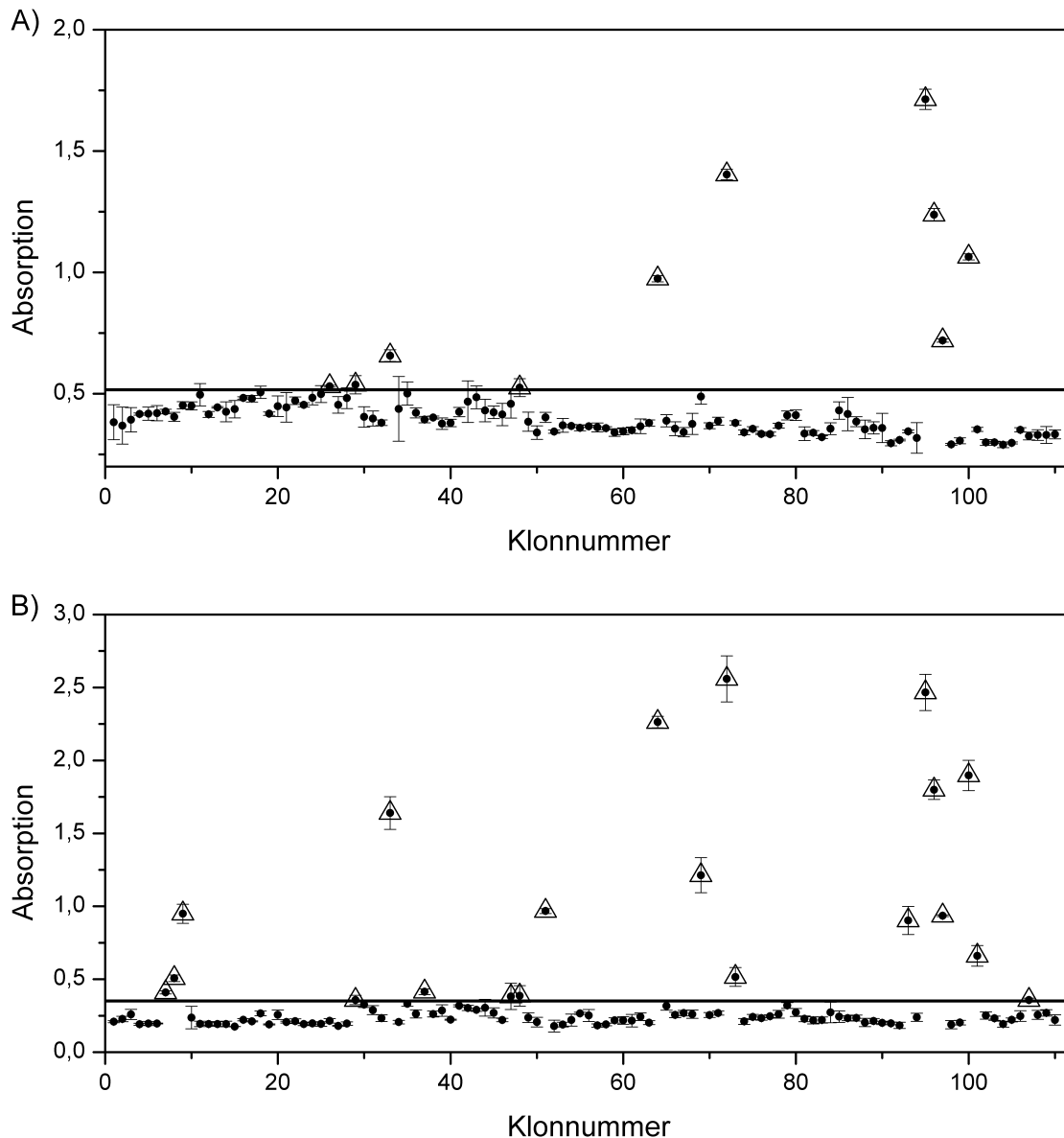


Abbildung 26: Vergleich der Screeningmethoden in der MTP: A) direkter ELISA, B) indirekter ELISA ($m = 3$, $s = 1$). Alle Messpunkte, die oberhalb des Schwellenwerts (Negativkontrolle plus deren dreifache Standardabweichung) liegen, gelten als positive Klone. Sie sind durch Dreiecke gekennzeichnet.

Als richtig positiv galten all diejenigen Klone, die im anschließend durchgeführten indirekt kompetitiven ELISA eine Verdrängung durch freien Analyten zeigten. Als falsch positiv galten folglich die Klone, für die keine Kalibrierkurve erzeugt werden konnte. Da der höchste Kalibrierstandard bei $1000 \mu\text{g/L}$ B[a]P lag, wurden potentiell auch solche Klone als falsch positiv bezeichnet, deren IC_{50} über $1000 \mu\text{g/L}$ B[a]P lag. Insgesamt konnten 13 der 110 Klone als richtig positiv identifiziert werden.

Für den direkten ELISA (Abbildung 26 A) wurden die MTPs mit anti-Maus-Antikörpern vorbeschichtet. Anschließend wurden sie mit einer 1/10-Verdünnung des ZKÜs inkubiert. Es konnte bereits in vorhergegangenen Studien gezeigt werden, dass die Vorbeschichtung der MTP mit Sekundärantikörper zu besseren Ergebnissen führte, als eine einfache Immobilisierung der Primärantikörper durch Adsorption (Cervino, 2008a). Es folgte die Inkubation mit 10-B[a]P-HRP und anschließend die Farbreaktion mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Im direkten ELISA konnten 10 positive Klone identifiziert werden, wobei 3 falsch positiv waren.

Im indirekten ELISA (Abbildung 26 B) wurden die MTPs mit einer 1/5000-Verdünnung von 10-B[a]P-BSA beschichtet. Anschließend wurde mit einer 1/100-Verdünnung der ZKÜs inkubiert. Eine 1/10-Verdünnung der ZKÜs im indirekten ELISA erwies sich als zu hoch, was zu viele falsch positive Signale generierte. Nach Inkubation mit HRP-markiertem Sekundärantikörper erfolgte die Farbreaktion mit TMB analog zum direkten ELISA. Im indirekten ELISA wurden 20 positive Klone identifiziert, wobei 7 falsch positiv waren.

Der Vergleich des direkten und indirekten ELISAs in der MTP zeigt, dass der direkte ELISA dem indirekten sowohl beim ZKÜ-Verbrauch, als auch bei der Nachweisstärke unterlegen war. Im direkten ELISA wurden 80 µL ZKÜ benötigt, im indirekten hingegen lediglich 8 µL. Außerdem wurden im direkten ELISA 6 richtig positive Klone nicht identifiziert. Dies lag vor allem an dem hohen Hintergrund (siehe Abbildung 26) des direkten ELISAs.

2.3 Entwicklung eines Chip-basierten Screeningverfahrens

In den letzten Jahren wurden einige Screeningverfahren publiziert, die SPR-Biosensoren (Canziani, 2004; Leonard, 2007) oder Durchflussassays (Sasaki, 2005) verwenden. Da SPR ein Signal erzeugt, dessen Intensität direkt proportional zur Molmasse des an die Oberfläche bindenden Moleküls ist, kommt es bei kleinen Molekülen zu Sensitivitätsproblemen (Pope, 2009). Außerdem sind SPR-basierte Methoden sequentiell und benötigen dadurch eine lange Analysenzeit. Mikroarray-basierte Verfahren haben hingegen den Vorteil, dass sie viele Klone in einem Schritt analysieren können. LOVE et al. benutzten Poly(dimethylsiloxan) als Trägermaterial für die Immobilisierung von Hybridomzellen durch Lithographie, was eine Kultivierung und ein Screening durch Fluoreszenzdetektion ermöglichte (Love, 2006). Dieses System wurde allerdings nicht automatisiert. Des Weiteren existiert ein Membran-basierter Mikroarray, der eine automatisierte Fluoreszenzauslesung nutzt (Maier, 2010). Am IWC wurde eine Mikroarray-basierte Screeningmethode mit Chemilumineszenzdetektion

entwickelt (Rieger, 2009), die einen Chip mit kovalent immobilisierten Fängerantikörpern nutzt. Die ZKÜs wurden unverdünnt übertragen und anschließend die positiven Klone über das spezifische Anbinden von Aflatoxin-HRP detektiert. Als Ausleseplattform diente der am IWC entwickelte PASA (Weller, 1999). Dieses System sollte auf den neu entwickelten MCR 3 übertragen werden. Abbildung 27 zeigt den schematischen Aufbau des Chip-basierten Screenings mit Chemilumineszenzdetektion.

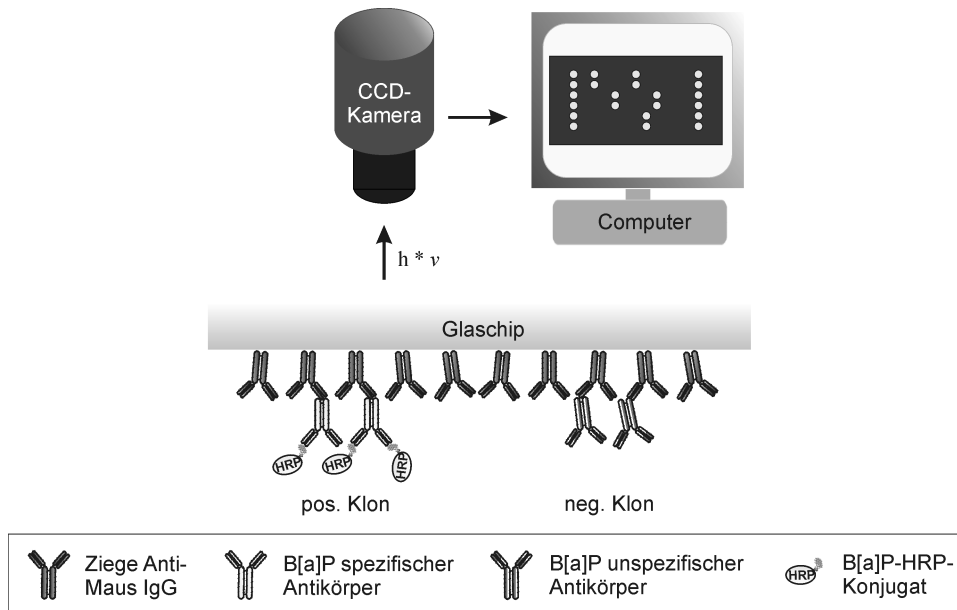


Abbildung 27: Schematischer Aufbau des Chip-basierten Screenings.

Zunächst wurden, wie in Kapitel III.1.1 beschrieben, DAPEG-Chips hergestellt, die mit NHS aktiviert und flächig mit Sekundärantikörper belegt wurden. Anschließend erfolgte eine Übertragung von 5 nL ZKÜ in zwei Replikaten auf den Chip. Die Chips wurden mit Hilfe des MCR 3 automatisch ausgelesen. Nach der Inkubation mit 10-B[a]P-HRP sollten nur diejenigen ZKÜs ein Chemilumineszenzsignal ergeben, die B[a]P-spezifische Antikörper enthielten. Für die Assayoptimierung wurden die Mikroarraychips nur mit Positiv- und Negativkontrolle belegt. Zunächst erfolgte eine Optimierung der 10-B[a]P-HRP-Konzentration, indem verschiedene HRP-Verdünnungen bei einer Flussrate von 10 µL/min über den Chip geleitet wurden. Das beste Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) wurde bei einer HRP-Konzentration von 1 µg/mL erhalten (siehe Tabelle 15). Bei einer höheren Konzentration an HRP wurde das Hintergrundsignal aufgrund unspezifischer Bindung so groß, dass das SNR nicht weiter anstieg.

Tabelle 15: Abhängigkeit des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses von der 10-B[a]P-HRP-Konzentration und der Flussrate.

10-B[a]P-HRP-Konz. [$\mu\text{g/mL}$]	SNR	Flussrate [$\mu\text{L/s}$]	SNR
2	29.9 ± 0.6	1	30.5 ± 0.4
1	30.0 ± 0.7	5	30.5 ± 1.0
0.2	25.3 ± 0.3	10	29.9 ± 0.6
0.1	26.2 ± 0.1	20	29.0 ± 0.8

Nach der Optimierung der 10-B[a]P-HRP-Konzentration konnte die Flussrate optimiert werden, mit der das Konjugat über den Chip geleitet wurde. Es wurden Flussraten von 1, 5, 10 und 20 $\mu\text{L/s}$ getestet, wobei sich zeigte, dass die Flussrate einen geringeren Einfluss auf das SNR hatte, als die HRP-Konzentration (siehe Tabelle 15). Bei Flussraten von 1 $\mu\text{L/s}$ und 5 $\mu\text{L/s}$ wurde jeweils ein SNR von 30.5 bestimmt. Aus Zeitgründen erschien eine Flussrate von 5 $\mu\text{L/s}$ sinnvoller, als 1 $\mu\text{L/s}$. Die Gesamtzeit für die Auslesung einer Flusszelle mit einer Flussgeschwindigkeit von 5 $\mu\text{L/s}$ für das HRP-Konjugat betrug 4 min 24 s.

In Abbildung 28 ist eine Aufnahme eines Mikroarraychips in Falschfarben dargestellt. Pro Flusszelle lassen sich neben der Negativ- und Positivkontrolle 42 ZKÜs in Duplikaten immobilisieren. Da jeder Chip aus zwei Flusszellen besteht, können insgesamt über 80 Klone pro Chip getestet werden.

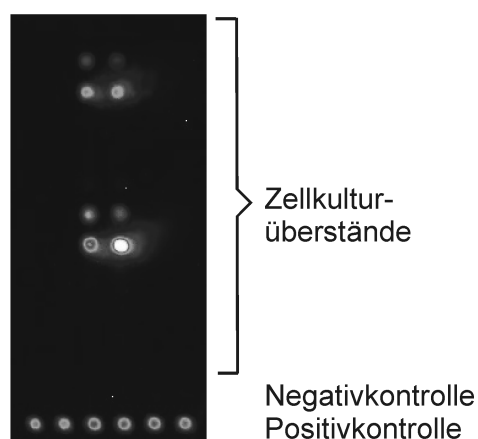


Abbildung 28: Chemilumineszenzaufnahme einer Flusszelle eines Mikrochips für das ZKÜ-Screening. Neben Negativ- und Positivkontrolle können 42 ZKÜs in Duplikaten aufgetragen werden.

Als Positivkontrolle diente der anti-B[a]P-Antikörper 22F12 (Matschulat, 2005) und als Negativkontrolle kam PBS-Puffer zum Einsatz. Die ZKÜs wurden unverdünnt gespottet, was bei ZKÜs mit hoher Antikörperkonzentration zu einem Verlaufen der Spots führte. Eine Verdünnung der ZKÜs in Puffer war jedoch nicht möglich, da ZKÜs mit niedriger Antikörperkonzentration dann kein ausreichend hohes Signal mehr lieferten. In Abbildung 29 ist das Ergebnis des Chip-basierten Screenings dargestellt.

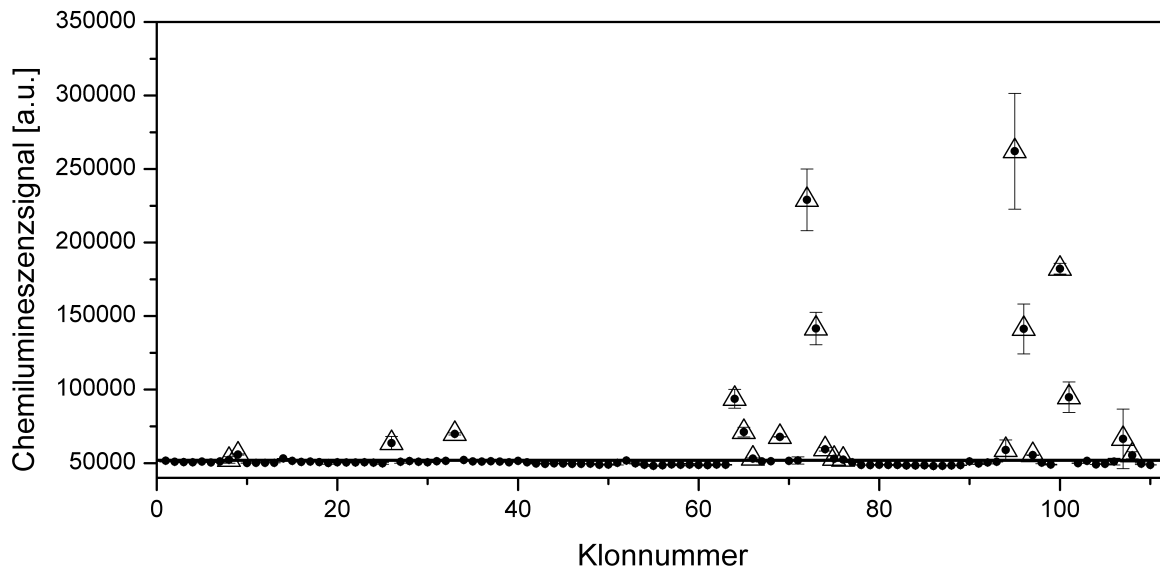


Abbildung 29: Ergebnis des Chip-basierten Screenings ($m = 3$, $s = 1$). Alle Messpunkte, die oberhalb des Schwellenwerts (Negativkontrolle plus deren dreifache Standardabweichung) lagen, galten als positive Klone. Diese sind durch Dreiecke gekennzeichnet.

Es wurden 21 Klone als positive erkannt, wovon 9 falsch positiv waren. Ein richtig positiver Klon konnte im Chip-basierten Verfahren nicht detektiert werden. Dieser Antikörper zeigte allerdings einen IC_{50} von $30 \mu\text{g/L}$ und war damit nicht sehr affin.

Das Chip-basierte Verfahren war vergleichbar gut, wie der indirekte ELISA in der MTP und wesentlich sensitiver als der direkte ELISA in der MTP. Das wesentlich bessere Signal-zu-Rausch-Verhältnis mit dem Chip-basierten Verfahren ermöglichte ein sensitiveres Screening als mit dem direkten ELISA in der MTP. Sowohl mit dem indirekten ELISA als auch mit der Chip-basierten Methode konnten alle Klone mit einem IC_{50} -Wert unterhalb von $10 \mu\text{g/L}$ identifiziert werden. Die Vorteile des Mikroarrays gegenüber dem klassischen ELISA liegen in der kurzen Assayzeit von unter 5 min und dem geringen ZKÜ-Verbrauch von wenigen Nanolitern. Dies ermöglicht in Zukunft eine Kultivierung von Hybridomzellen in 384-well Platten, was den intensiven Zeit- und Kostenaufwand der Kultivierung verringern würde. Im

Vergleich zu dem vorherigen Screening mit dem PASA (Rieger, 2009), konnte die Assayzeit von 7 min auf unter 5 min reduziert werden. Außerdem konnte die Anzahl an Spots pro Chip von 105 auf 168 gesteigert werden.

2.4 Sensitivität und Selektivität der monoklonalen Antikörper

Die Charakterisierung von Antikörpern umfasst u. a. die Bestimmung der Sensitivität und Selektivität. Die Sensitivität wurde im indirekt kompetitiven ELISA in der MTP bestimmt. Außerdem wurden die Affinitätskonstanten mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) auf dem Biacore X100 bestimmt. Die Bestimmung der Selektivität (Kreuzreaktivität) erfolgte ebenfalls im indirekt kompetitiven ELISA in der MTP, wobei als freie Analyten die 16 EPA PAKs verwendet wurden. Neben Selektivität und Sensitivität ist der Einfluss von Realproben auf den kompetitiven Assay von großer Bedeutung. Ein guter Antikörper sollte möglichst wenig auf unterschiedliche Matrices reagieren, weshalb der Einfluss von Leitungswasser auf die monoklonalen Antikörper getestet wurde.

2.4.1 Bestimmung der Sensitivität mittels ELISA

Zur Bestimmung des minimalen IC_{50} -Wertes wurden im indirekten ELISA sowohl die ZKÜ-, als auch die Beschichtungskonzentration (10-B[a]P-BSA) so weit verdünnt, bis keine Verringerung des IC_{50} mehr möglich war. Die ZKÜ-Verdünnung wurde dafür in einem Bereich von 1/100 bis 1/50000 und die 10-B[a]P-BSA-Verdünnung von 1/5000 bis 1/100000 getestet. Das Beschichten der Platten mit den Hapten-Protein-Konjugaten erfolgte über Nacht bei 4 °C, da ein Beschichten bei Raumtemperatur zu größeren Inter-Kavitäts-Standardabweichungen führte. Nach dem Blocken mit Casein wurden die B[a]P Standardlösungen in einem Konzentrationsbereich von 0.0001 µg/L bis 1000 µg/L in die MTP gegeben. Die Standards wurden in 10 % Methanol in Wasser gelöst, da sich in reinem Wasser nur maximal ca. 3 - 6 µg/L B[a]P lösen (Mackay, 2001; Ke, 2009). Anschließend erfolgte die Zugabe der ZKÜs, wodurch die Competition gestartet wurde, die 1 h erfolgte, um das Gleichgewicht zu erreichen. Der Versuch die Competition auf 30 min zu verringern, führte zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen. Nach der Competition erfolgte die Inkubation mit HRP-markiertem Sekundärantikörper, der der anschließenden Farbreaktion von TMB und Wasserstoffperoxid diente. Die dabei erreichten minimalen IC_{50} -Werte, sowie die verwendeten Verdünnungen sind in Tabelle 16 angegeben.

Tabelle 16: Antikörpertypen, IC₅₀-Werte, Arbeitsbereiche und optimale ZKÜ- und Beschichtungsverdünnungen aller sensitiven Klone (n = 8, m = 3, s = 1).

Klon	Antikörpertyp	IC ₅₀ [µg/L]	Arbeitsbereich [µg/L]	10-B[a]P-BSA-Verdünnung	Verdünnung ZKÜ
3B5	IgG ₁ , κ	0.92 ± 0.12	0.24 – 3.58	1:5000	1:100
3B10	IgG ₁ , κ	0.87 ± 0.39	0.27 – 2.85	1:5000	1:100
4F11	IgG ₁ + IgG _{2b} , κ	0.48 ± 0.04	0.17 – 1.39	1:10000	1:1000
5E11	IgG _{2b} , κ	0.31 ± 0.05	0.13 – 0.77	1:10000	1:100
5G1	IgG _{2a} , κ	5.37 ± 0.49	0.80 – 35.8	1:50000	1:10000
10E9	IgG _{2b} , κ	9.31 ± 2.93	1.89 – 45.8	1:50000	1:5000

Der affinste Antikörper mit einem IC₅₀-Wert von 0.31 ± 0.05 µg/L war Klon 5E11. Der Arbeitsbereich erstreckte sich von 0.13 µg/L bis 0.77 µg/L, wobei als Arbeitsbereich der Bereich zwischen 20 % und 80 % der maximalen Absorption angesehen wurde. Mit einem IC₅₀-Wert von 0.48 µg/L und einem Arbeitsbereich von 0.17 µg/L bis 1.39 µg/L war Klon 4F11 ebenfalls sehr sensitiv. Für die Kontrolle von Trinkwasser bei einem gesetzlichen Grenzwert von 10 ng/L B[a]P sind beide Antikörper allerdings nicht sensitiv genug. Zur weiteren Assayoptimierung wurden die ZKÜs mit Protein A/G-Mischsäulen affinitätsgereinigt. Da dadurch störende Begleitstoffe aus dem ZKÜ entfernt werden, kann der Assay potentiell niedrigere IC₅₀-Werte erreichen. In Tabelle 17 sind die relevanten Assayparameter für die gereinigten Antikörper aufgeführt.

Tabelle 17: IC₅₀-Werte, Arbeitsbereiche, Nachweisgrenzen (nach IUPAC) und optimale Antikörper- und Beschichtungsverdünnungen aller gereinigten Antikörper (n = 8, m = 3, s = 1).

Klon	IC ₅₀ [µg/L]	Arbeitsbereich [µg/L]	LOD [µg/L]	10-B[a]P-BSA-Verdünnung	Antikörper-verdünnung
22F12	0.20 ± 0.01	0.09 – 0.43	0.04	1:5000	1:1000
3B5	2.20 ± 1.19	0.49 – 9.93	0.32	1:3000	1:1000
4F11	0.38 ± 0.07	0.08 – 1.78	0.16	1:10000	1:60000
5E11	0.34 ± 0.05	0.11 – 1.02	0.11	1:3000	1:9000
5G1	2.66 ± 0.34	0.50 – 14.1	0.59	1:120000	1:120000
10E9	2.16 ± 0.18	0.60 – 7.85	0.52	1:80000	1:120000

Der IC_{50} für Klon 3B5 stieg von 0.92 $\mu\text{g/L}$ für den ZKÜ auf 2.20 $\mu\text{g/L}$ für den gereinigten mAk an. Bei allen anderen Klonen konnte der IC_{50} um einen Faktor von zwei bis vier (5G1, 10E9) verbessert werden oder blieb gleich (4F11, 5E11). Mit einer unteren Grenze des Arbeitsbereiches von ca. 100 ng/L waren die Klone 4F11 und 5E11 allerdings nicht sensitiv genug, um eine Quantifizierung im Bereich der strengen gesetzlichen Vorschriften (Grenzwert von 10 ng/L) zu ermöglichen. Der Antikörper 3B10 konnte zur Aufreinigung nicht in großen Volumina kultiviert werden, da der Zellklon abgestorben war.

2.4.2 Affinitätsbestimmung mit Oberflächenplasmonenresonanz

Für die Bestimmung der Affinitätskonstanten wurden SPR-Messungen mit dem Biacore X100 durchgeführt. SPR tritt in dünnen leitenden Schichten auf, die sich zwischen zwei Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex befinden. Die SPR-Chips von Biacore bestehen aus einer mit Gold bedampften Glasplatte, an deren Unterseite (Goldoberfläche) zwei Flusszellen angepresst werden. An der Oberseite wird monochromatisches Licht in verschiedenen Winkeln unter Totalreflexion eingestrahlt. Bei einem bestimmten Einstrahlwinkel (SPR-Winkel) kommt es zur Ausbildung von Oberflächenplasmonen, die über die Goldschicht in das Medium mit dem geringeren Brechungsindex übertragen werden. Der SPR-Winkel ist folglich der Winkel, bei dem die Lichtabsorption maximal ist. Abhängig von der Schichtdicke an der Goldoberfläche ist der Einstrahlwinkel, der zur Ausbildung der Oberflächenplasmonen führt, unterschiedlich. Anders ausgedrückt, ändert die Belegung der Goldoberfläche den Brechungsindex des einen Mediums, was zur Änderung der Resonanzbedingung führt. Die Verschiebung des SPR-Winkels bei Assoziation oder Dissoziation von Molekülen an bzw. von der Goldoberfläche wird in *refractive units* (RU) angegeben.

Da das SPR-Signal direkt proportional zur Molmasse des an die Oberfläche bindenden Moleküls ist, können kleine Moleküle wie B[a]P nur in relativ hohen Konzentrationen eine Änderung im SPR-Winkel hervorrufen (Pope, 2009). Deshalb sollte zunächst ein direktes ELISA-Format getestet werden, das B[a]P-BSA als Analyten verwendet, da durch die Bindung von B[a]P an BSA die molare Masse des Analyten drastisch erhöht werden kann. Für das direkte ELISA-Format wurden Sekundärantikörper (anti-Maus) kovalent an die Chipoberfläche gekoppelt. Anschließend wurden diese als Fängerantikörper zur Bindung der Primärantikörper verwendet. Da die Sekundärantikörper kovalent gebunden waren, konnte der Chip regenerierbar gestaltet werden, was bei den hohen Kosten für die Biacorechips (ca. 150 € pro Chip) stets im Auge behalten werden sollte. Als Testantikörper diente zunächst der Klon 22F12 (Matschulat, 2005), der in Konzentrationen von 0.1, 1, 10 und 100 $\mu\text{g/mL}$ über

den anti-Maus-Chip geleitet wurde. Wie in Abbildung 30 (oben) zu erkennen ist, wird bei einer Antikörperkonzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ein ausreichend hohes Signal von 121.9 RU erzeugt.

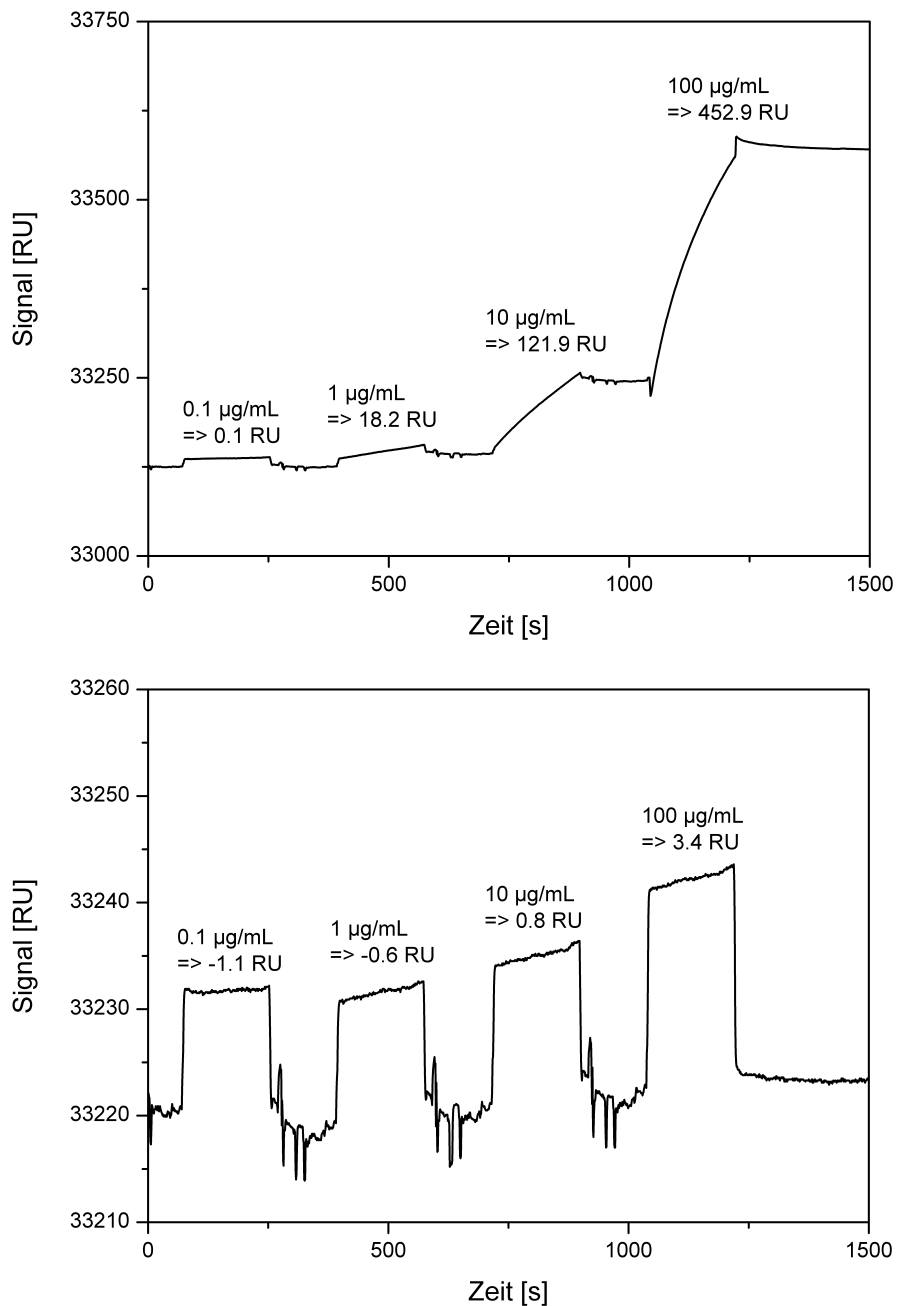


Abbildung 30: SPR-Messung im direkten ELISA-Format. Signalstärke verschiedener Konzentrationen an Primärantikörper 22F12 (oben) und von 10-B[a]P-BSA (unten).

Nach der Immobilisierung von 22F12 in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, wurde 10-B[a]P-BSA in Konzentrationen von 0.1, 1, 10 und 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ über den Chip geleitet. Erst bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 10-B[a]P-BSA konnte ein Signal erhalten werden (3.4 RU).

Das direkte ELISA-Format erwies sich folglich als nicht sensitiv genug, um Affinitätskonstanten für anti-B[a]P-Antikörper zu bestimmen, weshalb ein indirektes Format getestet werden sollte. Die Immobilisierung von B[a]P wurde, wie auch bei den Mykotoxinen geschehen, über einen Peptidlinker der Sequenz Lysin-Glycin-Serin-Glycin-10-B[a]P-Buttersäure bewerkstelligt. Das über Festphasenpeptidsynthese hergestellte 10-B[a]P-Peptid war bis zu einer Konzentration von 10 mg/mL in Wasser löslich. Dies ermöglichte die Immobilisierung auf dem Biacore-Chip in wässrigem Natriumacetatpuffer (pH 5). Abbildung 31 zeigt die Online-Immobilisierung des 10-B[a]P-Peptids.

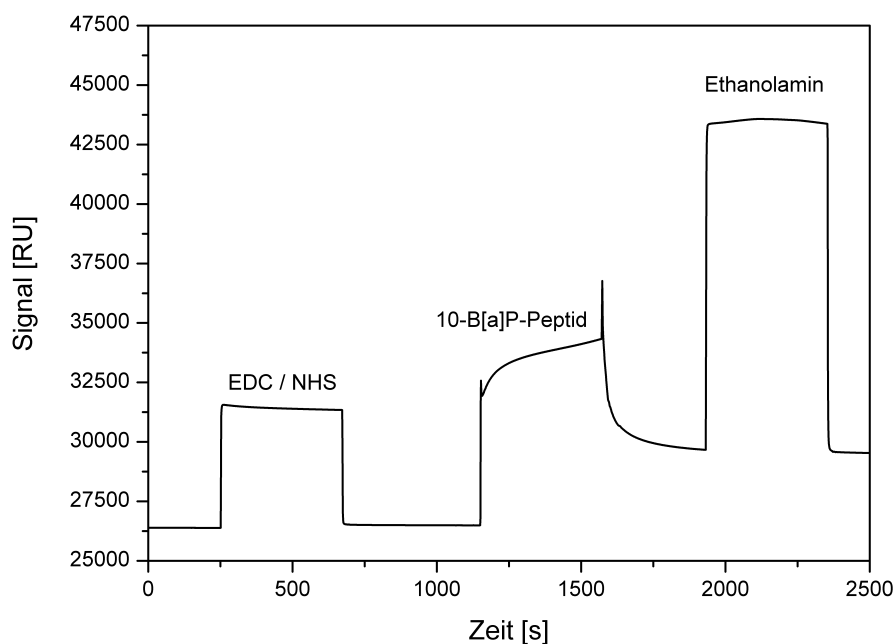


Abbildung 31: Beispiel einer *online*-Chipherstellung in drei Schritten: Aktivierung mit EDC / NHS, Immobilisierung des 10-B[a]P-Peptids und Deaktivierung mit Ethanolamin.

Ein Vorteil des Biacore gegenüber anderen Chip-basierten Auslesegeräten ist, dass die Oberflächenchemie direkt verfolgt werden kann. Somit war eine reproduzierbare Chipherstellung möglich. Zunächst wurde der mit Carboxydextran derivatisierte Chip mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert. Anschließend wurde 10-B[a]P-Peptid in Acetatpuffer über den Chip geleitet, wobei hierbei das Peptid auch in kleinen Schritten zugegeben werden konnte, bis die gewünschte Belegungsichte erreicht war. Für die Affinitätsbestimmung wurde eine Belegung von ca. 500 RU verwendet. Im letzten Schritt wurden freie NHS-Gruppen mit Ethanolamin deaktiviert.

Für die Bestimmung der Antikörperaffinitäten wurden die Antikörper in drei verschiedenen Verdünnungen je zwei Mal 4 min lang über den Chip geleitet. In dieser Zeit konnten die Antikörper mehr oder weniger schnell an das immobilisierte B[a]P binden, was die Berechnung der Assoziationsratenkonstante k_a ermöglichte. Anschließend folgte eine Dissoziationsphase von 15 min zur Berechnung der Dissoziationsratenkonstante k_d . Aus dem Quotienten von k_a und k_d lässt sich die Affinitätskonstante K_A berechnen. k_a und k_d wurden mit dem 1:1-Bindungsmodell berechnet, was bedeutete, dass die Annahme getroffen wurde, dass ein Antikörper nur an ein immobilisiertes Molekül B[a]P bindet. Aus diesem Grund wurde eine geringe Belegungsdichte des 10-B[a]P-Peptids von 500 RU verwendet, was etwa 5 % der maximal möglichen Belegung entsprach. In Abbildung 32 ist die Affinitätsbestimmung für den Antikörper 22F12 dargestellt.

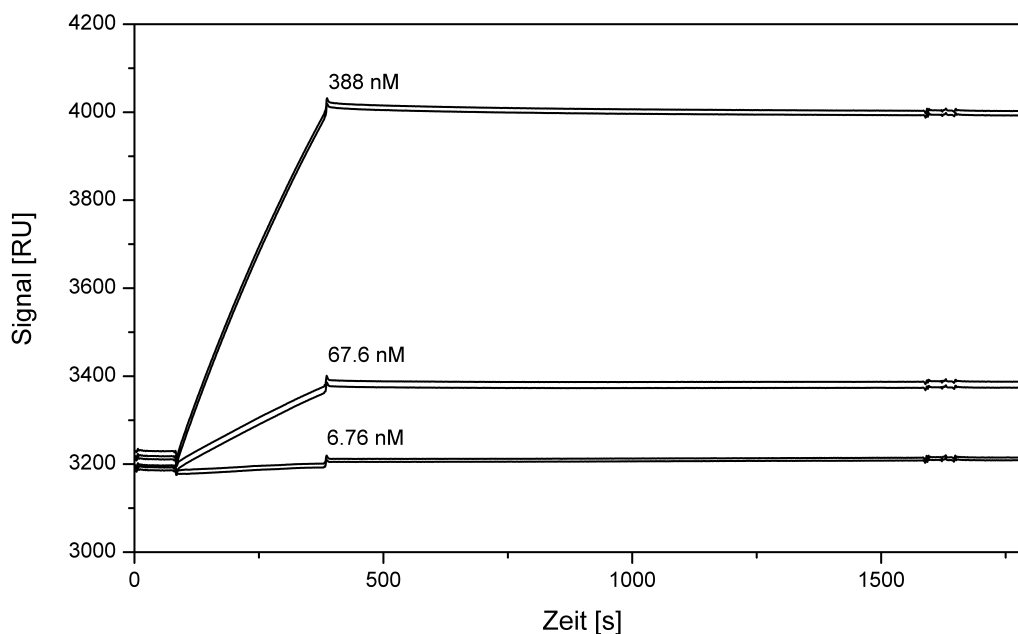


Abbildung 32: Assoziationsverhalten (0 - 300 s), sowie Dissoziationsverhalten (300 - 1800 s) des Antikörpers 22F12. Als Fittingmodell zur Berechnung der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten wurde das 1:1 Bindungsmodell verwendet.

Es zeigte sich, dass Antikörper, die gebunden wurden, kaum von der Oberfläche dissoziierten. Dies spiegelt sich auch in der äußerst kleinen Dissoziationsratenkonstante des Antikörpers 22F12 von $3.41 \cdot 10^{-5}$ 1/s wider (siehe Tabelle 18). Auch die anderen getesteten Antikörper zeigten kaum messbare Dissoziationsratenkonstanten zwischen $1.0 \cdot 10^{-5}$ 1/s (4F11, 5E11) und $6.9 \cdot 10^{-5}$ 1/s (3B5).

Tabelle 18: Zusammenfassung der mit SPR bestimmten Assoziationsratenkonstanten k_a , Dissoziationsratenkonstanten k_d und der daraus berechneten Affinitätskonstanten K_A .

Klon	k_a [1/Ms]	k_d [1/s]	K_A [1/M]
22F12	$3.50 \cdot 10^4$	$3.41 \cdot 10^{-5}$	$1.02 \cdot 10^9$
3B5	$7.7 \cdot 10^3$	$6.9 \cdot 10^{-5}$	$1.1 \cdot 10^8$
3B10	$1.0 \cdot 10^4$	$1.1 \cdot 10^{-5}$	$9.1 \cdot 10^8$
4F11	$5.9 \cdot 10^4$	$1.0 \cdot 10^{-5}$	$5.9 \cdot 10^9$
5E11	$9.4 \cdot 10^4$	$1.0 \cdot 10^{-5}$	$9.4 \cdot 10^9$
5G1	$1.9 \cdot 10^5$	$1.3 \cdot 10^{-5}$	$1.5 \cdot 10^{10}$
10E9	$2.8 \cdot 10^5$	$1.9 \cdot 10^{-5}$	$1.5 \cdot 10^{10}$

Die Assoziationsratenkonstanten k_a lagen im Bereich von $7.7 \cdot 10^3$ 1/Ms (3B5) bis $2.8 \cdot 10^5$ 1/Ms (10E9). Diese lassen sich in drei Gruppen einteilen: niedrig (3B5, 3B10), mittel (4F11, 5E11) und hoch (5G1, 10E9). Da die Dissoziationsratenkonstanten für alle Klone sehr ähnlich sind, sind die Unterschiede in den Affinitätskonstanten hauptsächlich mit den unterschiedlichen Assoziationsratenkonstanten zu erklären. Die Affinitätskonstanten bewegen sich in einem für affine Antikörper typischen Bereich von 10^8 bis 10^{10} 1/M. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Affinitätskonstanten nicht mit den IC_{50} -Werten decken. Klon 22F12 zeigt den niedrigsten IC_{50} -Wert, liegt mit einer Affinitätskonstante von $1.02 \cdot 10^9$ 1/M aber nur im Mittelfeld. Die hoch affinen Klone 5G1 und 10E9 ($1.5 \cdot 10^{10}$ 1/M) zeigen im indirekt kompetitiven ELISA in der MTP jedoch nur IC_{50} -Werte von ca. 2 μ g/L. Diese Unterschiede lassen sich durch die unterschiedlichen Assayformate erklären. Während die Assays in der MTP kompetitiv waren, ist die Affinitätsbestimmung mittels SPR nicht kompetitiv. Außerdem wurden für die kompetitiven Assays in der MTP 10 % Methanol für die B[a]P-Standards verwendet. Dies kann sich auf die Antikörper unterschiedlich stark auswirken, was bei hohen Affinitätskonstanten im SPR zu schlechteren IC_{50} -Werten in der MTP führen kann. Außerdem befanden sich in der MTP alle Reaktionen im Gleichgewicht, was bei den SPR-Messungen nicht der Fall war. Interessanterweise zeigten die Klone mit mittleren bis hohen k_a (4F11, 5E11, 5G1, 10E9) im ELISA in der MTP ein schnelles Färbeverhalten und es konnten intensivere Färbungen beobachtet werden, als bei Klonen mit niedrigen k_a (22F12, 3B5, 3B10).

2.4.3 Bestimmung der Kreuzreaktivitäten

Antikörper erkennen neben dem Zielanalyten auch strukturell ähnliche Moleküle (Kreuzreaktivität). Selektive Antikörper sollten mit möglichst wenigen Substanzen kreuzreagieren. Da es nicht möglich ist, die Kreuzreaktivitäten für alle PAKs zu bestimmen, beschränkte sich diese Arbeit auf die Bestimmung der Kreuzreaktivität für die 16 EPA PAKs. Das daraus resultierende Kreuzreaktivitätsverhalten ergibt für die einzelnen Klone ein gutes Bild darüber, ob die Antikörper eine hohe Selektivität für B[a]P besitzen, oder ob sie für eine Summenbestimmung der PAKs geeignet sind. In Tabelle 19 sind die Kreuzreaktivitäten für alle Klone dargestellt.

Tabelle 19: Kreuzreaktivitäten für die 16 EPA PAKs. Die Kreuzreaktivität für B[a]P wurde auf 100 % festgelegt und die Kreuzreaktivitäten für die anderen Substanzen wurden relativ zu der für B[a]P in % ausgedrückt.

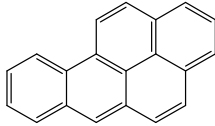
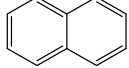
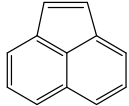
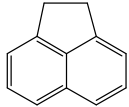
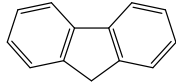
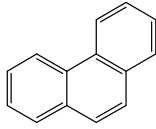
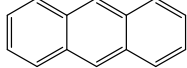
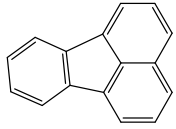
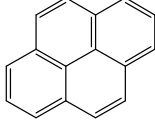
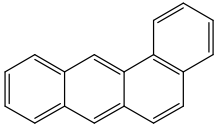
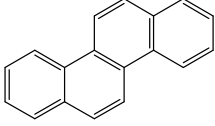
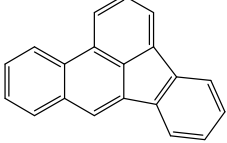
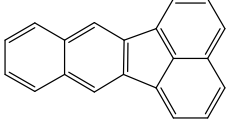
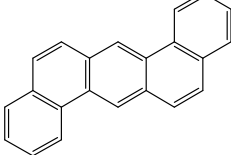
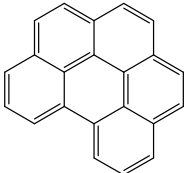
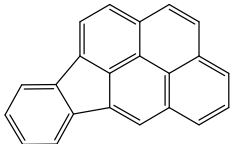
Substanz	Struktur	3B5	3B10	4F11	5E11	5G1	10E9
Benzo[a]pyren		100	100	100	100	100	100
Naphthalin		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Acenaphthylen		<0.01	0.7	2.6	10.0	<0.01	<0.01
Acenaphthen		<0.01	<0.01	0.9	1.6	<0.01	<0.01
Fluoren		2.0	1.0	0.7	1.5	<0.01	<0.01
Phenanthren		4.0	0.9	3.5	13.5	5.1	<0.01
Anthracen		3.9	<0.01	9.3	22.9	7.0	<0.01
Fluoranthen		10.1	2.8	5.5	30.7	21.4	<0.01
Pyren		66.9	47.8	20.0	205	75.7	35.4

Tabelle 19 (Fortsetzung): Kreuzreaktivitäten für die 16 EPA PAKs.

Substanz	Struktur	3B5	3B10	4F11	5E11	5G1	10E9
Benzo[a]-anthracen		39.2	25.1	135	177	22.2	5.9
Chrysen		54.6	177	415	656	1.4	<0.01
Benzo[b]-fluoranthen		15.6	7.0	17.1	36.1	40.9	97.2
Benzo[k]-fluoranthen		11.3	4.8	67.3	25.7	<0.01	<0.01
Dibenzo[ah]-anthracen		8.5	<0.01	3.2	<0.01	<0.01	<0.01
Benzo[ghi]-perylen		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	1.0	<0.01
Indeno[1,2,3-cd]pyren		<0.01	2.2	9.2	7.3	3.7	<0.01

Die Bestimmung der Kreuzreaktivitäten erfolgte im indirekt kompetitiven ELISA, wobei zur Beschichtung der MTP 10-B[a]P-BSA verwendet wurde. Die Kreuzreaktanden befanden sich in Lösung und wurden äquimolar zu B[a]P eingesetzt. Zur Berechnung der Kreuzreaktivität wurde die von B[a]P auf 100 % festgelegt und die Kreuzreaktivitäten für die anderen PAKs wurden relativ zu der von B[a]P in % berechnet. Alle Klone zeigten für die 2-Ring und 3-Ring PAKs Naphthalin, Acenaphthylen, Acenaphthen, Fluoren, Phenanthren und Anthracen geringe Kreuzreaktivitäten (< 10 %). Nur Klon 5E11 hatte höhere Kreuzreaktivitäten gegenüber Acenaphthylen (10 %), Phenanthren (13 %) und Anthracen (22.9 %). Niedrige Kreuzreaktivitäten gegenüber kleinen PAKs sind für eine Anwendung in Realproben wichtig, da die 2-Ring und 3-Ring PAKs relativ gut wasserlöslich sind und in Realproben in höheren Konzentrationen vorkommen können. Für alle anderen PAKs ist das Kreuzreaktivitätsverhalten der getesteten Klone sehr unterschiedlich. Klon 5E11 zeigte

insgesamt das breiteste Kreuzreaktivitätsmuster mit 13 von 16 EPA PAKs. Die Kreuzreaktivität gegenüber Pyren (205 %), Benzo[a]anthracen (177 %) und Chrysen (656 %) lag über der für B[a]P. Klon 10E9 hingegen hatte ein sehr kleines Kreuzreaktivitätsspektrum mit lediglich 3 Substanzen (Pyren, 35.4 %; Benzo[a]anthracen, 5.9 %; Benzo[b]fluoranthren), wobei die Sensitivität dieses Klons mit einem IC_{50} -Wert von $2.16 \pm 0.18 \mu\text{g/L}$ gering war. Die Klone 3B5, 3B10, 4F11 und 5G1 zeigten besonders für die 4-Ring- und 5-Ring-PAKs hohe Kreuzreaktivitäten zwischen 10 % und 76 %. Außerdem ließen sich für Klon 3B10 und 4F11 besonders hohe Kreuzreaktivitäten für Chrysen von 177 % und 455 % feststellen. Zudem hatte Klon 4F11 für Benzo[a]anthracen eine Kreuzreaktivität von 135 %. Damit war Klon 4F11, wie auch Klon 5E11 besonders für die Summenbestimmung von PAKs geeignet.

2.4.4 Messung von Realproben

Neben der Bestimmung der Sensitivität und der Kreuzreaktivität ist vor allem der Einfluss von Realproben auf die Antikörper zu testen. Matrixeinflüsse können sich bei unterschiedlichen Antikörpern verschieden stark auswirken. Für die Evaluierung des Matrixeinflusses wurde Münchner Leitungswasser mit B[a]P aufgestockt und die Wiederfindungsraten für die sensitivsten Klone 4F11 und 5E11 im indirekt kompetitiven ELISA in der MTP bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: Wiederfindungsraten für aufgestockte Realproben der Antikörper 4F11 und 5E11. Als Realprobe diente Münchner Leitungswasser mit einer Leitfähigkeit von $490 \mu\text{S}$.

Aufgestockte Konz. [ng/L]	4F11		Aufgestockte Konz. [ng/L]	5E11	
	Gemessene Konz. [ng/L]	WF [%]		Gemessene Konz. [ng/L]	WF [%]
100	570	572	100	130	129
150	650	436	150	250	164
200	800	402	200	210	103
500	980	396	500	890	178
1000	5090	509	1000	1680	168

Die Matrixeinflüsse waren für die getesteten Klone 4F11 und 5E11 sehr unterschiedlich. Für Klon 4F11 ergaben sich sehr hohe Wiederfindungsraten von 396 bis 572 %. Die Matrix Münchner Leitungswasser wirkte sich folglich sehr stark auf den Antikörper aus. So könnte die im Vergleich zu destilliertem Wasser hohe Ionenstärke des Leitungswassers die

Tertiärstruktur von Klon 4F11 verändern und die Funktionalität des Antikörpers damit teilweise einschränken. Dadurch könnten weniger Antikörper an das immobilisierte B[a]P-BSA binden, was zu niedrigeren Absorptionswerten und damit zu hohen Überbestimmungen führte. Somit war Klon 4F11 für den Einsatz in Realproben nicht geeignet. Klon 5E11 zeigte Wiederfindungsraten zwischen 103 und 178 %. Diese lagen damit in einem für ELISA-Messungen akzeptablen Bereich, was in Zukunft einen Einsatz für Realproben möglich macht.

2.5 Entwicklung weiterer Immunoassays

Da mit dem indirekt kompetitiven ELISA in der MTP eine Bestimmungsgrenze von 10 ng/L nicht erreicht werden konnte, wurden weitere Immunoassays entwickelt. Zum einen sollte SPR genutzt werden, da die Chipherstellung bereits für die Affinitätskonstantenermittlung optimiert worden war (Kapitel III.2.5.1). Des Weiteren wurde ein Fluoreszenzpolarisations-immunoassay (FPIA) entwickelt, da es in der Literatur Hinweise gibt, dass FPIA ähnlich sensitiv wie der MTP-Test ist (Furzer, 2006; Kapitel III.2.5.2). Außerdem erfolgte eine Optimierung des MTP-basierten ELISAs durch die Verwendung von Proteinkonjugaten mit B[a]P-ähnlichen Substanzen (Kapitel III.2.5.3). Für diese Tests wurden die sensitivsten Antikörper 4F11 und 5E11 aus dem aktuellen Screening, sowie der sensitivste Antikörper 22F12 aus dem vorherigen Screening (Matschulat, 2005) verwendet.

2.5.1 Oberflächenplasmonenresonanz

Die kompetitiven Messungen mittels SPR erfolgten, wie auch die Affinitätsmessung, im indirekten ELISA-Format. Hierzu wurde dasselbe 10-B[a]P-Peptid auf der derivatisierten Goldoberfläche immobilisiert. Als Regenerationspuffer wurden zunächst 100 mM Salzsäure und 100 mM Natronlauge mit jeweils 10 % Acetonitril getestet, wobei das organische Lösungsmittel zur Entfernung von adsorbiertem B[a]P diente. 100 mM Salzsäure erwies sich als wenig effektiv zur Regeneration, da auch nach einer Regenerationszeit von 120 s kaum Antikörper von der Oberfläche entfernt werden konnte. Mit 100 mM Natronlauge hingegen sank das Signal nach einer Regenerationszeit von 30 s um ca. 30 RU. Dies deutet auf eine vollständige Regeneration, aber auch auf eine zusätzliche Hydrolyse des 10-B[a]P-Peptids hin. Deshalb wurde zur Regeneration 50 mM Natronlauge (5 % Acetonitril) verwendet. In Abbildung 33 sind 30 Regenerationszyklen dargestellt.

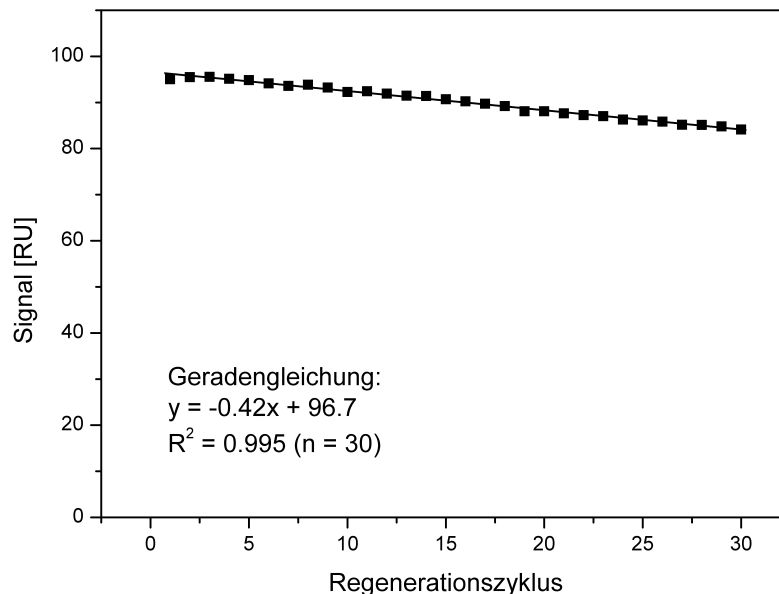


Abbildung 33: 30 Regenerationszyklen mit 50 mM Natronlauge (5 % Acetonitril).

Innerhalb der ersten 10 Messzyklen nahm das Signal um ca. 4 % ab. Über die 30 gemessenen Zyklen war eine Signalabnahme von 13 % zu verzeichnen. Da pro Antikörper 15 Messzyklen für die Aufnahme einer Kalibrierkurve und Messung von Realproben benötigt wurden, lag die Regenerierfähigkeit damit in einem akzeptablen Bereich. Durch die wiederholte Messung von Kalibrierstandards konnte die hohe Reproduzierbarkeit der SPR-Messungen bestätigt werden (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21: Wiederholte Messungen von Kalibrierstandards (n = 4) zur Testung der Reproduzierbarkeit der SPR-Messungen.

B[a]P-Konz. [µg/L]	Signal [RU]	Relative Standardabweichung [%]
0	95.3 ± 0.32	0.31
1	88.9 ± 0.76	0.90
10	57.6 ± 0.67	1.04
100	6.32 ± 0.27	4.76

Die Abweichungen für B[a]P-Standards zwischen 0 und 10 µg/L lagen zwischen 0.31 und 1.04 %. Für 100 µg/L B[a]P lag die Standardabweichung von vier Messungen bei unter 5 %. Damit war eine höhere Genauigkeit als bei ELISA-Messungen in der MTP gegeben, die üblicherweise zwischen 1 % und 10 % liegen. Eine SPR-Messung benötigte 15 min, weshalb

in den folgenden Experimenten pro Kalibrierpunkt nur eine Messung durchgeführt wurde. In den kompetitiven Experimenten wurden Antikörper mit Standard oder Probe 1:1 gemischt und 30 min inkubiert. Anschließend wurden sie 30 s bei einer Flussrate von 10 $\mu\text{L/s}$ über den Chip geleitet. Abbildung 34 zeigt die erhaltenen Kalibrierkurven für die Klone 4F11 und 5E11 aus dem aktuellen Screening, sowie für Klon 22F12 aus einem vorherigen Screening.

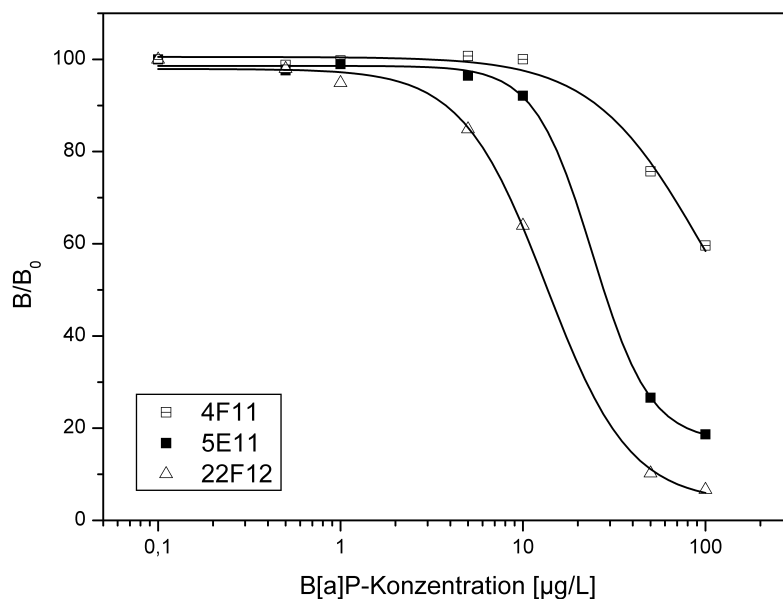


Abbildung 34: Kalibrierkurven für die mAKs 4F11, 5E11 und 22F12. Für den Antikörper 4F11 wurde zusätzlich ein Kalibrierpunkt bei 500 $\mu\text{g/L}$ verwendet (nicht gezeigt).

Es lässt sich erkennen, dass Klon 22F12 deutlich sensitiver als Klon 5E11 und mAk 4F11 wesentlich weniger sensitiv war. Zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes wurde daher bei Klon 4F11 zusätzlich ein Kalibrierpunkt bei 500 $\mu\text{g/L}$ aufgenommen (nicht gezeigt). In Tabelle 22 sind die IC_{50} -Werte und die Arbeitsbereiche für alle Klone dargestellt.

Tabelle 22: Mittels SPR gemessene IC_{50} -Werte und Arbeitsbereiche dreier Klone.

Klon	IC_{50} [$\mu\text{g/L}$]	Arbeitsbereich [$\mu\text{g/L}$]
4F11	94.9 ± 11.4	36.6 – 246
5E11	24.0 ± 1.48	14.5 – 39.9
22F12	13.4 ± 1.01	6.43 – 27.9

Durch eine Erhöhung der Kompetitionszeit von 30 s auf 60 s konnte die Sensitivität des Assays nicht erhöht werden. Auch durch die Änderung der Flussrate von 10 $\mu\text{L/s}$ auf 5 bzw.

20 µL/s konnte keine Sensitivitätssteigerung erreicht werden. Klon 22F12 zeigt mit einem IC₅₀ von 13.4 ± 1.01 µg/L eine um über sechzigfach niedrigere Sensitivität als im indirekten ELISA in der MTP (0.21 ± 0.04 µg/L). Wie auch in der MTP sind Klon 4F11 und 5E11 weniger sensitiv als Klon 22F12. Die Arbeitsbereiche sind im Fall von Klon 22F12 und 5E11 enger als in der MTP und umfassen lediglich eine halbe Größenordnung von 6.43 – 27.9 µg/L bzw. 14.5 – 39.9 µg/L. Der Arbeitsbereich von Klon 4F11 ist mit 36.6 – 246 µg/L etwas größer. Die insgesamt geringere Sensitivität der SPR-basierten Methode liegt vermutlich darin begründet, dass spezifische von unspezifischer Bindung nicht unterschieden werden kann. Antikörper, die ionisch oder adsorptiv gebunden werden, führen ebenso zu einer Signaländerung, wie spezifisch an immobilisiertes B[a]P bindende Antikörper.

Nach der Kalibrierung des SPR-Systems wurden für die Klone 5E11 und 22F12 Wiederfundungsraten in aufgestocktem Münchner Leitungswasser bestimmt (siehe Tabelle 23).

Tabelle 23: Bestimmung der Wiederfundungsraten für aufgestockte Leitungswasserproben mittels SPR.

Klon	Aufgestockte Konz. [µg/L]	Gemessene Konz. [µg/L]	Wiederfundungsrate [%]
5E11	15.0	29.4	196
	20.0	36.4	182
	25.0	> 39.9 µg/L	> 160
	30.0	> 39.9 µg/L	> 133
22F12	12.5	19.7	158
	15.0	22.7	151
	20.0	25.1	125
	25.0	26.6	106

Die Wiederfundungsraten für Klon 22F12 bewegten sich im Bereich von 106 bis 158 %. Bei Klon 5E11 kam es zu einer höheren Überbestimmung von 182 bis 196 % und in zwei Fällen gingen die Messwerte über den Arbeitsbereich hinaus. Die Wiederfundungsraten mittels SPR-Messungen führten zu deutlich höheren Überbestimmungen als im indirekten ELISA in der MTP. Der Grund hierfür könnte die unspezifische Bindung von Matrixbestandteilen an die Sensorchipoberfläche sein. Da bei der labelfreien SPR-Detektion zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung nicht unterschieden werden kann, kommt es daher zu deutlich

höheren Überbestimmungen bei der Untersuchung von matrixbelasteten Proben als beim traditionellen ELISA in der MTP.

2.5.2 Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay

Der Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay (FPIA) ist ein homogener Assay, der keinerlei Waschschritte benötigt, weshalb er sehr schnell und einfach durchzuführen ist. Das Prinzip des FPIA beruht auf der Erhöhung der Polarisierung der Fluoreszenz von kleinen Fluorophormarkierten Molekülen bei Bindung an einen Antikörper. Anders ausgedrückt nimmt die Fluoreszenzpolarisation bei Anwesenheit von freiem Antigen in der Probe ab (Jolley, 1981; Jameson, 2010).

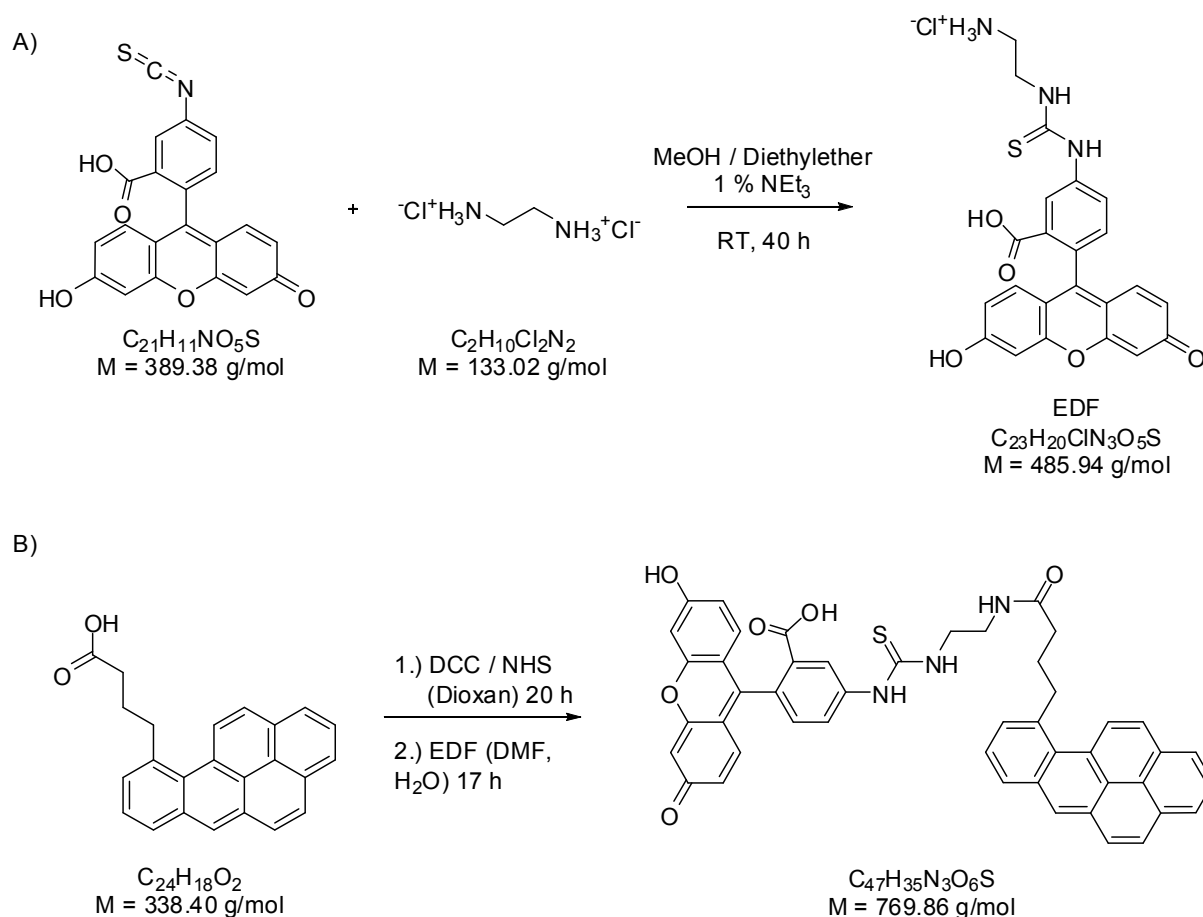


Abbildung 35: Synthese von B[a]P-Fluorescein: A) Synthese von Ethylendiaminofluorescein (EDF).
 B) Kopplung von EDF an den 10-B[a]P-Buttersäure-NHS-Ester.

Zunächst muss der Analyt B[a]P mit einem stark fluoreszierenden Molekül markiert werden, wozu meist Fluorescein verwendet wird. Das reaktive Fluoresceinisothiocyanat (FITC) kann

käuflich erworben werden und in einem Schritt zum Ethylendiaminofluorescein (EDF) umgesetzt werden. EDF wiederum kann unter Ausbildung eines Amids mit Carbonsäuren gekoppelt werden. In Abbildung 35 ist der gewählte Syntheseweg für 10-B[a]P-FITC dargestellt. Die Synthese des EDF gelang erst nach Zugabe von 10 % (v/v) Diethylether. Durch den Wechsel zu dem hydrophoberen Lösungsmittel Diethylether wurde das Ausfällen des Produktes EDF möglich. Auch eine Kühlung des Reaktionsgefäßes auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kann zum Ausfällen des Produktes führen. Die Kopplung von EDF und 10-B[a]P-Buttersäure erfolgte über die Aktivierung der Carbonsäure als NHS-Ester. Im Allgemeinen werden FITC-Konjugate mittels Dünnschichtchromatographie (DC) gereinigt und die Produktfraktion wird nach Ausstechen der DC-Platte mit Methanol extrahiert (Shim, 2004; Goryacheva, 2007). In dieser Arbeit wurde das Produkt mittels semipräparativer HPLC gereinigt, um eine höhere Reinheit zu erzielen. Dies ist im FPIA von besonderer Bedeutung, da sich Verunreinigungen durch Edukte negativ auf die Sensitivität des Assays auswirken. Außerdem konnten durch die semipräparative Aufarbeitung Produktmengen im Milligramm-Maßstab generiert werden, was eine exakte Konzentrationsbestimmung des 10-B[a]P-FITC für den nachfolgenden Assay ermöglichte.

Für die Entwicklung des FPIA musste im ersten Schritt bestimmt werden, welche 10-B[a]P-FITC-Konzentration optimal ist. Hierzu wurden 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 und 100 $\mu\text{g/L}$ B[a]P-FITC in PBS auf ihre Fluoreszenzintensität hin getestet. Das Ergebnis ist in Abbildung 36 dargestellt.

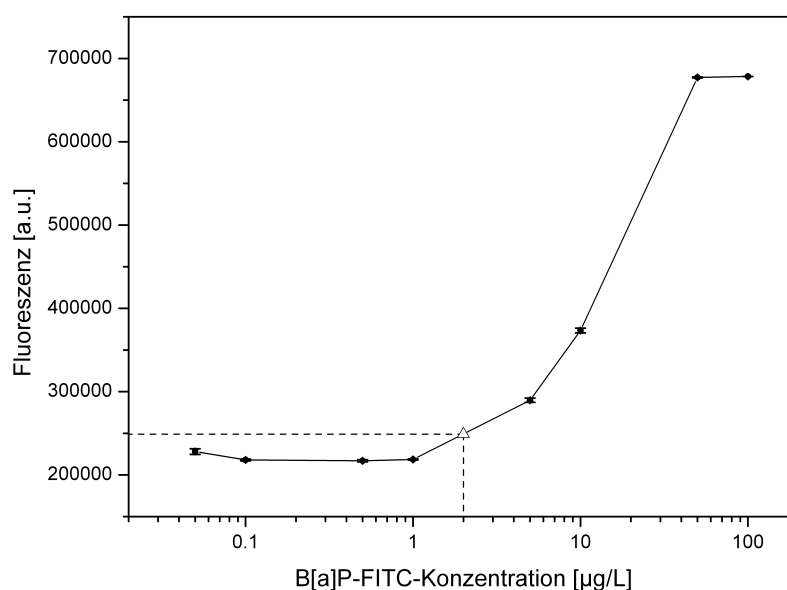


Abbildung 36: Auswahl der optimalen (minimalen) 10-B[a]P-FITC-Konzentration.

Als optimal gilt diejenige Konzentration an B[a]P-FITC, die ein Signal liefert, das sich signifikant vom Untergrund unterscheidet. Wie in obiger Abbildung zu erkennen ist, lag diese bei ca. 2 µg/L 10-B[a]P-FITC. Im zweiten Schritt galt es die Antikörperkonzentration für den FPIA zu optimieren. Die Stammlösung (1 mg/mL) des Antikörpers 22F12 wurde um den Faktor 1/100, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000 und 1/16000 verdünnt. Abbildung 37 zeigt die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Antikörperverdünnung für Klon 22F12.

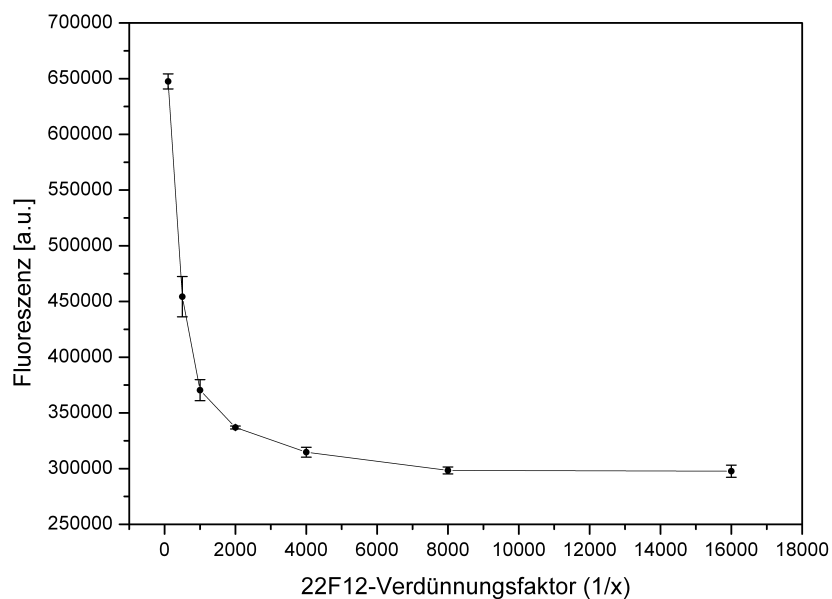


Abbildung 37: Optimierung der Antikörperkonzentration des Antikörpers 22F12.

Als optimale Antikörperkonzentration wird diejenige Konzentration angesehen, die in der Nähe des Testmittelpunktes liegt (Smith, 2008). Da für Klon 22F12 auch bei einer geringen Verdünnung von 1/100 keine obere Asymptote erreicht wurde, wurde als optimale Antikörperverdünnung 1/500 angenommen. Dies entsprach einer Konzentration von 2 µg/mL. Im Vergleich dazu war im indirekt kompetitiven ELISA nur eine Konzentration von 0.1 µg/mL notwendig.

Die Konkurrenz wurde zunächst mit folgenden Konzentrationen an freiem B[a]P durchgeführt: 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 µg/L. Dabei wurden alle Kalibrierstandards in 10 % Methanol hergestellt, um auch hohe Konzentrationen an B[a]P lösen zu können. Es zeigte sich, dass die Fluoreszenzintensität bei 1000 µg/L freiem B[a]P stets über der bei 100 µg/L freiem B[a]P lag. Deshalb wurde die Fluoreszenzintensität von freiem B[a]P ohne B[a]P-FITC gemessen, um zu testen, wie stark die Kalibrierlösungen selbst fluoreszieren. Es zeigte sich, dass B[a]P selbst ab einer Konzentration von 100 µg/L ein starkes Fluoreszenzsignal erzeugte. Aus diesem Grund wurde in den weiteren Experimenten

eine maximale Konzentration von 100 µg/L freiem B[a]P verwendet. Dies steht im Widerspruch zu den von GORYACHEVA et al. publizierten Daten (Goryacheva, 2007), die in einem FPIA für B[a]P-Kalibrierlösungen von bis zu 10000 µg/L B[a]P verwendet haben, ohne einen Anstieg in der Fluoreszenzintensität zu beobachten. Nach der Meinung des Autors der vorliegenden Arbeit ist dies nicht möglich. Abbildung 38 zeigt eine Kalibrierkurve mit einer maximalen B[a]P-Konzentration von 100 µg/L.

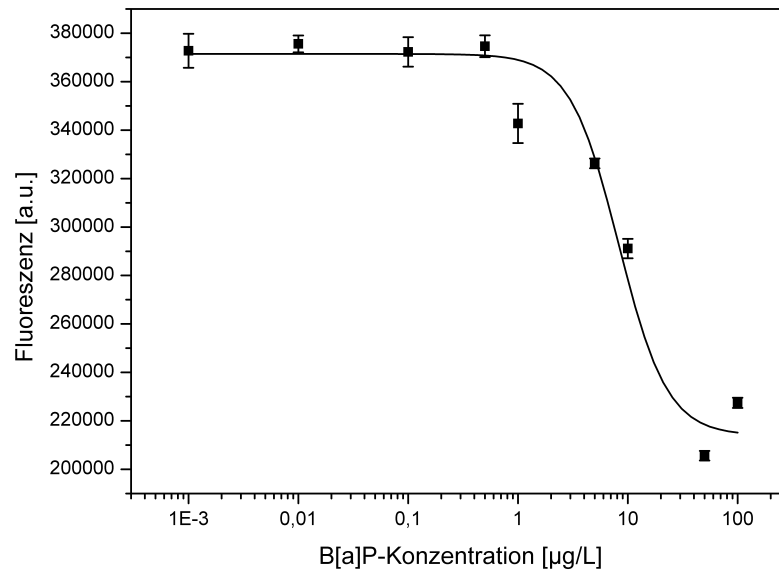


Abbildung 38: Kalibrierkurve für Klon 22F12.

Bei Klon 22F12 lag der IC_{50} -Wert bei 8,3 µg/L und lag damit um das 40-fache höher als im indirekten ELISA in der MTP. Für PAKs scheint der FPIA somit ungeeignet zu sein, da die zu erreichenden Sensitivität geringer ist als im indirekten ELISA ist und PAKs selbst eine starke Fluoreszenz zeigen.

2.5.3 Weitere Optimierung des indirekt kompetitiven ELISAs

Mit den bisher getesteten immunologischen Methoden (SPR, FPIA) konnten keine niedrigeren Nachweisgrenzen als mit dem indirekten ELISA in der MTP erreicht werden. Aus diesem Grund sollte der ELISA in der MTP weiter optimiert werden. Eine Möglichkeit zur Optimierung besteht in der Wahl anderer Konjugate für die Beschichtung der MTP. Neben dem B[a]P-BSA-Konjugat wurden vier weitere BSA-Konjugate mit den in Abbildung 39 dargestellten PAK-Derivaten getestet.

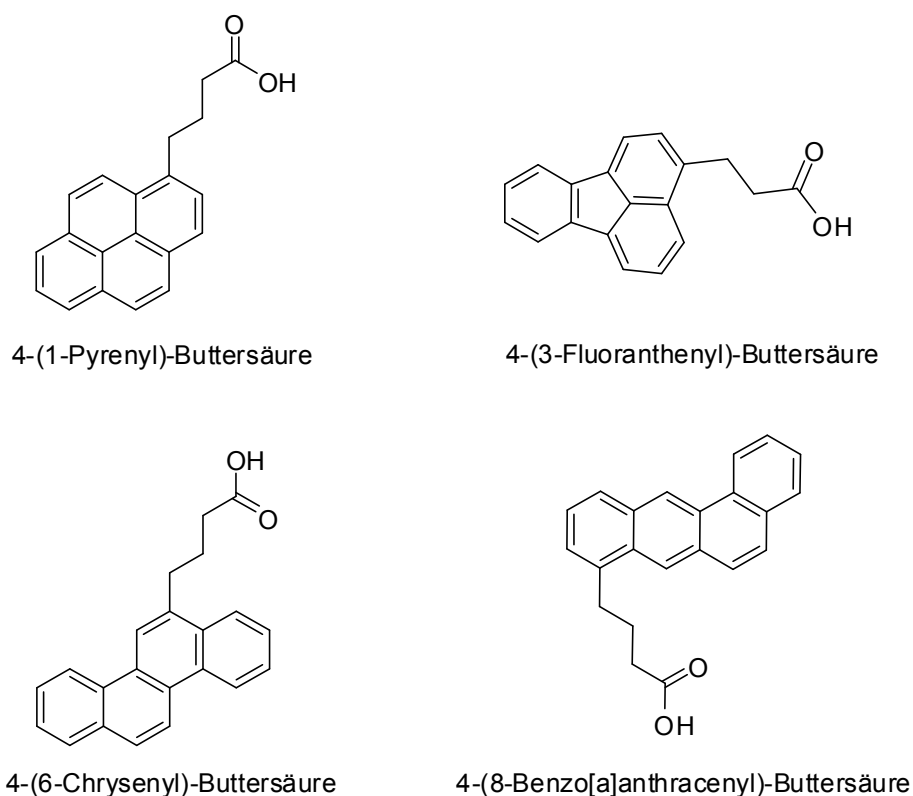


Abbildung 39: Struktur von vier weiteren PAK-Buttersäure-Derivaten für die Kopplung an BSA.

Die Bedingungen für die Antikörper 22F12 und 5E11 wurden im indirekten ELISA unter Verwendung der vier Konjugate Benzo[a]anthracenyl-, Chrysenyl-, Fluoranthenyl- und Pyrenyl-BSA optimiert. Zur Competition wurde stets freies B[a]P verwendet. Tabelle 24 zeigt die optimalen Antikörper- und Konjugatverdünnungen. Im Falle des Antikörpers 22F12 waren für die neuen Konjugate dieselben Antikörperverdünnungen oder höhere Konzentrationen an Antikörper notwendig als für das B[a]P-BSA. Bei dem Klon 5E11 hingegen wurden für alle neuen Konjugate geringere Konzentrationen an Antikörper benötigt, als für das B[a]P-BSA-Konjugat. Durch den Einsatz B[a]P ähnlicher Beschichtungskonjugate war es damit möglich, wertvollen Antikörper zu sparen.

Tabelle 24: Optimale Antikörper- und Konjugatverdünnungen für die Klone 5E11 und 22F12.

Konjugat für die Beschichtung der MTP	5E11		22F12	
	Konjugatverdünnung	Antikörperverdünnung	Konjugatverdünnung	Antikörperverdünnung
B[a]P-BSA	1/3000	1/9000	1/20000	1/10000
Benzo[a]anthracenyl-BSA	1/50000	1/20000	1/10000	1/1000
Chrysenyl-BSA	1/20000	1/20000	1/10000	1/1000
Fluoranthenyl-BSA	1/100000	1/50000	1/50000	1/10000
Pyrenyl-BSA	1/20000	1/20000	1/10000	1/3000

In Tabelle 25 sind die IC₅₀-Werte für alle Konjugate im Vergleich zu B[a]P-BSA aufgeführt. Außerdem sind die Kreuzreaktivitäten für die zum Beschichten der MTP verwendeten Substanzen angegeben.

Tabelle 25: IC₅₀-Werte für alle Konjugate und die Kreuzreaktivität der Antikörper gegenüber den freien Analyten.

Konjugat für die Beschichtung der MTP	5E11		22F12	
	IC ₅₀ -Wert [ng/L]	KR [%]	IC ₅₀ -Wert [ng/L]	KR [%]
B[a]P-BSA	340	100	200	100
Benzo[a]anthracenyl-BSA	148	177	121	13
Chrysenyl-BSA	249	656	212	77
Fluoranthenyl-BSA	77.3	31	88.5	15
Pyrenyl-BSA	202	205	107	18

Es zeigte sich, dass mit den PAK-Konjugaten, gegenüber denen die mAks geringere Kreuzreaktivitäten aufwiesen, auch niedrigere IC₅₀-Werte bei einer Kompetition mit B[a]P erreicht werden konnten. So zeigte Klon 5E11 eine Kreuzreaktivität von 31 % gegenüber Fluoranthen und hatte bei Verwendung des Fluoranthenyl-Konjugats einen IC₅₀-Wert von 77.3 ng/L für freies B[a]P. Somit lag der IC₅₀ um einen Faktor von ca. vier niedriger als bei Verwendung des B[a]P-BSA-Konjugats. Die Kreuzreaktivität von Klon 5E11 gegenüber Benzo[a]anthracen, Chrysen und Pyren war höher als gegenüber B[a]P, dennoch ergaben sich niedrigere IC₅₀-Werte bei Verwendung der entsprechenden Konjugate. Der Grund hierfür lag darin, dass bei Verwendung der neuen Konjugate wesentlich niedrigere Antikörper- und Konjugatverdünnungen verwendet werden konnten als für das B[a]P-BSA-Konjugat. Bei höheren Verdünnungen stellen sich erfahrungsgemäß auch niedrigere IC₅₀-Werte ein.

Klon 22F12 zeigte gegenüber Benzo[a]anthracen, Fluoranthren und Pyren sehr niedrige Kreuzreaktivitäten (ca. 15 %). Bei Verwendung der entsprechenden Konjugate konnten stets niedrigere IC_{50} -Werte erreicht werden, als mit B[a]P-BSA. Der niedrigste Wert lag bei 88.5 ng/L unter Verwendung des Fluoranthrenyl-BSA-Konjugats. Damit konnte der IC_{50} -Wert des Klons 22F12 um einen Faktor von ca. zwei gesenkt werden. Abbildung 40 zeigt die Kalibrierkurven für die Klone 22F12 und 5E11 unter Verwendung der Fluoranthrenyl-BSA-Konjugate.

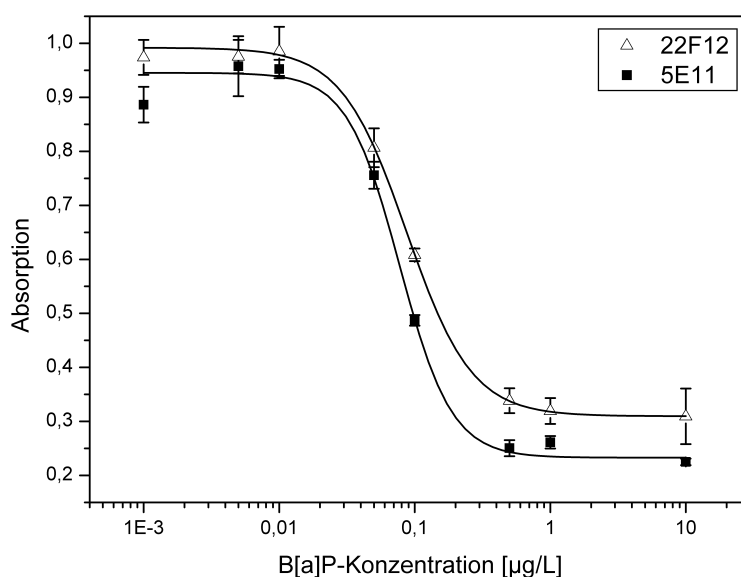


Abbildung 40: Kalibrierkurven für Klone 22F12 und 5E11 unter Verwendung der Fluoranthrenyl-BSA-Konjugate.

In Tabelle 26 sind die wichtigsten Parameter der Kalibrierkurven für die Klone 5E11 und 22F12 für B[a]P bei Verwendung der Fluoranthrenyl-BSA-Konjugate aufgeführt.

Tabelle 26: Gemessene IC_{50} -Werte, Steigungen, Arbeitsbereiche und Nachweisgrenzen der Klone 5E11 und 22F12 für B[a]P bei Verwendung von Fluoranthrenyl-BSA-Konjugaten.

Klon	IC_{50} -Wert [ng/L]	Steigung	Arbeitsbereich [ng/L]	LOD [ng/L]
5E11	77.3	2.26	41.9 – 143	32.2
22F12	88.5	1.86	42.3 – 186	35.4

Neben dem IC_{50} -Wert verschoben sich auch die Arbeitsbereiche und Nachweisgrenzen um einen Faktor von zwei bis drei nach unten. Die Nachweisgrenze von Klon 5E11 für B[a]P verschob sich um einen Faktor von drei von 108 ng/L auf 32.2 ng/L. Damit konnte die

Nachweisgrenze nicht im gleichen Maße gesenkt werden, wie der IC_{50} , da die Steigung am Testmittelpunkt von 1.26 auf 2.26 zunahm. Bei Klon 22F12 konnte der Arbeitsbereich für B[a]P um den Faktor zwei von 90.3 – 430 ng/L auf 42.3 – 186 ng/L gesenkt werden. Die Nachweisgrenze verschob sich dahingegen kaum von 42.7 ng/L auf 35.4 ng/L, da die Standardabweichungen des Blindwertes größer waren als bei Klon 5E11.

Um die Praxistauglichkeit des Assays zu überprüfen, wurde Münchner Leitungswasser mit B[a]P aufgestockt und die Wiederfindungsraten im indirekt kompetitiven ELISA bestimmt. Hierbei wurden die Klone 5E11 und 22F12 unter der Verwendung des Fluoranthenyl-BSA-Konjugats zur Beschichtung der MTPs eingesetzt. In Tabelle 27 sind die Wiederfindungsraten für die mit 40.0, 50.0, 100, 150 und 200 ng/L B[a]P aufgestockten Realproben dargestellt.

Tabelle 27: Gemessene Wiederfindungsraten für die Klone 5E11 und 22F12 in mit B[a]P aufgestocktem Münchner Leitungswasser unter Verwendung der Fluoranthenyl-BSA-Konjugate.

Aufgestockte B[a]P-Konz. [ng/L]	5E11		Aufgestockte B[a]P-Konz. [ng/L]	22F12	
	Gemessene Konz. [ng/L]	WF [%]		Gemessene Konz. [ng/L]	WF [%]
40.0	119	297	40.0	114	286
50.0	154	309	50.0	124	248
100	183	183	100	180	180
150	217	144	150	246	164
200	330	165	200	258	129

Im Bereich von mit 100 bis 200 ng/L B[a]P aufgestockten Realproben ergaben sich für beide Klone akzeptable Wiederfindungsraten von ca. 130 bis 180 %. Bei Werten, die näher an der Nachweisgrenze lagen (40.0 und 50.0 ng/L B[a]P) waren die Wiederfindungsraten mit ca. 250 bis 300 % sehr hoch. Der Matrixeinfluss der Realprobe machte sich damit an der unteren Grenze des Arbeitsbereichs stärker bemerkbar als an der oberen Grenze.

Somit scheint mit beiden Klonen eine Quantifizierung von B[a]P in Trinkwasser im Bereich von 100 bis 200 ng/L sinnvoll. Da Klon 5E11 ein breiteres Kreuzreaktivitätsmuster als Klon 22F12 zeigt, kann dieser in Zukunft für die Summenbestimmung von PAKs in Trinkwasser eingesetzt werden. Klon 22F12 hingegen kann für die Quantifizierung von B[a]P als Einzelparameter verwendet werden.

3 Herstellung rekombinanter Antikörper gegen Benzo[a]pyren

3.1 Strategie zur Produktion der scFv-Fragmente

Die in Kapitel III.2 vorgestellten Arbeiten lassen vermuten, dass über den herkömmlichen Weg zur Herstellung monoklonaler Antikörper keine ausreichend affinen Antikörper generiert werden können, um eine Nachweisgrenze von 10 ng/L für B[a]P im ELISA in der Mikrotiterplatte zu erreichen. Deshalb war die Produktion von rekombinanten Antikörpern auf Basis der genetischen Information von anti-B[a]P-Antikörper produzierenden Hybridomzellen angedacht. In Abbildung 41 ist die Strategie zur Produktion von scFvs dargestellt.

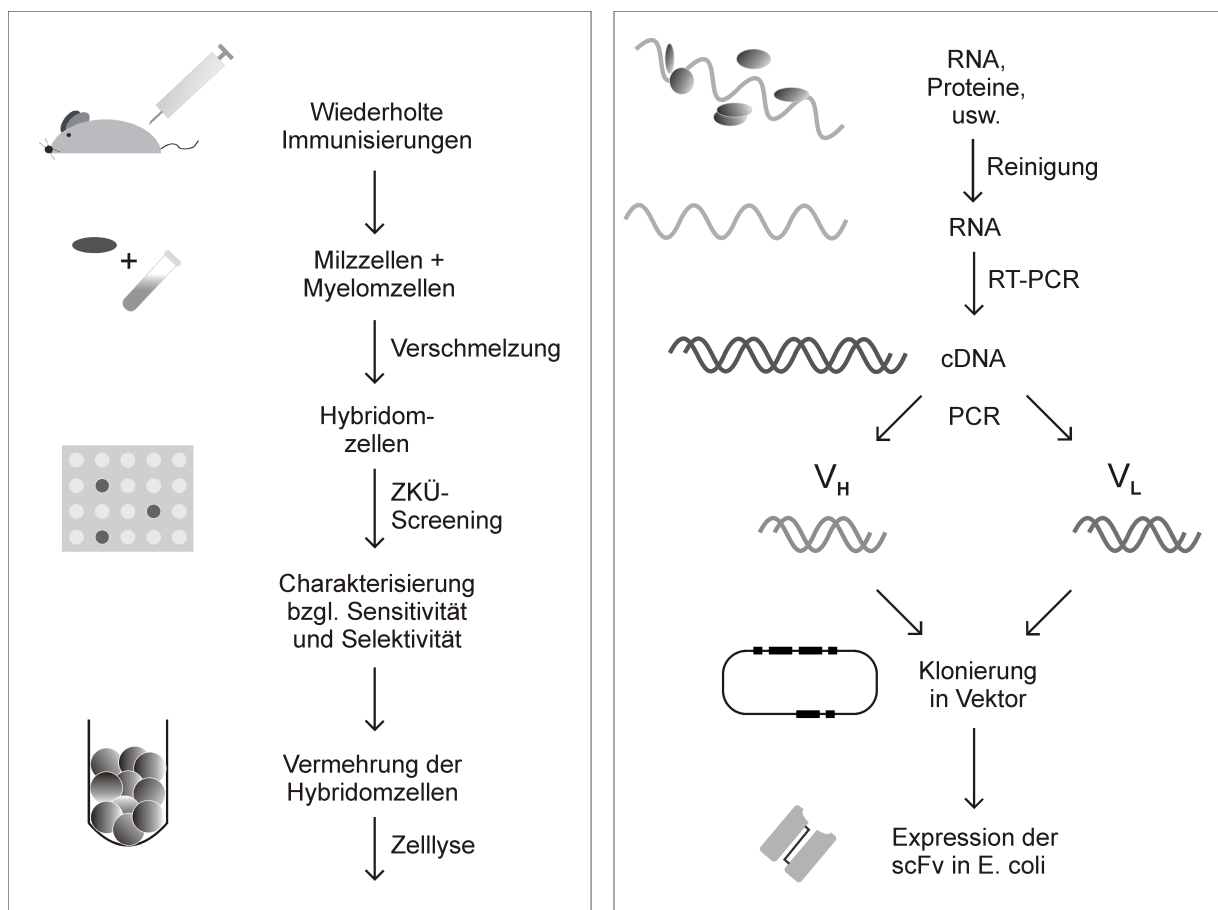


Abbildung 41: Schematische Darstellung der Strategie zur Isolierung der genetischen Information der schweren Kette (V_H) und der leichten Kette (V_L) der variablen Domäne der scFvs (RT-PCR = *reverse transcription*-polymerase chain reaction).

Zunächst wurden Mäuse mit B[a]P-Proteinkonjugaten immunisiert und anschließend deren Milzzellen mit Myelomzellen zu Hybridomzellen verschmolzen. Durch ein intensives Screening wurden diejenigen Hybridomzellen ausgewählt, die die affinsten Antikörper gegen B[a]P produzierten (siehe Kapitel III.2.2). Für die eigentliche scFv-Produktion sollten die Hybridomzellen einer Zellyse unterzogen und die RNA isoliert werden. Die gereinigte RNA sollte mittels *reversed transcription - polymerase chain reaction* (RT-PCR) in cDNA umgeschrieben werden. Anschließend sollten die Bereiche, welche die leichten und schweren Ketten (V_L und V_H) der variablen Domänen der Antikörper kodieren, mittels PCR spezifisch amplifiziert werden. Für die PCR sollten auf Basis der von KABAT et al. publizierten Daten über Aminosäuresequenzen von Mausantikörpern 45 spezielle Primer synthetisiert werden (Kabat, 1991; siehe Kapitel II.3.3). Die genetische Information der V_L und V_H sollte schließlich in einem geeigneten Vektor vereint und die scFvs in *E. coli* exprimiert werden.

Zunächst war vorgesehen, eine Mischung aus zehn verschiedenen Hybridomzellklonen für die Errichtung einer Antikörperbibliothek zu verwenden. Ziel war es, alle zehn leichten und schweren Ketten miteinander zu rekombinieren und anschließend die affinsten Antikörper mittels Phagendisplay zu isolieren. Allerdings zeigten die ersten Versuche, dass nur jeweils zwei bis drei verschiedene V_L und V_H in den Vektoren gefunden werden konnten. Die Amplifizierung der leichten und schweren Ketten mit PCR verlief aus bisher nicht geklärten Gründen mit sehr unterschiedlicher Ausbeute. Dadurch dominierten bestimmte leichte und schwere Ketten die Antikörperbibliothek, während andere gar nicht gefunden werden konnten, die Komplexität der Bibliothek war somit zu gering. Deshalb wurde dazu übergegangen, die genetische Information für die V_L und V_H einzelner Hybridomzellklone zu isolieren und anschließend gezielt miteinander zu rekombinieren, ohne den Weg über eine Bibliothek zu beschreiten. Der Nachteil dieses Weges war der stark erhöhte Arbeitsaufwand, da sämtliche Arbeitsschritte nicht mehr in einem Ansatz durchgeführt werden konnten, wie das die Antikörperbibliothek ermöglicht hätte. Der entscheidende Vorteil war hingegen, dass der Ursprung der einzelnen V_L und V_H nun bekannt war und diese gezielt miteinander rekombiniert werden konnten.

3.2 Herstellung der Vektoren

Zur Isolierung der DNA-Abschnitte, die die V_L und V_H der variablen Antikörperregionen kodieren, wurden spezifische Primersets synthetisiert (siehe Kapitel V.3.2.3). Die Aminosäuresequenzen von Antikörpern innerhalb einer Spezies sind vor und nach den komplementären Bindungsregionen stark konserviert, weshalb es möglich ist, mit einem Set

von lediglich 45 Primern nahezu alle variablen Domänen von Mausantikörpern herzustellen. Die relevanten Aminosäuresequenzen sind von Kabat et. al 1991 publiziert worden und in Tabelle 5 (Kapitel II.3.3) dargestellt. In Vorwärtsrichtung können die V_L und V_H in 18 bzw. 19 Oligomere zusammengefasst werden und in Rückwärtsrichtung in jeweils 4 Oligomere, die nahezu alle möglichen Bereiche der DNA aus Mäusen abdecken, die die V_L und V_H kodieren. Vorwärtsrichtung bedeutet hierbei in Richtung des 5' Endes und Rückwärtsrichtung bedeutet in Richtung des 3' Endes des Antikörper-kodierenden Bereiches auf der DNA. Die letzte Base eines jeden Basentriplets wurde so gewählt, dass sie die häufigste Kodierungsmöglichkeit der jeweiligen Aminosäure in Maus abbildet. Des Weiteren enthält jedes Oligomer eine Erkennungssequenz für die verwendeten Restriktionsenzyme (siehe Abbildung 43) und einen nicht bindenden Rest, der ein Andocken des Restriktionsenzym erleichtert. Aufgrund einer Gesamtlänge von ca. 28 potentiell bindenden Basen, wurde eine Temperatur von 50 °C für die Primerhybridisierung in der PCR gewählt. In Abbildung 42 sind die isolierten Bereiche der DNA dargestellt, die die V_L und V_H der drei affinsten Klone 22F12, 4F11 und 5E11 kodieren.

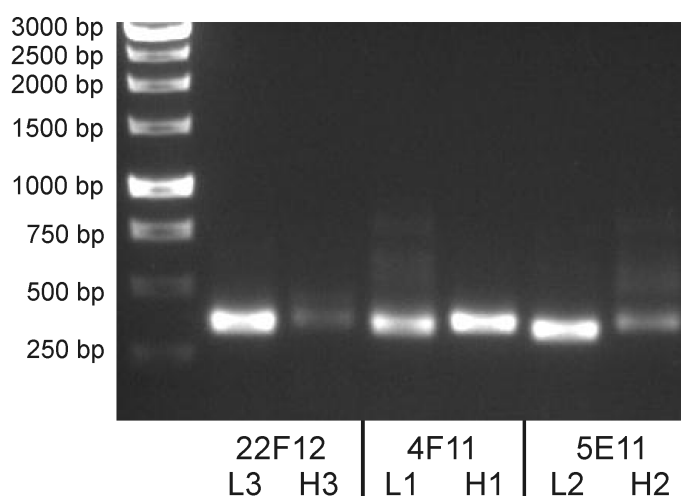


Abbildung 42: Aufnahme eines 1 %-Agarosegels unter UV-Licht zur Visualisierung der erfolgreichen Isolierung der DNA, die die V_L (jeweils links) und V_H (jeweils rechts) kodieren.

Es ist zunächst zu erkennen, dass die DNA für die V_L mit ca. 390 Basenpaaren etwas kürzer ist, als für die V_H (ca. 400 Basenpaare). Außerdem ist deutlich zu erkennen, dass die Konzentrationen und damit die Ausbeute der PCR-Reaktion der V_L und V_H von Klon zu Klon stark variierte. Darin könnte ein Grund für das Scheitern der Erzeugung einer Antikörperbibliothek aus zehn Hybridomzellklonen liegen. Für den Aufbau der Antikörperbibliothek wurden nicht einzelne Hybridomzellklone, sondern Mischungen aus allen Klonen verwendet. Nach der PCR dominierte vermutlich eine geringe Anzahl an V_L und

V_H die Bibliothek, weshalb beim anschließenden Sequenzieren von zufällig ausgewählten Vektoren der Bibliothek nur eine geringe Vielfalt festgestellt werden konnte.

Im weiteren Verlauf wurde der Antikörper 4F11 als Klon 1, 5E11 als Klon 2 und 22F12 als Klon 3 bezeichnet, wobei die Klone wiederum in V_L und V_H unterteilt wurden. So wird z. B. mit „L1“ die leichte Kette von Klon 1 oder mit „H3“ die schwere Kette von Klon 3 bezeichnet. Nach der erfolgreichen Isolierung der V_L und V_H wurde die genetische Information in einen geeigneten Vektor eingebaut. Es wurde ein Vektor verwendet, der bereits die Informationen für eine V_H und V_L trug, der einen scFv kodierte, der spezifisch an ein hydrophiles Polypeptid und damit nicht an B[a]P band, wodurch er als Negativkontrolle verwendet werden konnte (siehe Abbildung 43). Der scFv, der an das Polypeptid band, wird im Folgenden als „LNHN“ bezeichnet.

Neben der leichten und schweren Kette war in dem Vektor die Information für den Peptidlinker $(G_4S)_3$ zwischen den Ketten eingebaut. Die V_L und V_H wurden damit kovalent aneinander gebunden, wodurch sich die Stabilität des scFv stark erhöhte. Ein Linker wurde auch deshalb benötigt, weil V_L und V_H nicht über natürliche Disulfidbrücken verbunden sind. Außerdem wurden ein *Myc-Tag* und ein *Hexa-Histidin-Tag* eingeführt, die nach der Expression der scFvs eine Reinigung mit Affinitätschromatographie und eine Detektion mit markierten Antikörpern erlaubten. Neben den *Tags* sind noch Bereiche auf dem Vektor (Amber-Kodon, gIII, M13ori), die für einen Phagendisplay notwendig sind. Bei dem Amber-Kodon handelt es sich um ein Stopkodon, über das manche Bakterienstämme (z. B. *E. coli* TG1) hinweg lesen können und den scFv-Antikörper somit an das Oberflächenprotein pIII von Phagen koppeln können. Andere Bakterienstämme (z. B. *E. coli* HB2151) können über das Amber-Kodon nicht hinweglesen und erzeugen somit lösliche scFvs. Da in der vorliegenden Arbeit auf die Verwendung des Phagendisplays verzichtet wurde, wird hier nicht weiter auf diese Technik eingegangen. In Zukunft eröffnet der eingesetzte Vektor jedoch die Möglichkeit scFvs nach Affinitätsmaturation gezielt zu isolieren.

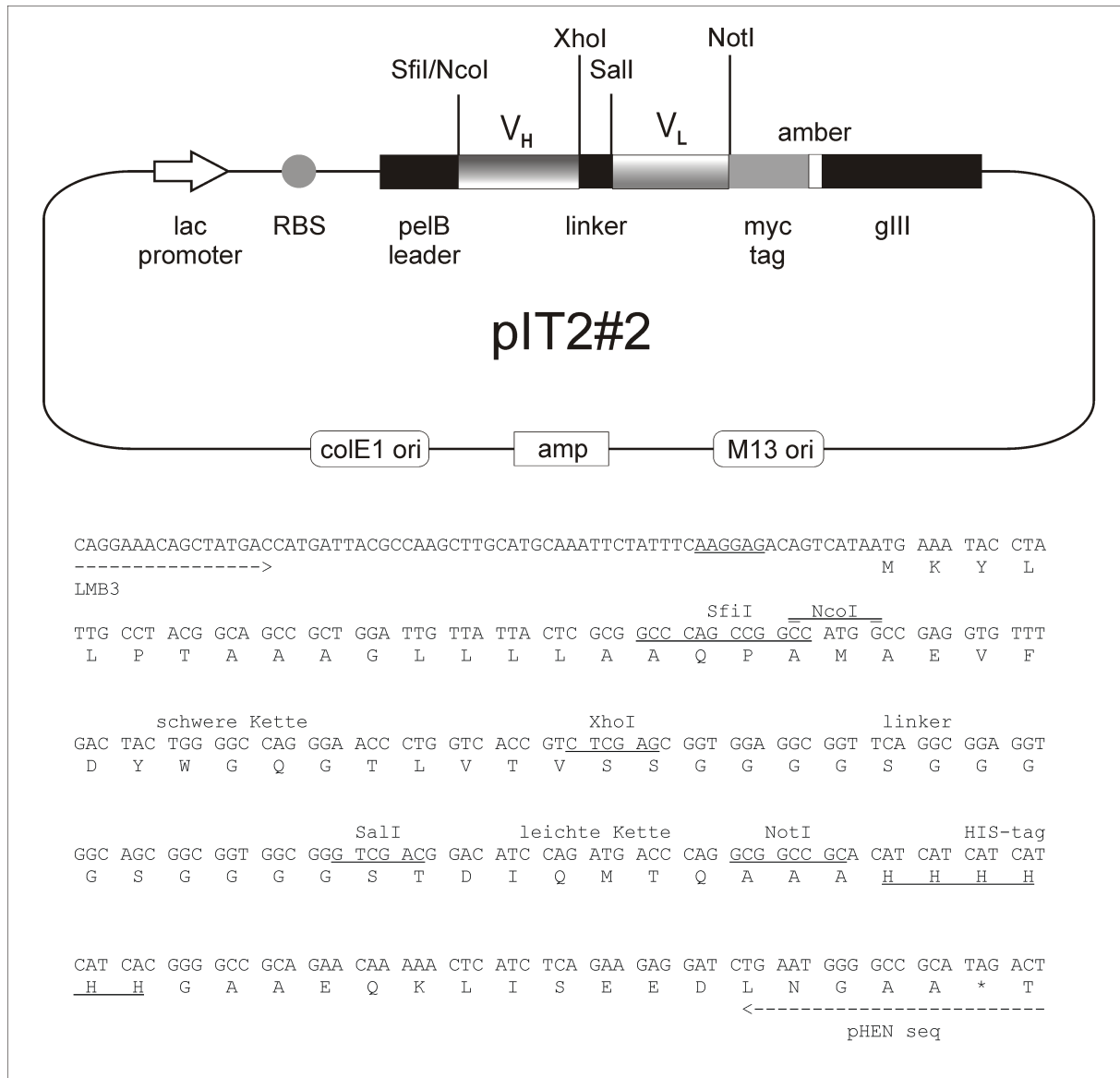


Abbildung 43: Schematische Darstellung des verwendeten Vektors pIT2#2. Es handelt sich hierbei um eine modifizierte Variante des Vektors pIT2 aus der Tomlinson-Bibliothek (de Wildt, 2000).

Die durch PCR isolierte DNA für die V_L und V_H wurde mit den Restriktionsenzymen Sall und NotI (V_L), sowie mit NcoI und XhoI (V_H) inkubiert, um die passenden Enden für einen Einbau in den Vektor pIT2#2 zu erzeugen. Mit den gleichen Restriktionsenzymen wurden die ursprünglichen V_L und V_H aus dem Vektor entfernt und das Produkt wurde dephosphoryliert, um zu verhindern, dass die ursprüngliche Information wieder in den Vektor eingeführt wird. Dabei stellte sich heraus, dass die antarktische Phosphatase effektiver arbeitete als die üblicherweise verwendete alkalische Phosphatase. Wurde die alkalische Phosphatase verwendet, kam es hauptsächlich zum Einbau der ursprünglichen DNA, was auf eine nicht vollständig abgeschlossene Dephosphorylierung schließen lässt.

Nach der Dephosphorylierung wurde die neue, nicht dephosphorylierte DNA zugegeben und mittels Ligase in den Vektor eingebaut. Der Erfolg des Einbaus der V_L und V_H in den Vektor wurde durch Sequenzierung überprüft. Die Ergebnisse aus der Sequenzierung wurden in Aminosäuresequenzen übersetzt, die in Abbildung 44 dargestellt sind.

FR1	CDR1	FR2	CDR2
L1 SSDIVMTQSPTTMTATSPGEEKITITC	SASSSISSNFLH	WYQQRPGFSPKLLIY	GTSNLAS
L2HKF.S..V.DRVS...	K..QDV.T-AVA	...K..Q.....	WA.TRHT
L3SS.YA.L..RV....	K..QD.N.-Y.N	.F..K..K...T...	H.NR.VD
LN .T..Q.....SSLSA.V.DRV....	R..Q....-Y.N	...K..KA.....	KA.S.Q.
: * * * . : : * * : : : * * * * *	** : :	* : * * * : * * * * *	: .
FR3	CDR3	FR4	
L1 GVPPRFSGSGSGTSSYSLTIGTMEAEDVATYYC	QQGSSIPFT	FGSGTKLEIKRAA	
L2 ...D..T.....D.T...SSVQ...L.L...	..HY.T...	
L3 ...S.....QD...I.SSL.F..MGI...	L.YDEF.Y.	..G.....	
LN ...S.....DFT...SSLQP..F.....	..SRQF.S.	..Q...V.....	
*** ** : * * * * * . : : * * : : : * * * * *	* . . * * *	** * * * : * * * * *	
FR1	CDR1	FR2	CDR2
H1 MAEVQVVESSGGLVQPGGSLKLSKAAS	GFPPFSFYGMA	WVRQTPDKRLELVA	TITSNNGFSIYYPDSVKG
H2KLM.....	..T.N....	.I.....	..Y.D.VIT.....
H3 ..Q..LQQ..AE..N..A.V.I..K.P	.YT.NN.WIE	..K.R.GHG..WIG	E.LPGSGR.NCNEKF.D
HNLL.....XR.....	..T..S.A.S	...A.G.G..W.S	S.SRQ.T.TR.A.....
* * * * : : * * . * * * * * * : * * * * *	* : * * . * : *	* : * * * * : * * : *	* . . : * * : *
FR3	CDR3	FR4	
H1 RFTISRDNKNTLYLQMNLSRSEDAMYYCAR	RGNGNYGDY	WGQGTTLTVS	
H2G.....S.V...S.	
H3 KA.FTA.TSS..A.M.LS..T.D.S.V...K	---K....	
HNS.....A...V...K	-A.SF-..LV...	
: * : : * . : * * * * : * * : : * * * * * : :	. : * * * * * : * * *		

Abbildung 44: Aminosäuresequenzen der ausgewählten Klone (CDR = *complementarity determining region*, komplementäre Bindungsregion, FR = *framework*, „Gerüst“). Konservierte Aminosäuren sind mit einem Punkt, fehlende Aminosäuren mit einem Bindestrich gekennzeichnet. Für eine bessere Übersichtlichkeit sind der Linker und die Tags nicht aufgeführt.

Die Aminosäuresequenzen der leichten Ketten unterscheiden sich von Klon zu Klon sehr stark. Insbesondere die CDRs weisen keinerlei Gemeinsamkeiten auf. Bei den schweren Ketten hingegen, fällt zunächst auf, dass die Sequenzen von Klon 1 und Klon 2 nahezu identisch sind, wobei die CDR3 sogar zu 100 % identisch ist. Ein Grund für die große Ähnlichkeit von Klon 1 und 2 könnte darin bestehen, dass diese ursprünglich von derselben Maus abstammen, wohingegen Klon 3 aus den Milzzellen einer anderen Maus generiert wurde. Bei genauerer Betrachtung der CDR3 der schweren Ketten wird ersichtlich, dass die

letzten vier Aminosäuren bei allen drei B[a]P-spezifischen Klonen identisch sind. Außerdem sind unter diesen Aminosäuren zwei Phenylalanine (Y), die eine hydrophobe Seitenkette besitzen und somit mit B[a]P wechselwirken könnten. Kristallstrukturanalysen von Fab-Fragmenten, die hydrophobe Analyten binden, haben gezeigt, dass Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten einen entscheidenden Beitrag zur Bindung leisten (Arevalo, 1993; Tsumoto, 2008).

3.3 Expression und Reinigung der scFv-Fragmente

Die Expression der löslichen scFvs erfolgte in *E. coli* HB2151, die nicht über das-Amber-Kodon hinweglesen können. Durch die Zugabe von Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) erfolgte eine Aktivierung des *lac*-Operons, was zur vermehrten Expression von löslichen scFvs führte. IPTG kann von *E. coli* nicht abgebaut werden, was einen konstanten IPTG-Spiegel in der Zelle und damit eine konstant hohe Proteinexpression garantiert. Neben einer hohen Expressionsrate ist vor allem die richtige Faltung des scFvs von großer Bedeutung. Durch die Arbeiten von SKERRA und PLÜCKTHUN, sowie von BETTER et al. ist es möglich geworden eine Sekretion der scFvs ins Periplasma der Bakterien zu erreichen (Skerra, 1988; Better, 1998). Da im Cytoplasma reduzierende Bedingungen herrschen, können keine Disulfidbrücken ausgebildet werden. Im Periplasma hingegen herrschen oxidierende Bedingungen, was zur Ausbildung von Disulfidbrücken führt.

Nach der Expression wurde die Extraktion der scFvs optimiert. Hierbei wurden drei verschiedene Methoden getestet, um die scFvs aus den Bakterien zu extrahieren: der osmotische Schock, die Ultraschallbehandlung und die enzymatische Spaltung der Zellwände mit Lysozym. Der Erfolg der Extraktion wurde mittels Gelelektrophorese, Western-Blot und indirekt nichtkompetitivem ELISA getestet. Die Ergebnisse aus dem ELISA-Test sind in Tabelle 28 zusammengefasst.

Tabelle 28: Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden mittels indirekt nichtkompetitivem ELISA. Als Maß für die scFv-Konzentration diente der Titer des Extrakts.

Klon	Kultur- überstand	Osmotischer Schock	Ultraschall	Enzymatische Spaltung
L2H2	100	1000	5000	20000
L3H3	0	20	50	200
LNH3	0	0	10	40

Im indirekt nichtkompetitiven ELISA wurde analog zur Titerbestimmung in Blutseren (vgl. Kapitel III.2.2) vorgegangen. Dieser Ansatz hatte den Vorteil, dass nur richtig gefaltetes Protein an das immobilisierte B[a]P-BSA binden konnte. Im Western-Blot können über einen Anti-Hexa-HIS-Antikörper zwar spezifisch scFvs angefärbt werden, es wird aber nicht ersichtlich, ob diese auch funktionell sind. Neben den drei oben genannten Extraktionsmethoden wurde im ELISA auch der Kulturüberstand getestet. Dieser enthielt lediglich im Fall des scFv L2H2 lösliches Protein. Es zeigte sich, dass die enzymatische Spaltung bis zu vier Mal mehr funktionelles Protein (scFv) freisetzte, als der osmotische Schock und die Ultraschallbehandlung. In Abbildung 45 ist der Western-Blot für die Extrakte aus der enzymatischen Spaltung aller hergestellten scFvs dargestellt. Für die spezifische Anfärbung von scFvs wurde ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter anti-Hexa-HIS-Antikörper verwendet.

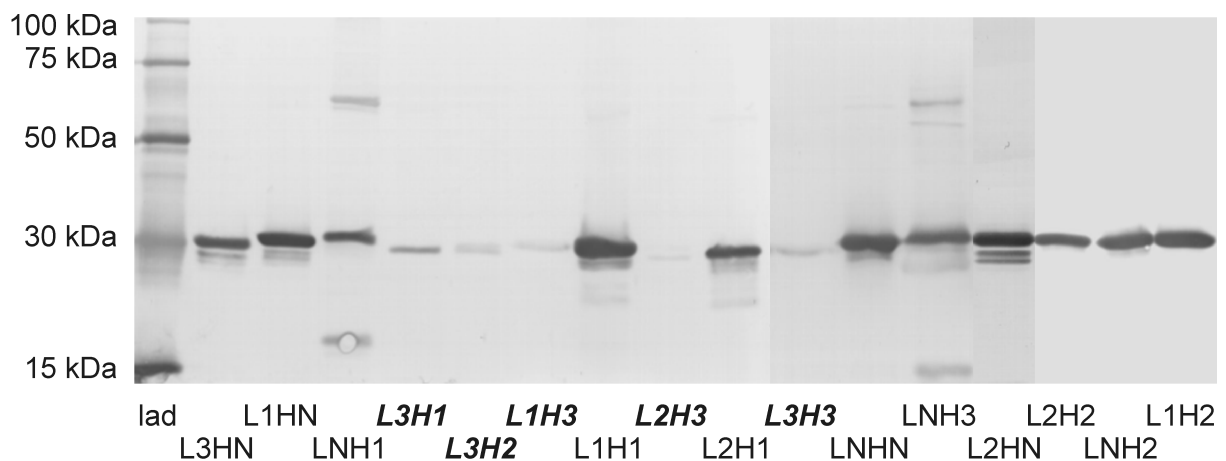


Abbildung 45: Western-Blot der Extrakte aus der enzymatischen Spaltung aller scFvs. Die scFvs, die niedrige Expressionsraten zeigten sind hervorgehoben.

Der Western-Blot zeigte, dass die Herstellung der scFvs erfolgreich war, da bei fast allen Extrakten starke Banden bei ca. 30 kDa auftraten. Die scFvs LNH1 und LNH3 ließen schwache Banden für Dimere erkennen (ca. 60 kDa), sowie Bruchstücke von scFvs bei 15 kDa bis 17 kDa. Es war deutlich sichtbar, dass scFv L3H3 und alle Kombinationen der V_L und V_H von Klon 3 mit anderen Klonen vergleichsweise niedrige Expressionsraten zeigten. L3H2, L1H3 und L2H3 lieferten im Western-Blot kaum Signal, während L3H1 und L3H3 ein geringes, aber deutlich vom Hintergrund unterscheidbares Signal lieferten. Deshalb wurde die Expression der scFvs L3H3, L3H1, L3H2, L1H3 und L2H3 optimiert, um ausreichende

Antikörpermengen für eine Testung im ELISA zu generieren. Abbildung 46 zeigt den Western-Blot für die Optimierung der Expression am Beispiel von scFv L3H1.

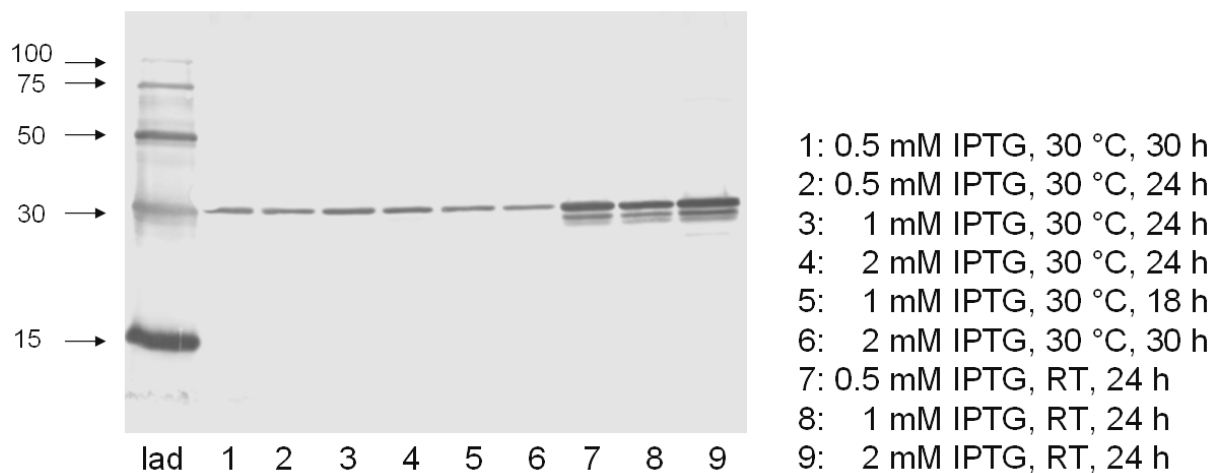


Abbildung 46: Western-Blot zur Optimierung der Expression von scFv L3H1.

Im Western-Blot war deutlich zu erkennen, dass vor allem die Temperatur entscheidend für die Expressionsrate war. Sowohl die Variation der IPTG-Konzentration, als auch die der Inkubationszeit (1-6) zeigten nur geringe Unterschiede. Wurden die *E. coli* jedoch bei Raumtemperatur inkubiert, so nahm die Expressionsrate stark zu. Die Erhöhung der IPTG-Konzentration von 0.5 mM auf 2 mM schien die Expressionsrate leicht zu steigern. Allerdings war dieser Effekt nicht so deutlich, wie die Reduktion der Inkubationstemperatur. Durch die Inkubation bei Raumtemperatur nahm nicht nur die Intensität der Bande bei ca. 30 kDa zu, sondern es erschien auch eine weitere Bande bei etwas niedrigerem Molekulargewicht. Dabei könnte es sich um nicht richtig gefaltetes Protein handeln. Nach der Optimierung der Expression wurden die scFvs L3H3, L3H1, L3H2, L1H3 und L2H3 mit Affinitätschromatographie gereinigt, um Matrixeffekte durch den Zellextrakt bei Tests mit ELISA und SPR zu vermeiden. Für die Reinigung der scFvs wurde die Eigenschaft des *Hexa-HIS-Tags* genutzt spezifisch an Nickel(II) zu binden. Die Zellextrakte wurden dabei über ein Gel geleitet, das mit Nickel(II) belegt war und anschließend mit Imidazol-haltigem Puffer eluiert. Die Reinheit der erhaltenen Fraktionen wurde mit Gelelektrophorese, Western-Blot und MALDI-TOF überprüft. Gelelektrophorese und Western-Blot zeigten bei allen scFvs eine Hauptbande bei ca. 30 kDa und eine schwächere Bande etwas unterhalb der 30 kDa (Daten nicht gezeigt).

In Abbildung 47 und Abbildung 48 sind jeweils die Massenspektren der ganzen IgGs (A) der Klone 5E11 und 22F12, sowie der korrespondierenden scFvs (B) L2H2 und L3H3 dargestellt.

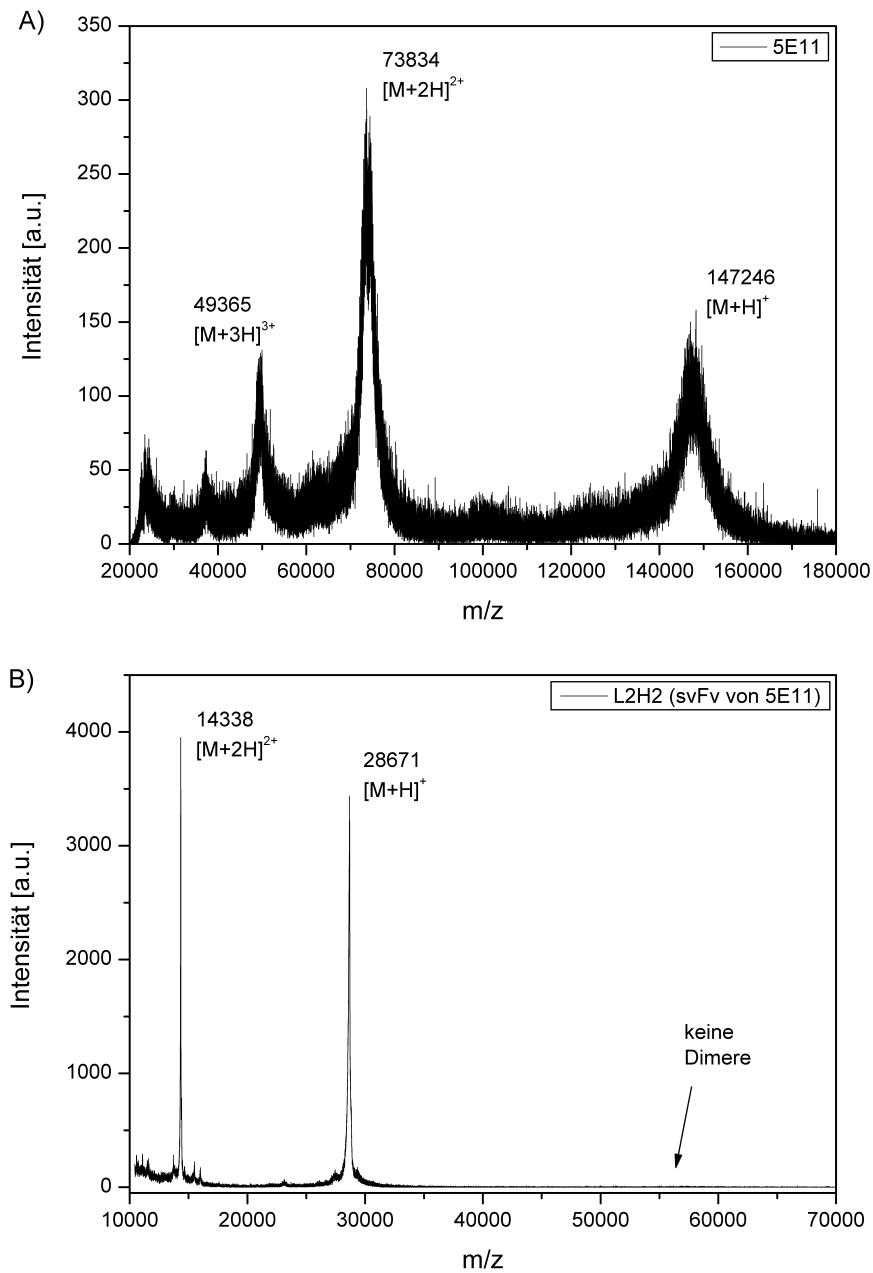


Abbildung 47: MALDI-MS-Spektren des monoklonalen Antikörpers 5E11 (A) und dem korrespondierenden scFv L2H2 (B).

Für die Aufnahme der MALDI-TOF-Spektren wurde Zimtsäure als Matrix verwendet, da sich diese sowohl für die Ionisierung der ganzen IgGs, als auch für die der scFvs eignete. Aufgrund des relativ hohen Molekulargewichts (ca. 147 kDa) und damit schlechteren Ionisationsausbeute der IgGs, ist das Signal/Rausch-Verhältnis bei der Messung der IgGs

größer als das der scFvs (ca. 28 kDa). Neben den einfach protonierten IgGs, lassen sich auch die zwei- und dreifach protonierten IgGs klar vom Hintergrundsignal unterscheiden.

Das Massenspektrum des scFv L2H2 weist keinerlei Spuren von Fremdproteinen oder Dimeren auf. Wie in Abbildung 48 B) zu erkennen ist, sind bei dem scFv L3H3 zwei Peaks vorhanden, die nicht dem scFv zugeordnet werden können (ca. $m/z = 11000$ und 16000). Hierbei könnte es sich um Verunreinigungen durch Fremdproteine handeln.

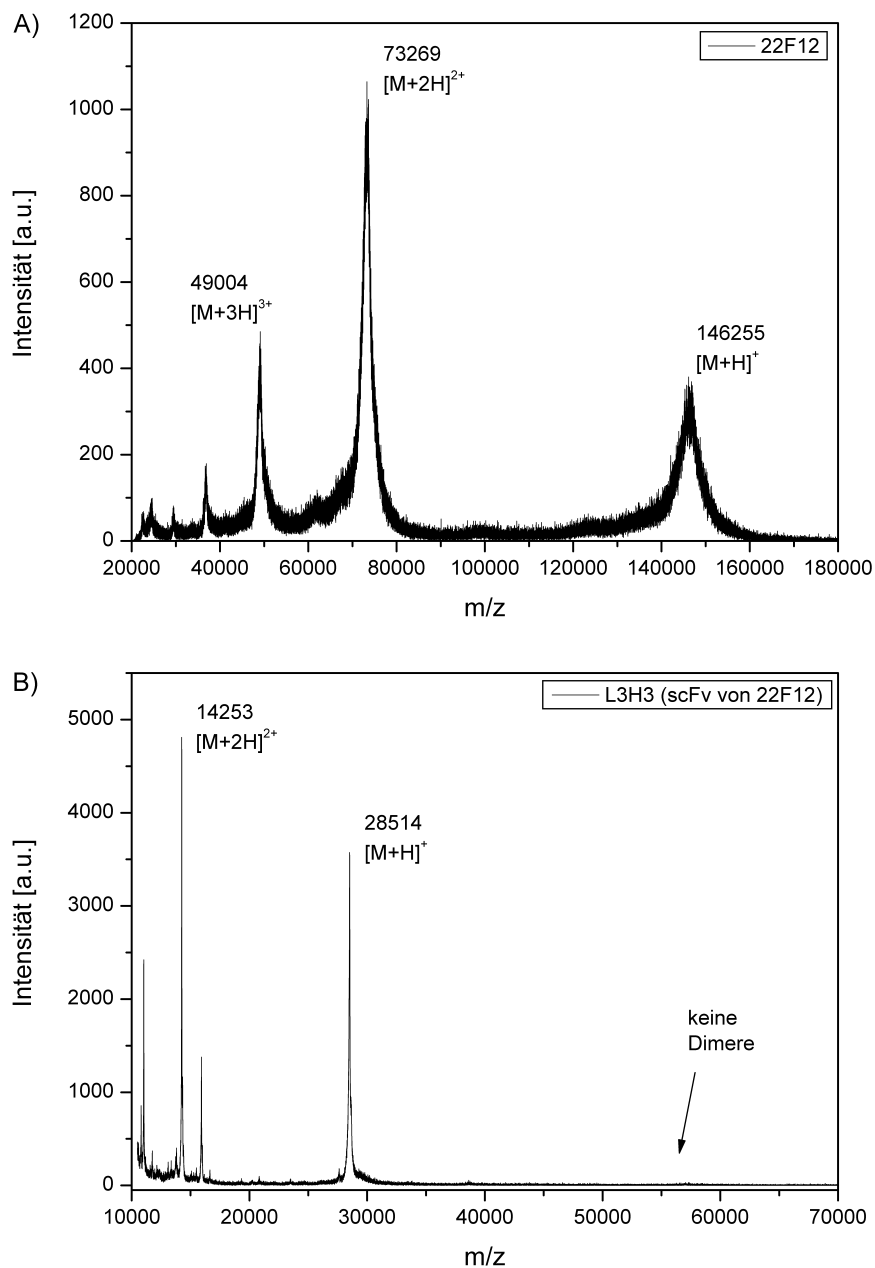


Abbildung 48: MALDI-MS-Spektren des monoklonalen Antikörpers 22F12 (A) und dem korrespondierenden scFv L3H3 (B).

Die Massen der scFvs lagen mit 28671 m/z (L2H2) und 28514 m/z (L3H3) in dem gleichen Bereich, der mit Western-Blot ermittelten Werte (ca. 30 kDa). Die erfolgreiche Herstellung von scFv-Antikörpern konnte somit durch MALDI-TOF bestätigt werden. Allerdings war es nicht möglich, mittels MALDI-TOF die richtig von den nicht richtig gefalteten scFvs zu unterscheiden. Diese ergaben in der Gelelektrophorese und im Western-Blot aufgrund der unterschiedlichen tertiären Struktur zwei Banden, konnten aber mittels MALDI-TOF nicht unterschieden werden, da sie dieselbe Masse besitzen.

3.4 Sensitivität und Selektivität der scFv-Fragmente

Die Sensitivität der scFvs wurde im indirekt kompetitiven ELISA in der Mikrotiterplatte (MTP) bestimmt. Als Beschichtungskonjugat wurde 10-B[a]P-Buttersäure-BSA verwendet. Für die anschließende Kompetition wurden B[a]P-Standards und in Puffer verdünnte Zellextrakte, die die scFvs enthielten, in die beschichtete MTP gegeben. Die Detektion der gebundenen scFvs erfolgte durch anti-Hexa-Histidin-Antikörper, die mit Peroxidase gekoppelt waren. Über die Peroxidase konnte eine Farbreaktion erfolgen und eine Absorptionsmessung zur Auslesung der MTP bei 450 nm durchgeführt werden. In Abbildung 49 sind die Kalibrierkurven für alle scFvs dargestellt, die eine Verdrängung durch freies B[a]P zeigten. Die Sensitivität aller scFvs war um einen Faktor 50 bis 60 schlechter, als die der monoklonalen Antikörper. Ein Grund hierfür könnte in der Monovalenz der scFvs gegenüber den bivalenten IgGs liegen. Außerdem entspricht die Tertiärstruktur der scFvs, die einen künstlich eingeführten Linker beinhaltet, nicht exakt der Struktur der Bindungsregion des IgGs. Um dennoch feststellen zu können, ob ein Antikörper hergestellt werden konnte, dessen Affinität gegenüber B[a]P besser war als die des monoklonalen Antikörpers 22F12, wurden die neu generierten scFvs mit dem scFv L3H3 verglichen. Der scFv L3H3 ist das rekombinante Äquivalent zu dem monoklonalen Antikörper 22F12. Sollte ein scFv gefunden werden, der eine höhere Affinität als L3H3 aufweist, müsste dieser in die bivalente Form (z. B. F(ab')₂) überführt werden, um bezüglich einer Sensitivitätsbestimmung im kompetitiven ELISA mit dem monoklonalen Antikörper 22F12 vergleichbar zu sein.

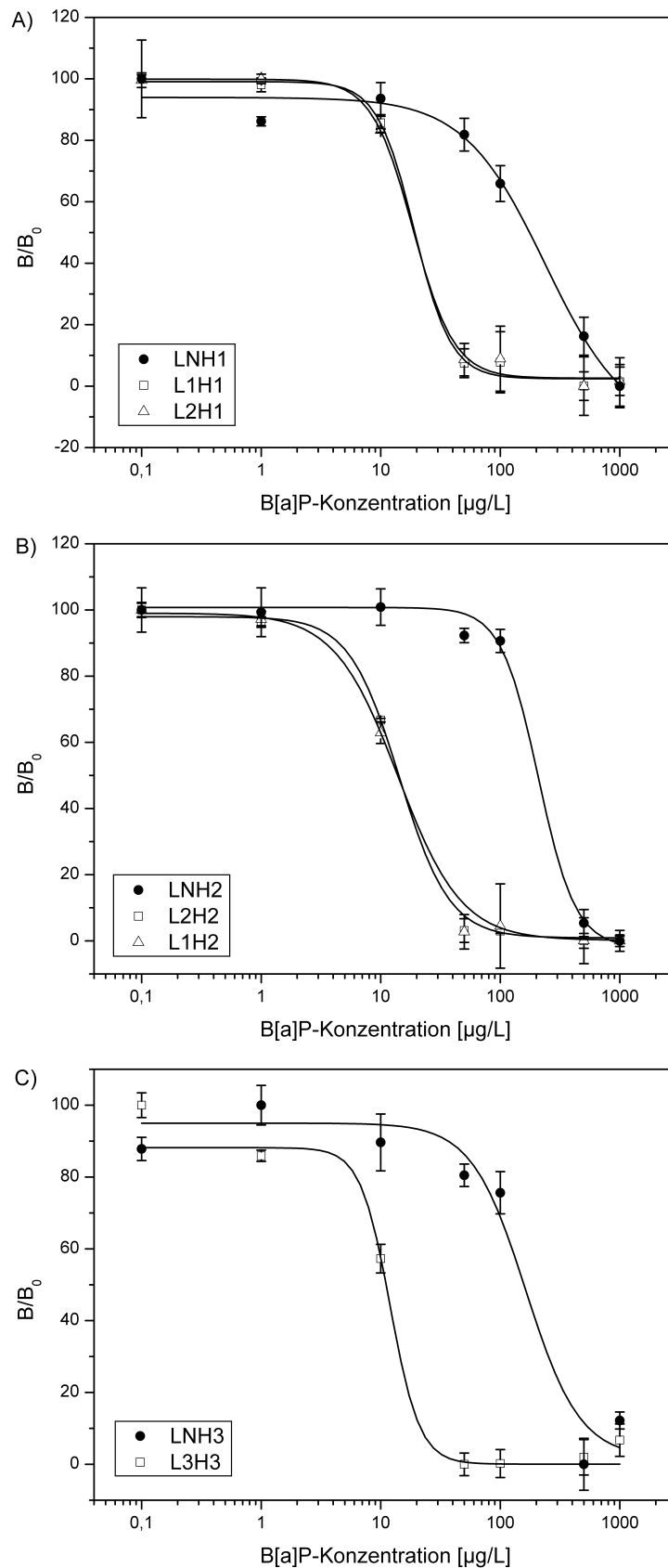


Abbildung 49: Indirekt kompetitiver ELISA der scFvs ($n = 7$, $m = 3$, $s = 1$): A) alle scFvs, deren schwere Kette von Klon 1 stammt, B) alle scFvs, deren schwere Kette von Klon 2 stammt und C) alle scFvs, deren schwere Kette von Klon 3 stammt. Für diese Kalibrierkurven wurden ungereinigte Zellextrakte verwendet.

Der scFv LNHN zeigte, wie zu erwarten war, keine Kreuzreaktivität gegenüber B[a]P. Auch die rekombinanten Antikörper L1HN, L2HN und L3HN zeigten keine Bindung an B[a]P. Eine Schlussfolgerung daraus war, dass die Rekombination der leichten Ketten von an B[a]P bindenden scFvs mit der schweren Kette eines nichtbindenden scFvs keine Bindung an B[a]P zeigten. Folglich war die leichte Kette der B[a]P-spezifischen Antikörper nicht verantwortlich für die Bindung. Umgekehrt zeigten alle Kombinationen der schweren Ketten der an B[a]P bindenden scFvs mit der nichtbindenden leichten Kette (LNH1, LNH2, LNH3) eine Verdrängung durch B[a]P. Dies bedeutete wiederum, dass die schwere Kette hauptverantwortlich für die Bindung von B[a]P war. Die erhaltenen IC₅₀-Werte sind Tabelle 29 zusammengefasst.

Tabelle 29: Zusammenfassung der Expressionsraten und der Testmittelpunkte (IC₅₀-Werte) für alle scFvs („+“ bedeutet niedrige und „+++“ hohe Expressionsrate). Für die Bestimmung der Testmittelpunkte wurden ungereinigte Zellextrakte verwendet.

	HN	H1	H2	H3
LN	+++ bindet nicht	+++ IC ₅₀ = 237 µg/L	+++ IC ₅₀ = 215 µg/L	+++ IC ₅₀ = 144 µg/L
L1	+++ bindet nicht	+++ IC ₅₀ = 19.4 µg/L	+++ IC ₅₀ = 12.5 µg/L	+
L2	+++ bindet nicht	+++ IC ₅₀ = 18.7 µg/L	+++ IC ₅₀ = 13.1 µg/L	+
L3	+++ bindet nicht	+	+	++ IC ₅₀ = 10.6 µg/L

Die Kombination einer leichten Kette mit der ursprünglichen schweren Kette (L1H1, L2H2 und L3H3) steigerte die Sensitivität gegenüber der Kombination einer schweren Kette mit LN um den Faktor zehn. Lag der IC₅₀ von LNH1 bei 237 µg/L, so war er bei L1H1 auf 19.4 µg/L abgesenkt. Die schwere Kette ist folglich hauptverantwortlich für die Bindung von B[a]P, die Rekombination der richtigen leichten und schweren Kette erzeugt allerdings eine enorme Steigerung in der Sensitivität. Einen weiteren Hinweis für die Dominanz der schweren Kette bei der Bindung von B[a]P lieferten die scFvs L2H1 und L1H2. Die IC₅₀-Werte von L1H1 und L2H1 sind nahezu identisch, der Austausch der leichten Kette hatte folglich keine Auswirkung auf die Affinität des scFvs. Dasselbe gilt auch für die scFvs L1H2 und L2H2.

Die Konzentration der scFvs L1H3, L2H3, L3H1 und L3H2 im Zellextrakt war zu gering, um ausreichend Signal zu erzeugen, bzw. Kalibrierkurven aufzunehmen. Deshalb wurde die Expression dieser scFvs optimiert und eine Affinitätsreinigung mittels Nickel(II)-

Sepharosegel durchgeführt (siehe Kapitel III.3.3). Allerdings war es auch nach der Reinigung nur mit scFv L3H1 möglich, eine Kalibrierkurve zu erstellen. Diese ist in Abbildung 50 dargestellt.

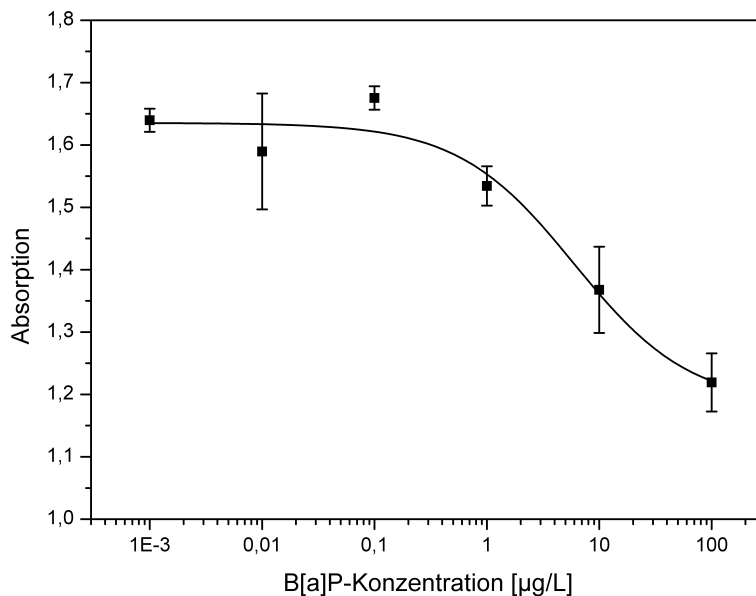


Abbildung 50: Kalibrierkurve für scFv L3H1 mit einem IC_{50} -Wert von $6.0 \mu\text{g/L}$ ($n = 6$, $m = 3$, $s = 1$).

Der Testmittelpunkt von scFv L3H1 lag mit $6.0 \mu\text{g/L}$ unterhalb dessen von L3H3 ($10.6 \mu\text{g/L}$). Allerdings waren die Standardabweichungen und der Hintergrund (Absorption von 1.2) sehr groß. Vermutlich konnten nicht alle scFvs richtig gefaltet werden, in der gereinigten Fraktion lag also funktionelles Protein neben inkorrekt gefaltetem Protein vor. Dieser Schluss lag nahe, da auch im Western-Blot bei ca. 30 kDa mehrere Banden auftraten, die durch das Vorhandensein von unterschiedlichen Tertiärstrukturen erklärt werden können. Durch hohe Mengen an nicht funktionellem Protein könnte der hohe Hintergrund bedingt sein, da eine hohe Konzentration an scFv notwendig war, um eine Kalibrierkurve zu generieren. Obwohl der Testmittelpunkt von scFv L3H1 niedriger war als der von L3H3, schien der scFv L3H1 damit nicht geeignet für eine Detektion von B[a]P.

Zur weiteren Untersuchung der scFvs L1H3, L2H3, L3H1, L3H2 und L3H3 wurden Bindungsstudien mittels SPR durchgeführt, d. h. die Assoziationsratenkonstanten (k_a), Dissoziationsratenkonstanten (k_d) und damit die Affinitätskonstanten (K_A) bestimmt. Um einen indirekten Assay zu ermöglichen, musste B[a]P kovalent auf einem derivatisierten Goldchip immobilisiert werden. Die kovalente Immobilisierung von B[a]P auf dem derivatisierten Goldchip erfolgte über einen Peptidlinker (analog zu Kapitel III.1.1) mit der

Sequenz Lysin-Glycin-Serin-Glycin-B[a]P. Über die primäre Aminogruppe der Seitenkette des Lysins wurde der Angriff auf die aktivierten Carboxylgruppen des derivatisierten Goldchips ermöglicht. Serin wurde in die Peptidkette eingebaut, um die Wasserlöslichkeit des gesamten Moleküls zu erhöhen. Nach der Immobilisierung des B[a]P-Peptids konnten die scFvs über den Chip geleitet werden und deren Assoziations- und Dissoziationsverhalten konnte im Unterschied zum ELISA in der MTP labelfrei ausgelesen werden. Abbildung 51 zeigt die Bindung und Dissoziation von scFv L3H3.

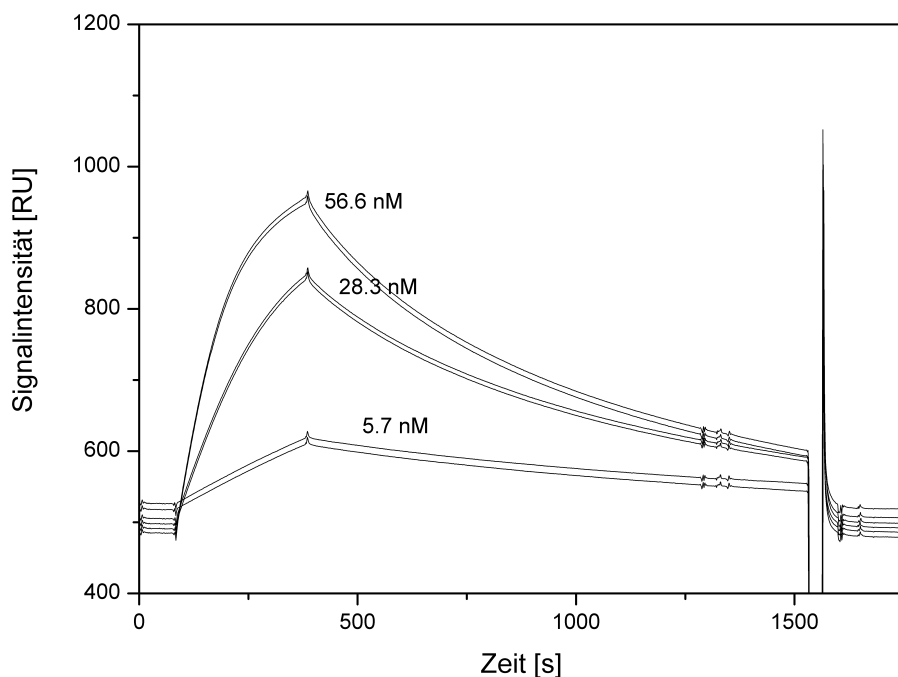


Abbildung 51: SPR-Messungen für scFv L3H3 ($n = 3$, $m = 2$).

Aus den SPR-Kurven ließen sich über 1:1-Bindungsmodelle k_a und k_d und damit Affinitätskonstanten berechnen.

In Tabelle 30 sind die berechneten Konstanten für alle scFvs mit geringen Expressionsraten (L1H3, L2H3, L3H1 und L3H2) im Vergleich zu scFv L3H3 dargestellt.

Tabelle 30: Zusammenfassung der mit SPR bestimmten Assoziationsratenkonstanten k_a , Dissoziationsratenkonstanten k_d und der daraus berechneten Affinitätskonstanten K_A .

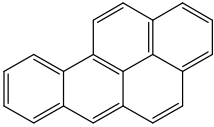
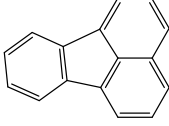
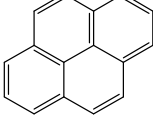
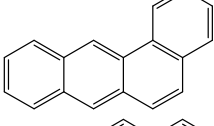
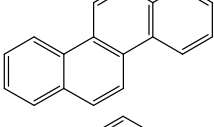
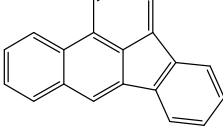
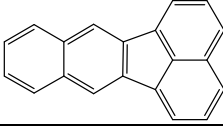
scFv	k_a [1/Ms]	k_d [1/s]	K_A [1/M]
L3H3	254300	$2.066 \cdot 10^{-3}$	$1.2 \cdot 10^8$
L3H1	1136	$8.615 \cdot 10^{-4}$	$1.3 \cdot 10^6$
L3H2	66	$6.119 \cdot 10^{-4}$	$1.1 \cdot 10^5$
L1H3	130	$7.122 \cdot 10^{-5}$	$1.8 \cdot 10^6$
L2H3	31	$2.858 \cdot 10^{-4}$	$1.1 \cdot 10^5$

Die Affinitätskonstante von L3H3 lag mit $1.2 \cdot 10^8$ 1/M in einem für affine Antikörper typischen Bereich. Vergleicht man die Affinitätskonstante des scFv L3H3 mit dem entsprechenden monoklonalen IgG-Antikörper 22F12 (vgl. Kapitel III.2.4.2), so wird der Effekt der Bivalenz deutlich. Für den Antikörper 22F12 ergab sich eine Affinitätskonstante von $1.02 \cdot 10^9$ 1/M, also eine Größenordnung über der Affinitätskonstante des monovalenten scFv L3H3. Die scFvs L1H3, L2H3, L3H1 und L3H2 zeigten kaum Bindung an die derivatisierte Chipoberfläche. Lediglich scFv L3H1, der auch im ELISA Verdrängung durch freies B[a]P gezeigt hatte, wies eine Assoziationsratenkonstante von 1136 1/Ms auf. Diese lag jedoch weit unterhalb der von L3H3 (254300 1/Ms). Somit konnten die negativen Befunde der ELISA-Tests mit einer labelfreien Methode (SPR) verifiziert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der scFv L3H1 nicht affiner als L3H3 ist.

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses der leichten Ketten auf die Bindungseigenschaften der scFvs wurden für L1H1, L2H1, L2H2 und L1H2 die Kreuzreaktivitäten für sechs PAKs ermittelt. Es wurden die PAKs Fluoranthen, Pyren, Benzo[a]anthracen, Chrysen, Benzo[b]fluoranthen und Benzo[k]fluoranthen ausgewählt, da die monoklonalen Antikörper für diese PAKs die höchsten Kreuzreaktivitäten aufwiesen. In Tabelle 31 sind die Ergebnisse zusammengefasst, wobei die Kreuzreaktivität für B[a]P auf 100 % gesetzt wurde. Zunächst war zu vermuten, dass das Kreuzreaktivitätsverhalten der scFvs L1H1 und L2H1, bzw. L2H2 und L1H2 identisch ist, da die schwere Kette vermutlich entscheidend für die Bindung der PAKs war. Vergleicht man scFv L1H1 mit L2H1, so trifft dies für die PAKs Pyren, Chrysen und Benzo[k]fluoranthen zu. Die Kreuzreaktivität gegenüber Fluoranthen, Benzo[a]anthracen und Benzo[b]fluoranthen hat sich jedoch signifikant verändert. Noch deutlicher wird die

Veränderung bei einem Vergleich der scFvs L2H2 und L1H2, da hier lediglich die Kreuzreaktivität für Benzo[k]fluoranthren mit 12 % bzw. 7 % ähnlich groß ist. Für alle anderen PAKs unterscheiden sich die Kreuzreaktivitäten von L2H2 und L1H2 um einen Faktor von zwei bis zehn.

Tabelle 31: Kreuzreaktivitäten der scFvs L1H1, L2H1, L2H2 und L1H2. Die Kreuzreaktivität für B[a]P wurde auf 100 % festgelegt und die Kreuzreaktivitäten für die anderen Substanzen wurden relativ zu der für B[a]P in % ausgedrückt.

Substanz	Struktur	L1H1	L2H1	L2H2	L1H2
Benzo[a]pyren		100	100	100	100
Fluoranthren		5	16	22	11
Pyren		44	49	117	239
Benzo[a]-anthracen		159	305	665	173
Chrysen		207	288	1694	265
Benzo[b]-fluoranthren		9	<1	<1	11
Benzo[k]-fluoranthren		20	25	12	7

Die schwere Kette ist, wie die Testmittelpunkte im kompetitiven ELISA mit B[a]P gezeigt haben, vermutlich ausschlaggebend für die Affinität der scFvs. Allerdings scheint die leichte Kette das Kreuzreaktivitätsverhalten der scFvs zu beeinflussen. In Zukunft könnte die Affinität der scFvs durch Mutation in der CDR3 der V_H gesteigert werden und die Selektivität durch Mutation der Aminosäuren in der V_L erhöht werden.

Die besondere Rolle der CDR3 der V_H bei der Bindung von Antigenen ist bereits beschrieben worden (Seal, 2000; Xu, 2000; Aburatani, 2002; Murakami, 2010). SEAL et al. zeigten z. B.,

dass Mutationen in der CDR3 der V_H in besonderem Maße die Affinität von scFvs beeinflussen (Seal, 2000). XU et al. haben Hinweise darauf gefunden, dass die CDR3 der V_H für die Spezifität von Antikörpern entscheidend ist (Xu, 2000). Allerdings ist auch bekannt, dass Änderungen in den *frameworks* (FR), v. a. von Aminosäuren, die nahe an den CDRs liegen, die Affinität von Antikörpern entscheidend beeinflussen können (Wark, 2006). Außerdem widersprechen die Arbeiten von QIU et al. der Theorie, dass die CDR3 der V_H den größten Einfluss auf die Affinität von Antikörpern hat (Qiu, 2007), da gezeigt wurde, dass durch Verknüpfung der CDR1 der V_H mit der CDR3 der V_L über die FR2 der V_H hoch affine Antikörperfragmente erzeugt werden können. Diese Antikörperfragmente sind also ohne die Beteiligung der CDR3 der V_H hoch affin. Somit wird deutlich, dass das Zusammenspiel der V_L und V_H , sowie deren CDRs und FRs, noch nicht vollständig verstanden ist. Die in dieser Arbeit dargestellte systematische Untersuchung der Bindungseigenschaften von scFvs kann einen weiteren Beitrag zum tieferen Verständnis der synergistischen Effekte der V_L und V_H leisten.

IV Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, schnelle immunanalytische Verfahren zur Detektion von Mykotoxinen in Getreide und von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs) in Trinkwasser zu entwickeln. Bei der qualitativen und quantitativen Bestimmung von Mykotoxinen stand die Methodenentwicklung im Vordergrund, bei der Detektion von PAKs in Trinkwasser lag der Schwerpunkt auf der Entwicklung neuer hoch affiner Antikörper.

Bei den Mykotoxinen Aflatoxin B₁, B₂, G₁ und G₂, sowie Ochratoxin A (OTA) handelt es sich um sekundäre Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen, die unter anderem Getreide befallen können. Da Mykotoxine akut toxische, immunsuppressive, mutagene, teratogene und karzinogene Verbindungen sind, wurden in der Deutschen Mykotoxin-Höchstmengenverordnung strenge Grenzwerte für Mykotoxine in Lebensmitteln festgelegt. So gilt für die Summe der Aflatoxine in Getreide ein Grenzwert von 4 µg/kg und für OTA ein Wert von 5 µg/kg. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde ein regenerierbarer Chemilumineszenz-Durchfluss-Mikroarray für die parallele Detektion von Aflatoxinen und OTA in Hafer-, Weizen- und Roggenmehl entwickelt. Die Auslesung des Mikroarrays erfolgte mit dem am Institut für Wasserchemie entwickelten *Munich Chip Reader 3* (MCR 3). Unter optimierten Bedingungen war es möglich, einen Mikroarray-Chip für bis zu 30 Messungen zu verwenden, ohne einen signifikanten Signalabfall zu beobachten. Die Messzeit für eine Probe betrug dabei lediglich 11 min. Bei einer parallelen Kalibrierung lagen die Nachweisgrenzen für Aflatoxine in Hafermehl bei 0.9 µg/kg und für OTA bei 1.5 µg/kg. Die Arbeitsbereiche betrugen für Aflatoxine 1.7 – 7.8 µg/kg und für OTA bei 2.4 – 12.0 µg/kg, wodurch eine Quantifizierung im gesetzlich relevanten Bereich möglich war. Außerdem konnte in einer Mehrtagesstudie gezeigt werden, dass eine Kalibrierung des Gerätes lediglich alle fünf Tage notwendig war, was auch die Robustheit der neuen Methode verdeutlicht. Zur weiteren Validierung des Mikroarray-Chips wurden Wiederfindungsraten von aufgestockten Realproben bestimmt. Die Wiederfindungsraten der Mykotoxine in aufgestocktem Hafer-, Weizen- und Roggenmehl lagen für Aflatoxine zwischen 72 % und 160 %, sowie zwischen 87 % und 120 % für OTA und damit in einem für Immunoassays akzeptablen Bereich. Neben den aufgestockten Realproben wurde OTA auch in zwei zertifizierten Referenzmaterialien quantifiziert. Bei einem handelte es sich um eine Blankprobe für OTA in Weizen, die auch mit dem neuen Mikroarray-Verfahren als solche identifiziert werden konnte. Bei dem zweiten Referenzmaterial „Ochratoxin A (2.7 ± 1.0 µg/kg) in Weizen“ wurde eine Wiederfindungsrate von 89 % erzielt, was verdeutlicht, dass die neu entwickelte Methode für einen Einsatz unter realen Bedingungen geeignet ist. Ein Vorteil des Chemilumineszenz-Mikroarrays gegenüber klassischen Verfahren wie der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit

massenspektrometrischer Detektion besteht darin, dass eine Quantifizierung von Mykotoxinen in Probenextrakten ohne aufwendige Probenaufbereitung möglich ist. Da es sich bei dem MCR 3 darüber hinaus um eine eigenständige, portable Plattform handelt, könnte der Chemilumineszenz-Mikroarray in Zukunft als Screeningverfahren für eine schnelle Vor-Ort-Analytik in Getreidemöhlen eingesetzt werden.

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs) sind ubiquitäre Umweltkontaminanten, die durch unvollständige Verbrennung, Verkokung oder Verschmelzung von organischem Material entstehen können. Aufgrund ihrer Mutagenität und Kanzerogenität ist in der Trinkwasserverordnung ein Grenzwert von 100 ng/L für die Summe der PAKs Benzo[b]fluoranthen, Benzo[k]fluoranthen, Benzo[ghi]perylen und Indeno[1,2,3-cd]pyren in Trinkwasser festgelegt. Außerdem gilt für die Leitsubstanz Benzo[a]pyren (B[a]P) ein noch strengerer Grenzwert von 10 ng/L. Ziel dieser Arbeit war es, zunächst monoklonale und anschließend rekombinante Antikörper herzustellen, deren Affinität gegenüber B[a]P hoch genug ist, um im indirekt kompetitiven *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) eine Nachweisgrenze von 10 ng/L zu erreichen. Für die Herstellung monoklonaler Antikörper wurden Mäuse mit B[a]P-Buttersäure-Rinderserumalbumin(BSA)-Konjugaten immunisiert. Nachdem die Mäuse einen ausreichend hohen Titer gegenüber B[a]P zeigten, wurden Milzzellen der Mäuse mit Myelomzellen verschmolzen, um Hybridomzellen zu erzeugen. Nach der Vereinzelnung der Hybridomzellen mussten deren Zellkulturüberstände (ZKÜs) auf B[a]P-spezifische monoklonale Antikörper untersucht werden. Für dieses zeit- und kostenintensive Screening wurde unter Verwendung des MCR 3 ein neues Chip-basiertes Verfahren entwickelt und mit dem klassischen ELISA in der Mikrotiterplatte verglichen. Sowohl mit dem indirekten ELISA, als auch mit dem neuen Verfahren konnten sechs hoch affine Antikörper gegen B[a]P identifiziert werden. Der Vorteil der Chip-basierten Methode gegenüber dem klassischen ELISA war, dass für das Chip-basierte Screening lediglich wenige Nanoliter an ZKÜ benötigt wurden und dass die Auslesung mittels MCR 3 weniger als 5 min in Anspruch nahm. Aufgrund des geringen benötigten ZKÜ-Volumens könnte ein Screening in Zukunft zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt durchgeführt werden als bisher. Die Charakterisierung der sechs affinsten Klone bezüglich der Sensitivität und Selektivität erfolgte mittels indirekt kompetitivem ELISA und Oberflächenplasmonenresonanzmessungen (SPR-Messungen). Für die SPR-Messungen wurde ein wasserlösliches B[a]P-Peptid synthetisiert und kovalent auf einem SPR-Chip immobilisiert, was die Bestimmung von Affinitätskonstanten ermöglichte. Diese lagen zwischen $1.1 \cdot 10^8$ und $1.5 \cdot 10^{10}$ 1/M und damit in einem für hoch affine Antikörper typischen Bereich. Die mittels indirekt kompetitivem

ELISA ermittelten Nachweisgrenzen der monoklonalen Antikörper für B[a]P lagen zwischen 110 ng/L und 590 ng/L. Durch die Verwendung von weiteren PAK-BSA-Konjugaten, konnte ein optimierter ELISA entwickelt werden, der mit dem sensitivsten Klon 5E11 eine Nachweisgrenze von 32 ng/L erreichte. Da allerdings auch mit dem optimierten ELISA eine Quantifizierung im Bereich der gesetzlichen Höchstmenge von 10 ng/L nicht möglich war, wurde dazu übergegangen, rekombinante Proteine herzustellen, um höher affine Antikörper zu generieren.

Die rekombinante Herstellung ganzer Immunglobulin G (IgG) - Moleküle gestaltet sich aufgrund ihrer Größe schwierig. Da zur Bindung eines Antigens allerdings nur das variable Fragment der IgGs notwendig ist, hat sich die rekombinante Herstellung von Antigenbindenden Fragmenten (Fab) oder *single chain variable fragments* (scFvs) durchgesetzt. In einem scFv-Antikörper wird die schwere und leichte Kette des Fv-Fragments durch einen künstlich eingeführten Linker aus 12 bis 20 Aminosäuren verknüpft, da keine natürlichen Disulfidbrücken vorhanden sind. Die Produktion von rekombinanten Antikörpern erfolgte in der vorliegenden Arbeit auf Basis der genetischen Information von anti-B[a]P-Antikörper produzierenden Hybridomzellen. Dazu wurden die drei sensitivsten Klone 4F11, 5E11 und 22F12 ausgewählt. Die Hybridomzellen dieser Klone wurden einer Zelllyse unterzogen, die RNA isoliert und mittels *reversed transcription - polymerase chain reaction* (RT-PCR) in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurden die Domänen, welche die leichten und schweren Ketten (V_L und V_H) der variablen Domänen der Antikörper kodieren, mittels PCR mit spezifischen Primersets amplifiziert. Die isolierten V_L und V_H konnten erfolgreich in einem geeigneten Vektor vereint werden. Es wurden nicht nur die ursprünglichen V_L und V_H miteinander kombiniert, sondern die V_L und V_H aller Klone wurden gezielt miteinander rekombiniert. Außerdem erfolgte eine Rekombination aller V_L und V_H der B[a]P-bindenden Klone mit den V_L und V_H eines nicht an B[a]P-bindenden scFvs. Nachdem die V_L und V_H in den Vektor eingeführt worden waren, konnte eine Sequenzierung zur Ermittlung der Aminosäureabfolge der scFvs durchgeführt werden. Die Aminosäuresequenzen der leichten Ketten unterschieden sich von Klon zu Klon sehr stark, wobei insbesondere die komplementären Bindungsregionen (CDR1-3) keinerlei Gemeinsamkeiten aufwiesen. Bei den schweren Ketten hingegen fiel zunächst auf, dass die Sequenzen zweier Klone nahezu identisch waren, die CDR3 sogar zu 100 %. Bei genauerer Betrachtung der CDR3 der schweren Ketten wurde ersichtlich, dass die letzten vier Aminosäuren bei allen drei B[a]P-spezifischen Klonen identisch waren. Außerdem waren unter diesen Aminosäuren zwei Phenylalanine, die eine hydrophobe Seitenkette besitzen und somit mit B[a]P wechselwirken

könnten. Nach der Sequenzierung wurden die löslichen scFvs in *Escherichia coli* exprimiert und mittels enzymatischer Spaltung der Bakterienzellwände extrahiert. Für die Bestimmung der Sensitivität wurden die Zellextrakte im indirekt kompetitiven ELISA getestet. Zunächst ließ sich damit feststellen, dass die Sensitivität aller scFvs um einen Faktor von 50 bis 60 schlechter als die der monoklonalen Antikörper war. Ein Grund hierfür könnte in der Monovalenz der scFvs gegenüber den bivalenten IgGs liegen. Außerdem entspricht die Tertiärstruktur der scFvs, die einen künstlich eingeführten Linker beinhaltet, vermutlich nicht exakt der Struktur der Bindungsregion des IgGs. Um dennoch feststellen zu können, ob ein scFv hergestellt wurde, dessen Affinität gegenüber B[a]P höher war als die des monoklonalen Antikörpers 22F12, wurden die neu generierten scFvs mit dem scFv verglichen, der das rekombinante Äquivalent zu dem monoklonalen Antikörper 22F12 war. Bisher konnte jedoch kein scFv produziert werden, der eine höhere Affinität aufwies als der scFv von Klon 22F12. Bei der systematischen Rekombination der unterschiedlichen V_L und V_H stellte sich heraus, dass die Rekombination der V_L von B[a]P-spezifischen scFvs mit der V_H eines nichtbindenden scFvs keine Bindung an B[a]P zeigte. Folglich war die V_L der B[a]P-spezifischen Antikörper nicht verantwortlich für die Bindung. Umgekehrt zeigten alle Kombinationen der V_H von B[a]P-spezifischen scFvs mit der nichtbindenden V_L eine Verdrängung durch B[a]P. Die V_H war, wie auch die Testmittelpunkte im kompetitiven ELISA mit B[a]P ergeben haben, vermutlich hauptverantwortlich für die Affinität der scFvs. Allerdings schien die leichte Kette das Kreuzreaktivitätsverhalten der scFvs zu beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass die Rekombination einer V_H mit unterschiedlichen V_L auch zu verschiedenen Kreuzreaktivitätsmustern führte. Die besondere Rolle der CDR3 der V_H bei der Bindung von Antigenen kann auch durch literaturbekannte Arbeiten bestätigt werden. So ließ sich durch systematische Studien z. B. beweisen, dass Mutationen in der CDR3 der V_H in besonderem Maße die Affinität von scFvs beeinflussen. Allerdings existieren auch Arbeiten, die dieser Theorie widersprechen, was darauf hin deutet, dass das Zusammenspiel der V_L und V_H , sowie der einzelnen CDRs noch nicht vollständig erklärbar ist. Die in dieser Arbeit dargestellte systematische Untersuchung der Bindungseigenschaften von scFvs kann einen weiteren Beitrag zum tieferen Verständnis der synergistischen Effekte der V_L und V_H leisten. Außerdem konnten Hinweise gesammelt werden, dass die Affinität der scFvs in Zukunft durch Mutationen in der CDR3 der V_H gesteigert und die Selektivität durch Mutationen der Aminosäuren in der V_L erhöht werden könnten.

V Experimenteller Teil

1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

1.1 Geräte

ELISA

Auslesegerät Synergy HT (BioTek, Bad Friedrichshall)

Schüttler Easyshaker EAS 2/4 (SLT, Crailsheim)

Waschautomat ELx 405 Select (BioTek, Bad Friedrichshall)

Fluoreszenzpolarisation

Fusion α -FP (Perkin Elmer, Waltham, USA)

LC/MS

Exactive (ThermoScientific, Bremen)

HPLC-Säule Hypersil Gold, C18, 1.9 μ m, 100 x 2 mm (ThermoScientific, Bremen)

Säulenofen HotDog 5090 (ProLab, Reinach, Schweiz)

Spritzenpumpe Fusion HT (ThermoScientific, Bremen)

Surveyor MS PumpPlus (Finnigan, Bremen)

Surveyor Autosampler PlusLite (Finnigan, Bremen)

MALDI-TOF

Ultraflex TOF/TOF, N₂-Laser, 337 nm, positiv Modus (Bruker-Daltonics, Bremen)

Mikroarrays

Glasspritze SGE, 1 mL, Luer Lock (SGE, Melbourne, Australia)

Mikroarray-Spotter BioOdyssey Calligrapher Mini Arrayer (Bio-Rad, München)

Munich Chip Reader 3 (gwk Präzisionstechnik, München)

Stahlnadel Solid Pin SNS12 (ArrayIt, Sunnyvale, USA)

Oberflächenplasmonenresonanz

Biacore X100 (GE Healthcare, Freiburg)

Semipräparative HPLC

Analytische HPLC-Säule Gemini C18, 5 μ m, 100 x 4.6 mm ID (Phenomenex, Torrance, USA)

Entgaser ERC-3415 α (ERC Inc., Saitama, Japan)

Fraktionssammler INTEE (Polymer Laboratories, Shropshire, Großbritannien)

Hochdruck Gradientenpumpe (L-6200°, Merck, Darmstadt)

PC-Einsteckkarte LC421 (Software für Chrom. und Prozessanalytik GmbH, Weyhe-Leeste)

Sechs-Wege-Ventil (Rheodyne, Rohnert Park, USA)

Semipräparative HPLC-Säule Gemini C18, 5 µm, 150 x 10 mm ID (Phenomenex, Torrance, USA)

UV-Detektor L-4250 (Merck, Darmstadt)

Synthese

Glasverteilerrechen mit 5 Anschlüssen (Ochs, Bovenden/Lenglern)

Manometer VAP 5 (Vacuubrand, Wertheim)

Rotationsverdampfer RE 111 (Büchi, Flawil, Schweiz)

Schlenk-Apparatur: Hochvakuumpumpe RC 5 (Vacuubrand, Wertheim)

Tygon Schläuche 3.2 mm ID (VWR, Darmstadt)

Sonstiges

Gefriertrocknung Alpha 1-4 LSC (Christ, Osterode am Harz)

Gravierstift MICROMOT 50/E (Proxxon, Niersbach)

Mixer T25 basic (IKA Labortechnik, Staufen)

pH/Leitfähigkeits-Messgerät Multi 3401 (WTW, Weilheim)

Reinstwasseranlage Milli-Q plus 185 (Millipore, Schwalbach)

Trockenschrank 20-250 °C (Memmert, Büchenbach)

Ultraschallbad Sonorex Super RK106 (Bandelin, Berlin)

UV/Vis-Spektrometer DU 650 (Beckman, Fullerton, USA)

Vortexer TopMix Fisherbrand 15024 (Novodirect, Kehl)

Waage Mettler AT261 Delta Range (Mettler-Toledo, Giessen)

Waage Mettler PM4600 Delta Range (Mettler-Toledo, Giessen)

Zentrifuge Universal 30F (Hettich, Tuttlingen)

Zentrifuge Universal 320R (Hettich, Tuttlingen)

1.2 Software

Auswertesoftware SIP 0.4 (Karsunke Softwarebüro, Wolnzach)

Biacore X100 Control Software 1.1 und Evaluation Software 1.1 (GE Healthcare, Freiburg)

Chromstar 6.3 (Software für Chromatographie und Prozessanalytik GmbH, Weyhe-Leeste)

Exactive Tune (ThermoScientific, Bremen)

Fusion Instrument Control (Perkin Elmer, Waltham, USA)

Gen5 (BioTek, Bad Friedrichshall)

LabView 8.2 (National Instruments, Austin, USA)

Xcalibur (ThermoScientific, Bremen)

1.3 Antikörper und Antigene

Monoklonaler Antikörper gegen Aflatoxine 1F2 (Institut für Wasserchemie, München)

Monoklonaler Antikörper gegen Ochratoxin A (Soft Flow Biotechnology, Gödöllő, Ungarn)

Monoklonaler Antikörper gegen Trinitrotoluol (Strategic Diagnostics, Newark, USA)

Monoklonaler Antikörper gegen Zearalenon 1B11 (Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der LMU, Oberschleißheim)

Monoklonaler Antikörper gegen Zearalenon 11C9 (Antibodies-online, Aachen)

Pferd Anti-Maus Antikörper, HRP-markiert, affinitätsgereinigt (Axxora, Lörrach)

Ziege Anti-Maus IgG, vollständiges Antiserum (Sigma, Steinheim)

Ziege Anti-Mensch (IgG, IgA, IgM) IgG, vollständiges Antiserum (Sigma, Steinheim)

Aflatoxin B1, fest (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Aflatoxin B2, fest (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Aflatoxin G1, fest (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Aflatoxin G2, fest (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Benzo[a]pyren, fest (Dr. Ehmstorfer, Augsburg)

1,3-Benzo[a]pyren-Buttersäure (PAH Research Institute, Greifenberg)

6-Benzo[a]pyren-Buttersäure (PAH Research Institute, Greifenberg)

7-Benzo[a]pyren-Buttersäure (PAH Research Institute, Greifenberg)

10-Benzo[a]pyren-Buttersäure (PAH Research Institute, Greifenberg)

16 EPA PAKs, einzeln, fest (Dr. Ehrenstorfer, Augsburg)

Ochratoxin A, fest, 99.5 % (LGC Standards, Wesel)

1-Pyren-Buttersäure (257354, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Zearalenon, fest (Sigma-Aldrich, Steinheim)

1.4 Chemikalien und Materialien

Referenzmaterialien und Matrices

Hafer Schmelzflocken, *Babynahrung* (4000540002508, Kölln Flocken, Elmshorn)

Polenta Maisgrieß (4058700707817, Theodor Kattus, Maisach)

Rosen-(Weizen)mehl Typ 550 (4002457001261, Rosenmühle, Landshut)

Roggenmehl Typ 997 (4305399020803, Naturkind, Mülheim a. d. Ruhr)

Zertifiziertes Referenzmaterial BCR-471 Ochratoxin A (<0.6 µg/kg) in Weizen (IRM, Geel, Belgien)

Zertifiziertes Referenzmaterial Ochratoxin A (2.7 ± 1.0 µg/kg) in Weizen (Biopure, Tulln, Österreich)

Materialien

Biacore X100: Amine Coupling Kit (BR-1000-50, GE Healthcare, Freiburg)
BIA Maintenance Kit (BR-1006-66, GE Healthcare, Freiburg)
HBS EP+ Puffer (BR-1008-26, GE Healthcare, Freiburg)
Mouse Antibody Capture Kit (BR-1008-38, GE Healthcare, Freiburg)
Plastik-Vials PP, 1.5 mL (BR-1002-87, GE Healthcare, Freiburg)
Rubber Caps (BR-1004-11, GE Healthcare, Freiburg)
Sensor Chip CM5 (BR-1000-14, GE Healthcare, Freiburg)

12 channel reservoir (4877, Costar Corporation, Cambridge, MA, USA)

Einmalspritze, 1mL (H.999.1, Roth, Karlsruhe)

Einmal-Kanüle, 0.90 x 40 mm (C721.1, Roth, Karlsruhe)

Faltenfilter (595.5, Schleicher & Schüll, Dassel)

Färbeeinsatz PP (2291.1, Roth, Karlsruhe)

Färbeschale TPX (2290.1, Roth, Karlsruhe)

Handschuhe, Nitril (P778.1, Roth, Karlsruhe)

Immunoaffinitätssäulen AflaOchraTest (Vicam, Watertown, USA)

Klebefolie ARcare 90106, Akryl Hybrid, doppelseitig (Adhesive Research, Limerick, Irland;

Laserzuschnitt durch A.L.L. Lasertechnik, München)

Kanülen, steril, 0.8 x 120 (C630.1, Roth, Karlsruhe)

Kunststoffküvetten für UV/Vis Spektroskopie (Y199.1, Roth, Karlsruhe)

Kunststoffträger, PMMA (Sahlberg, Feldkirchen; gefräst am IWC, München)

Mikrotiterplatten, 96-well, flacher Boden, hohe Bindungskapazität (655061, Greiner, Frickenhausen)

Mikrotiterplatten, 96-well, flacher Boden, niedrige Bindungskapazität (655061, Greiner, Frickenhausen)

Mikrotiterplatten, 384-well, flacher Boden, hohe Bindungskapazität (788161, Greiner, Frickenhausen)

Parafilm (H666.1, Roth, Karlsruhe)

Pasteurpipetten (4522, Roth, Karlsruhe)

PD-10 Gelkartuschen Sephadex G-25 (GE Healthcare, Uppsala, Schweden)

Petrischalen Glas (0690.1, Roth, Karlsruhe)

Pipettenspitzen 0.1 – 10 µL, weiß (K138.1, Roth, Karlsruhe)

Pipettenspitzen 1 – 200 µL, gelb (B007.1, Roth, Karlsruhe)

Pipettenspitzen 100 – 1000 µL, blau (2679.1, Roth, Karlsruhe)

Probefläschchen, 4 mL (E155.1, Roth, Karlsruhe)

Reaktionsgefäße 1.5 mL (4190.1, Roth, Karlsruhe)

Rollrandgläser, 10 mL (X655.1, Roth, Karlsruhe)

Standard Objektträger, Kalk-Natron-Glas, geschnitten, 26 x 76 x 1 mm (0656.1, Roth, Karlsruhe)

Testkit zur Typbestimmung von Mausantikörpern (11 493 027 001, Roche, Mannheim)

Verschlussfilm für Mikrotiterplatten (EN76.1, Roth, Karlsruhe)

Zentrifugenröhrchen PP, 50 mL, unsteril (AN78.1, Roth, Karlsruhe)

Zentrifugenröhrchen PP, 15 mL, unsteril (AN76.1, Roth, Karlsruhe)

ZipTip, C₄ Pipettenspitzen (Millipore, Molsheim, Frankreich)

Chemikalien

Aceton, *laboratory reagent* (179973, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Aceton, *technical grade* (5025.3, Roth, Karlsruhe)

Acetonitril, *HPLC grade* (34998, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Acetonitril, *LC-MS grade* (34967, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Ameisensäure, *p.a. for MS* (94318, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Argon 4.6 (Air Liquide, München)

Bernsteinsäure (Invitrogen, Karlsruhe)

1,1'-Carbonyldiimidazol (21860, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Carboxymethoxylaminhydrochlorid (C13408-IG, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Casein (C5890, Sigma-Aldrich, Steinheim)

α-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure (C2020, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Diaminopolyethylenglykol, M~2000 g/mol (XTJ 502, Huntsman, Rotterdam, Niederlande)

Dichlormethan, *for peptide synthesis* (66738, Sigma-Aldrich, Steinheim)

N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (36650, Sigma-Aldrich, Steinheim)
N,N'-Diisopropylethylamin (496219, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Dikaliumhydrogenphosphat (60220, Sigma-Aldrich, Steinheim)
N,N'-Dimethylformamid (40258, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Dimethylsulfoxid (41647, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Dioxan (42510, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Essigsäure (320099, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Ethylendiamin Dihydrochlorid (19,580-4, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Fluorescein Isothiocyanat Isomer I, 98 % (F4274, Sigma-Aldrich, Steinheim)
N- α -Fmoc-glycin (04-12-1001, Novabiochem, Darmstadt)
N- α -Fmoc- ϵ -t boc-L-Lysin (04-12-1026, Novabiochem, Darmstadt)
N- α -Fmoc- ϵ -tbutyl-*O*-L-Serin (04-12-1033, Novabiochem, Darmstadt)
Fötale Rinderserum (Invitrogen, Karlsruhe)
Freund's Adjuvant, Zellsuspension (F5881, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Gentamicin (Serva, Heidelberg)
L-Glytamin (Invitrogen, Karlsruhe)
3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan (50040, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Glycin (G6201, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Glykolsäure (50590, Sigma-Aldrich, Steinheim)
HAT-Selektionsmedium (21060-017, Invitrogen, Karlsruhe)
Hellmanex II-Lösung (Hellma, Jena)
4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES, 9105, Roth, Karlsruhe)
N-Hydroxysuccinimid (56480, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Kaliumdihydrogencitrat (60214, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Kaliumdihydrogenphosphat (04248, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Kaliumsorbat (85520, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Meerrettichperoxidase (814393, Roche, Basel, Schweiz)
2-Mercaptoethanol (Serva, Heidelberg)
Methanol, *LC-MS grade* (34966, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Natriumazid (S2002, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Natriumcarbonat (71628, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Natriumchlorid (13565, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Natriumdodecylsulfat (71728, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Natriumhydrogencarbonat (71628, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Natriumhypochlorit (71696, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Natriumpyruvat (Invitrogen, Karlsruhe)
NovaPEG Rink Amide Resin (01-64-0473, Novabiochem, Darmstadt)
Pikrylsulfonsäure, 1 % in DMF (92824, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Piperidin (571261, Pikrylsulfonsäure, 1 % in DMF (92824, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Polyethylenglycol 1500 (Roche, Mannheim)
Polyethylenglykoldiglycidylether 526 Da (Diepoxy-PEG, 475696, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Pyridin p.a. (82702, Pikrylsulfonsäure, 1 % in DMF (92824, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Rinderinsulin (Roche, Mannheim)
Rinderserumalbumin (A3059, Sigma-Aldrich, Steinheim)
RPMI 1640 Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (Invitrogen, Karlsruhe)
Salzsäure, rauchend 37 % (84422, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Salzsäure, ~4.0 M (84435, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Schwefelsäure, 95-98 % (435589, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Stickstoff 5.0 (Air Liquide, München)
SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (37074, Pierce, Rockford, USA)
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (860336, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Triethylamin (90340, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Trifluoressigsäure (91707, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Triisopropylsilan (92095, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Tween 20 (8.17072, Merck, Darmstadt)
Wasser, LC-MS grade (HN43.2, Roth, Karlsruhe)
Wasserstoffperoxid, 30 % (31642, Sigma-Aldrich, Steinheim)

1.5 Puffer für ELISA (Mikrotiterplatte)

Für sämtliche Puffer wurde UV-Licht-vorbehandeltes Reinstwasser verwendet. Die Puffer, die für die Messungen am Biacore X100 und am MCR 3 durchgeführt wurden, sind in den jeweiligen Kapiteln beschrieben.

Blocklösung ELISA (1 % Casein)

1 g Casein

PBS, ad 100 mL

Die Lösung auf 80 °C erhitzen, anschließend auf 25 °C abkühlen lassen und durch einen Faltenfilter filtrieren.

Coatingpuffer ELISA (pH 9.6)Na₂CO₃, 1.59 gNaHCO₃, 2.93 gNaN₃, 0.2 g

Dest. Wasser, ad 1000 mL

Kopplungspuffer Proteinkonjugate (pH 7.5)NaHCO₃, 5.96 g

Dest. Wasser, ad 100 mL, pH-Wert mit 4 M Salzsäure eingestellt

Phosphatpuffer (PBS, pH 7.6)KH₂PO₄, 1.36 gK₂HPO₄, 12.2 g

NaCl, 8.5 g

Dest. Wasser, ad 1000 mL

Stopplösung ELISA (5 % H₂SO₄)98 % H₂SO₄, 50 mL

Dest. Wasser, ad 1000 mL

Substratlösung ELISA

Substratpuffer, 25 mL

TMB-Stammlösung, 500 µL

H₂O₂ (1%), 100 µL**Substratpuffer ELISA (pH 3.8)**

Kaliumdihydrogencitrat, 46.04 g

Kaliumsorbat, 0.10 g

Dest. Wasser, ad 1000 mL

TMB-Stammlösung ELISA

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, 375 mg

DMSO, 30 mL

Waschpufferkonzentrat ELISA (PBST-Konzentrat)KH₂PO₄, 8.17 gK₂HPO₄, 73.16 g

NaCl, 52.6 g

Tween 20, 30 mL

Dest. Wasser, ad 1000 mL

PBST ELISA (pH 7.6)

Waschpufferkonzentrat, 42 mL

Dest. Wasser, ad 2500 mL

1.6 Sonstiges

BALB/c Maus, weiblich (Charles River, Sulzfeld)

Myelomzellen, Maus, Zelllinie P3X63Ag8.653 (LGC Promochem, Wesel)

Zertifiziertes Referenzmaterial BCR-471 Ochratoxin A (<0.6 µg/kg) in Weizen (IRM, Geel, Belgien)

Zertifiziertes Referenzmaterial Ochratoxin A (2.7 ± 1.0 µg/kg) in Weizen (Biopure, Tulln, Österreich)

2 Standardprozeduren

2.1 Synthese von Hapten-Peptiden

2.1.1 Synthese von AFB2-CMO

Die Synthese erfolgte nach einer bekannten Methode (Cervino, 2007). 30 mg (0.274 mmol, 8.6 Äq.) O-Carboxymethylhydroxylamin Hemihydrochlorid wurden in einen 50 mL-Kolben mit Rührfisch vorgelegt. Es wurden 10 mg (0.032 mmol, 1 Äq.) Aflatoxin B2 in 12 mL Methanol/Wasser/Pyridin (4/1/1, v/v/v) zugegeben und 3 h bei 85 °C refluxiert. Die zunächst farblose Lösung färbte sich gelb. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer und im Hochvakuum entfernt und der Rückstand in 5 mL DCM aufgenommen. Anschließend wurde mit 15 mL 5 %iger Essigsäure gewaschen, wobei sich die DCM-Phase dunkelgrün färbte. Die organische Phase wurde abgetrennt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Für die Reinigung mittels präparativer HPLC wurde der schwarze Rückstand in 4 mL Methanol (0.1 % TFA) / Wasser (0.1 % TFA) (1/1, v/v) aufgenommen und 5 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in 2 Injektionen gereinigt. Als mobile Phase diente Methanol und Wasser mit je 0.1 % TFA. Der Gradient begann bei 10 % Methanol und wurde innerhalb von 10 min auf 90 % Methanol angehoben, wobei der Fluss 3.8 mL/min betrug. Anschließend wurde er 10 min bei 90 % Methanol gehalten. Die Detektion erfolgte mittels UV/Vis-Detektor bei 360 nm. Das Produkt wurde bei ca. 10 – 14 min aufgefangen und das Lösungsmittel wurde vollständig entfernt. Es wurden 9.0 mg (0.023 mmol, Ausbeute: 72 %) Produkt erhalten.

AFB2-CMO: $[M+H]^+$: $m/z = 388$ (100 %); $m/z = 390$ (5 %)

2.1.2 Synthese von ZEA-CMO

8.2 mg (0.0258 mmol, 1 Äq.) Zearalenon und 12.7 mg (0.0996 mmol, 3.9 Äq.) Carboxymethoxylamin wurden in einem 100 mL Kolben vorgelegt. Es wurden 10 mL Methanol/Wasser/Pyridin (4/1/1, v/v/v) zugegeben und 5.5 h bei 95 °C unter Rückfluss gehalten. Das Lösungsmittel wurde abgezogen und der braune Rückstand im Hochvakuum über Nacht getrocknet. Anschließend wurde der Rückstand in 2 mL Methanol und 18 mL Wasser (0.1 % Essigsäure, v/v) gelöst und bei einem Fluss von 1.5 mL/min auf einer C18-

Kartusche angereichert. Die Kartusche wurde in das 6-Wege-Ventil der semipräparativen HPLC-Anlage eingesetzt und der Gradient gestartet. Als mobile Phase diente Methanol und Wasser mit je 0.1 % TFA. Der Gradient begann bei 10 % Methanol und wurde innerhalb von 25 min auf 90 % Methanol angehoben, wobei der Fluss 3.8 mL/min betrug. Anschließend wurde er 5 min bei 90 % Methanol gehalten. Die Detektion erfolgte mittels UV/Vis-Detektor bei 280 nm, wobei das Produkt zwischen 27 min und 29 min aufgefangen und das Lösemittel vollständig entfernt wurde. Man erhielt 7.0 mg (0.0179 mmol, Ausbeute: 69 %) eines weißen Feststoffs.

ZEA-CMO: $[M+H]^+$: $m/z = 392.2$ (100 %); $m/z = 393.2$ (35 %)

2.1.3 Festphasenpeptidsynthese

Für die Immobilisierung der Mykotoxine auf dem derivatisierten Glaschip wurden Peptidlinker mittels Festphasenpeptidsynthese kovalent an die Mykotoxine gekoppelt. Die Aminosäuresequenz wurde wie folgt gewählt: Lys-Gly-Ser-Gly-Hapten. Die Kopplung des Mykotoxins an den Peptidlinker erforderte eine Carboxylfunktion am Hapten. Bei Ochratoxin A war diese bereits vorhanden. Im Falle des Aflatoxin B2 wurde das in Kapitel V.2.1.1 beschriebene AFB2-CMO für die Peptidsynthese verwendet. Für die Kopplung von Benzo[a]pyren an den Peptidlinker wurde 10-B[a]P-Buttersäure eingesetzt.

65 mg Kunstharz (0.029 mmol, 1 Äq.) wurden in eine Chromatographiesäule (ID: 3 cm) mit Fritte gegeben, eine Stunde in 5 mL DMF gequollen und anschließend fünf Mal mit je 3 mL DMF gewaschen. An die Chromatographiesäule war von unten über einen Gummistopfen ein Glasrohr mit Gasanschluss angebracht. Dieser Aufbau erlaubte das Ablassen des Lösungsmittels und das Durchmischen der Reaktionslösung durch den Eintrag von Stickstoff.

Kopplung der Aminosäuren:

0.143 mmol (5 Äq.) der Fmoc-geschützten Aminosäure wurden in 49.8 μ L (0.286 mmol, 10 Äq.) DIPEA in 3 mL DMF im Ultraschallbad gelöst und anschließend wurden 54.2 mg (0.143 mmol, 5 Äq.) HBTU zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf das Harz gegeben und 1 h unter Stickstoffzufuhr gekoppelt. Anschließend wurde die Lösung abgelassen und fünf Mal mit je 3 mL DMF gewaschen. Um den Erfolg der Kopplung zu überprüfen, erfolgte ein sog. TNBS-Test. Bei unvollständiger Reaktion wurde die Kopplung wiederholt.

TNBS-Test:

Mit einer Glaspipette wurden einige Harzkügelchen entnommen und in ein transparentes Kunststoffreaktionsgefäß überführt. Es wurden 2 Tropfen 10 % DIPEA in DMF und 2 Tropfen 1 % Picrylsulfonsäure in DMF zugegeben. Färbten sich die Kügelchen rot, lagen freie Aminogruppen vor. blieb das Harz farblos oder färbte sich nur sehr langsam rot, so waren keine freien Aminogruppen mehr vorhanden.

Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe:

Für die Demaskierung der terminalen Aminosäure wurden 3 mL Piperidin/DMF (1/6, v/v) auf das Harz gegeben und 20 min unter Stickstoffeintrag durchmischt. Die Lösung wurde abgelassen und das Harz fünf Mal mit je 5 mL DMF gewaschen. Anschließend wurde erneut ein TNBS-Test durchgeführt. Nun konnten die weiteren Aminosäuren wie oben beschrieben gekoppelt werden. Als erste Aminosäure wurde Fmoc- und Boc-geschütztes L-Lysin, als zweite Fmoc-geschütztes Glycin, als dritte Fmoc- und *t*Buthyl-geschütztes L-Serin und zuletzt erneut Fmoc-geschütztes Glycin verwendet.

Kopplung der Haptene:

0.0289 mmol (1 Äq.) des Haptens wurden in 3 mL DMF gelöst und anschließend 54.2 mg (0.143 mmol, 5 Äq.) HBTU zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf das Harz gegeben und 2 h unter Stickstoffeintrag durchmischt. Anschließend wurde die überstehende Lösung abgelassen und das Harz je drei Mal mit 3 mL DMF, DCM und Methanol gewaschen. Zuletzt wurde das Harz im Hochvakuum in der Chromatographiesäule getrocknet.

Abspalten und Demaskieren des Hapten-Peptids:

5 mL 10 % TFA, 2.5 % Wasser, 2.5 % TIS in DCM (4 mL DCM, 0.5 mL TFA, 0.25 mL H₂O, 0.25 mL TIS) wurden auf das trockene Harz gegeben und 10 min stehen gelassen. Die Lösung wurde langsam (10 Tropfen pro min) abgelassen und in einem 50 mL-Spitzkolben aufgefangen. Nun wurden 5 Mal je 2 mL 5 % TFA, 2.5 % Wasser, 2.5 % TIS in DCM auf das Harz gegeben, jeweils 5 min inkubiert und langsam in denselben Kolben abgelassen. Anschließend wurde die Lösung unter einem sanften Stickstoffstrom auf ein Zehntel der Ausgangslösung reduziert. Es wurden 5 mL 95 % TFA und 2.5 % TIS in DCM auf das Harz gegeben, 30 min stehen gelassen und in denselben Kolben abgelassen. Die Lösung wurde weitere 20 min stehen gelassen und anschließend unter einem sanften Stickstoffstrom getrocknet. Der bräunliche Rückstand wurde drei Mal mit je 3 mL kaltem Diethylether gewaschen und kurz im Hochvakuum getrocknet, wobei ein weißer Feststoff zurück blieb.

Aufreinigung und Analytik:

Der Rückstand wurde in 4 mL Methanol (0.1 % TFA) / Wasser (0.1 % TFA) (1/1, v/v) aufgenommen und in zwei Schritten mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt. Als mobile Phase diente Methanol und Wasser mit je 0.1 % TFA. Der Gradient begann bei 10 % Methanol und wurde linear auf 90 % Methanol angehoben, wobei der Fluss bei 3.8 mL/min lag. Die Zeit für den Gradienten variierte je nach Produkt und ist unten angegeben. Die Detektion erfolgte mittels UV/Vis-Detektor, wobei die Detektionswellenlänge für jedes Produkt unterschiedlich war.

Aflatoxin B2-Peptid:	Retentionszeit: 28 – 30 min (360 nm) Gradient: 10 % MeOH → 90 % MeOH in 49 min [M+Na] ⁺ : $m/z = 738.3$
Ochratoxin A-Peptid:	Retentionszeit: 15 – 16 min (220 nm) Gradient: 10 % MeOH → 90 % MeOH in 49 min [M+H] ⁺ : $m/z = 732.3$
Zearalenon-Peptid:	Retentionszeit: 29 – 30 min (274 nm) Gradient: 10 % MeOH → 90 % MeOH in 35 min [M+H] ⁺ : $m/z = 720.5$

2.2 Herstellung von Mykotoxin-Mikroarrays

Kennzeichnung der Glasobjektträger

In der rechten unteren Ecke der Glasobjektträger wurde mit einem Diamantstift eine fortlaufende Ziffer eingraviert. Die markierte Seite war stets die Unterseite und blieb unbeschichtet.

Vorreinigung

Die Glaträger wurden in einem Einsatz in eine Färbeschale gestellt und fünf Mal mit je 200 mL dest. Wasser gründlich gespült. Hierzu füllte man das Wasser in den Färbekasten und führte den Einsatz fünf Mal mit gleichmäßigen Bewegungen auf und ab. Anschließend wurden die Glaträger mit 200 mL Methanol gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

Anätzen der Glasoberfläche

Die Glaträger wurden in 200 mL einer methanolischen Salzsäure-Lsg. (1/1, v/v) gestellt und ½ Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Der Einsatz mit den Glaträgern wurde fünf Mal mit je 200 mL dest. Wasser gründlich gespült. Anschließend wurden die Glaträger in 200 mL

konzentrierte Schwefelsäure getaucht und auf dem Schüttler ½ h inkubiert. Der Einsatz mit den Glaträgern wurde erneut 5 Mal mit je 200 mL dest. Wasser gründlich gespült, im Stickstoffstrom getrocknet und visuell auf Schlieren kontrolliert.

Silanisierung mit GOPTS

Es wurden 600 µL GOPTS auf einen Glaträger gegeben und mit einem zweiten Glaträger als Sandwich verschlossen. Die Glaträger wurden bei RT 3 h inkubiert, anschließend vorsichtig getrennt und in eine Färbeschale mit 200 mL Ethanol gestellt. Nun wurden sie drei Mal mit je 200 mL Ethanol, Methanol und erneut Ethanol jeweils 15 min im Ultraschallbad gereinigt. Die Glaträger wurden im Stickstoffstrom getrocknet und anschließend 30 min bei 85 °C im Trockenschrank vollständig getrocknet und visuell auf Schlieren kontrolliert.

Kopplung des Diamino-PEG

10 g Diamino-PEG wurden in einem 25mL-Becherglas bei 98 °C in einem Trockenschrank geschmolzen. Es wurde 1 mL geschmolzenes Diamino-PEG auf einen Glaträger gegeben und mit einem zweiten Glaträger möglichst blasenfrei als Sandwich belegt. Sie wurden in Petrischalen 15 h bei 98 °C im Trockenschrank inkubiert.

Am darauf folgenden Tag wurden die Glaträger zügig getrennt und in Färbeschalen mit dest. Wasser gegeben und 15 min im Ultraschallbad gereinigt. Sie wurden 5 Mal mit je 200 mL dest. Wasser gründlich gespült und anschließend mit Stickstoff vollständig getrocknet und visuell auf Schlieren kontrolliert. Diamino-PEG beschichtete Glasobjektträger sind bei RT unter Vakuum bis zu 3 Monate lagerbar.

Kopplung des Diepoxy-PEG

Es wurden 600 µL Poly(ethylenglykol)-diglycidylether auf einen Glaträger gegeben und mit einem weiteren Chip als Sandwich verschlossen. Sie wurden 15 h bei 100 °C im Trockenschrank inkubiert. Anschließend wurden die Sandwiches getrennt und in einen Färbeschaleneinsatz mit 200 mL Methanol gegeben und zwei Mal 15 min im Ultraschallbad gereinigt, wobei das Lösungsmittel nach 15 min durch Neues ersetzt wurde. Zuletzt wurden die Glaträger im Stickstoffstrom getrocknet und visuell auf Schlieren kontrolliert. Die Epoxy-PEG beschichteten Glasobjektträger waren nicht lagerbar und wurden direkt zum Immobilisieren der Mykotoxine verwendet.

Immobilisierung der Mykotoxine

Die Immobilisierung der Mykotoxine erfolgte mittels Kontaktspotting. Hierzu wurde der Spotter BioOdyssey Calligrapher Miniarrayer und die Stahlnadel SNS 12 verwendet. Das Übertragungsvolumen der Nadel lag bei ca. 5.1 nL. 5 µL Aflatoxin B2-Peptid in Wasser

(10 mg/mL) wurden in 45 µL Spottingpuffer (siehe unten) gelöst. 1 µL Ochratoxin A in Acetonitril (5.5 mg/mL) wurde in 49 µL in Spottingpuffer gelöst. Als Negativkontrolle wurde ausschließlich Spottingpuffer verwendet. Als Positivkontrolle diente Dinitrotoluol (DNT). 25 µL DNT in Wasser (0.1 µg/mL) wurden in 25 µL Spottingpuffer gelöst. 25 µL jeder Lösung wurden in 384-well-Mikrotiterplatten überführt und in 5 Replikaten auf die Diepoxy-PEG-Glasträger gespottet. Die Glasträger wurden während dieses Vorganges auf 15 °C gekühlt und die Luftfeuchtigkeit der Spottingkammer wurde auf 50 % reduziert. Anschließend wurden die Glasträger bei RT 15 h inkubiert. Zur Deaktivierung der freien Epoxidfunktionen wurden die Glasträger zwei Mal 15 min in 3 M TRIS-HCl im Ultraschallbad behandelt. Die Glasträger wurden nun mit dest. Wasser gewaschen und im Stickstoffstrom vollständig getrocknet. Sie wurden unter Vakuum bei RT nicht länger als 6 Tage gelagert.

2.3 Qualitative und quantitative Bestimmung von Mykotoxinen am MCR 3

2.3.1 Probenvorbereitung und -extraktion

Zur Herstellung der Kalibrierstandards, wurden 25 g Hafermehl mit 5 g Natriumchlorid versetzt und mit 100 mL 80 % (v/v) Methanol in Wasser 3 min unter Eisbadkühlung mit dem Stabmixer *T25 basic* von IKA Labortechnik extrahiert. Anschließend wurde der Extrakt durch einen Faltenfilter filtriert und in einem gekühlten 100 mL-Schraubdeckelglas aufgefangen. Der Extrakt wurde eins zu vier mit PBS verdünnt, was zu einem endgültigen Methanolgehalt von 20 % führte. Dies entsprach einem Verdünnungsfaktor von 16. Die 80 %igen Extrakte wurden bei -20 °C gelagert und binnen 48 h verwendet. Für die Kalibrierlösungen wurden 20 %ige Extrakte mit 0, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 and 5 µg/L Aflatoxin B1 and Ochratoxin A aufgestockt.

Für die Bestimmung der Wiederfindungsraten wurden Weizen-, Roggen-, und Hafermehl mit Aflatoxinen und Ochratoxin A aufgestockt. Hierzu wurden die Mykotoxine zunächst in 1 mL Methanol gelöst und anschließend auf 5 g Matrix gegeben. Die Mehlprobe wurde vermengt und das Lösemittel über Nacht im Abzug verdampft. 5 g Probe wurden mit 1 g Natriumchlorid versetzt und mit 20 mL 80 % (v/v) Methanol/Wasser extrahiert. Die Extraktion und Filtration erfolgte wie oben beschrieben.

2.3.2 Chemilumineszenzmessungen am MCR 3

Verwendete Puffer (MCR 3)

Blocklösung und Laufpuffer (0.5 % Casein)

0.5 g Casein

PBS, ad 100 mL

Die Lösung auf 80 °C erhitzen, anschließend auf 25 °C abkühlen lassen und durch einen Faltenfilter filtrieren.

Regenerationslösung (pH 3.0)

Glycin, 7.51 g

Natriumchlorid, 5.85 g

SDS (0.1 %), 1.0 g

Dest. Wasser, ad 1000 mL

Mit 37 %iger Salzsäure wurde ein pH-Wert von 3 eingestellt.

Reinigungslösung

Tergazyme (2 %), 4.0 g

Dest. Wasser, ad 200 mL.

Die Lösung wurde vorsichtig auf ca. 50 °C erwärmt.

Spottingpuffer

690 µL Carbonatpuffer, pH 9.5 (1.59 g Na₂CO₃, 2.93 NaHCO₃, ad 1000 mL dest. H₂O)

300 µL DMSO

10 µL Glycerol

Spülpuffer

100 mL Methanol

400 mL PBS

TRIS-HCl-Lösung (pH 8.5)

TRIS (3 M), 363.4 g

Dest. Wasser, ad 1000 mL

Mit 37 %iger Salzsäure wurde ein pH-Wert von 8.5 eingestellt.

PBS (siehe Kap. 1.5)

Programmablauf für Chemilumineszenzmessungen

Der Programmablauf für die Chemilumineszenzmessungen am MCR 3 bestand aus 190 Einzelschritten. Daher werden hier nur die wesentlichen Schritte zusammenfassend dargestellt. Als Laufpuffer diente 0.5 % Casein in PBS. Die Pumpe P4 wurde für den Laufpuffer verwendet, die Pumpe P5 für den Regenerationspuffer und die Pumpe P3 für die Chemilumineszenzsubstrate und für die Wasch- und Spülpuffer. Die Primärantikörper wurden in Laufpuffer gegeben und mit Pumpe P1 aufgezogen. Die Verdünnungsfaktoren für die verwendeten Primärantikörper waren dabei wie folgt: 1/5000 für anti-Aflatoxin mAb, 1/10000 für anti-Ochratoxin A mAb und 1/22000 für anti-DNT mAb. Der HRP-markierte anti-Maus pAk wurde 1/1000 in Laufpuffer verdünnt und in Pumpe P0 gegeben.

Im ersten Schritt wurde 1 mL 0.5 % Casein bei einer Fließgeschwindigkeit von 500 $\mu\text{L/s}$ über den Chip geleitet, um diesen zu Blocken. Anschließend wurden 500 μL Probe und 500 μL Primärantikörperlösung bei einem Fluss von 60 $\mu\text{L/s}$ in die Probenschleife gepumpt. Die Probe/Antikörper-Mischung wurde mit 1 mL Laufpuffer bei einem Fluss von 100 $\mu\text{L/s}$ über den Chip geleitet. Anschließend wurde mit 2 mL Laufpuffer bei einer Flussrate von 500 $\mu\text{L/s}$ gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation mit Sekundärantikörper (200 μL bei einem Fluss von 100 $\mu\text{L/s}$ und 800 μL bei einem Fluss von 10 $\mu\text{L/s}$). Der Chip wurde erneut mit 2 mL Laufpuffer bei einer Flussrate von 500 $\mu\text{L/s}$ gewaschen und es wurden 400 μL Chemilumineszenzsubstrat bei einer Fließgeschwindigkeit von 150 $\mu\text{L/s}$ über den Chip geleitet. Der Fluss wurde gestoppt und es ein Bild mit einer CCD-Kamera bei einer Belichtungszeit von 30 s aufgenommen. Nach der Detektion folgte ein intensives Regenerations-, Wasch-, und Spülprogramm, das insgesamt 22.5 mL Regenerationslösungen benötigte. Dabei wurde zunächst mit Regenerationspuffer gespült, anschließend mit 20 % (v/v) Methanol in PBS und zuletzt mit PBS. Eine Messung dauerte 11 min, wobei die Hälfte der Zeit auf die Regeneration entfiel. Am Ende eines jeden Messtages wurde das Gerät mit Reinigungslösung und anschließend mit dest. Wasser gespült.

2.3.3 Auswertung mit SIP 0.4

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm *Spot Image Processor 0.4* (SIP 0.4). SIP 04 konnte die erzeugten „.txt“-Dateien direkt verwenden. Bevor das Programm Signale erkannte und integrierte, führte es eine Kontrolle auf Artefakte durch. Die verwendete Kamera zeigte aufgrund von elektronischen Fehlern Pixel mit bis zu zehnfach höheren Werten als die umliegenden Pixel an. Da eine Integration über ein solches Artefakt fehlerhafte, falsch positive Werte liefern würde, wurden alle Artefakte eliminiert. Das Programm erkannte

dabei alle Pixel, deren Signalintensität 10 % über den umliegenden acht Pixeln lag. Daraufhin bildete es den Mittelwert über die acht umliegenden Pixel und verwendete für die Integration diesen Mittelwert anstatt des Artefaktpixels.

Innerhalb des äußeren vorgegebenen Rahmens erkannte das Programm das gespottete Raster automatisch und markierte es mit grünen Rechtecken. Innerhalb dieser grünen Rechtecke suchte es nach dem Maximum und integrierte innerhalb des roten Rechtecks um das Spotmaximum. Die Größe aller Rechtecke konnte in einer Eingabedatei vorgegeben werden. Für die nachfolgenden Auswertungen wurde stets über 9 x 9 Pixel integriert und der Summenwert bzw. der Mittelwert aller Pixel pro Spot angegeben. Zuletzt führte das Programm eine Ausreißerkontrolle bzgl. der Lage der Integrationsrechtecke durch. Lagen die roten Rechtecke zu weit von dem gespotteten Raster entfernt, so wurden diese türkis markiert. Als neues Integrationsrechteck wurde dasjenige gewählt, welches auf den Ausgleichsgeraden durch alle anderen gefundenen Spots lag. Die Ausgabe der Summen- und Mittelwertsignale erfolgte als Matrix des gespotteten Musters in Excel. Durch Ausgabe von Bilddatei und Excel-Datei konnte eine visuelle Kontrolle der integrierten Daten erfolgen. Das Programm wurde stets auf Bilder angewendet, von denen kein Hintergrundbild subtrahiert wurde. Das Subtrahieren von Hintergrundbildern barg die Gefahr, dass an Stellen, an denen im Hintergrundbild Artefakte auftraten, zu hohe Werte von dem Messbild abgezogen wurden.

2.4 Synthese von Hapten-Protein-Konjugaten

Die Synthese der Hapten-Protein-Konjugate erfolgte über die Aktivierung der Carbonsäure des Haptens als NHS-Ester und anschließender Kopplung ans Protein über freie Aminogruppen des Proteins. Hierzu wurden 200 µL N-Hydroxysuccinimid (NHS, 0.29 M) und 250 µL N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC, 0.19 M) zur jeweiligen Hapten-Buttersäure-Lösung (12.9 mM) in trockenem Dioxan in einem 25 mL-Kolben gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss bei 100 rpm 20 Stunden lang geschüttelt. Das Nebenprodukt N,N'-Dicyclohexylharnstoff (farblose Kristalle) kristallisiert dabei aus. Die Lösung (gelb bis braun gefärbt) wurde bei 4000 rpm 2 min abzentrifugiert und 2.05 mL des Überstands wurden zu 4.66 mL BSA in Kopplungspuffer (0.13 mM) gegeben. Für die HRP-Konjugate wurden 1.54 mL Überstand zu 3.50 mL HRP in Kopplungspuffer (0.13 mM) gegeben, wobei sich die klare Lösung rasch trübte. Die Zugabe erfolgte unter Kühlung des Reaktionsgefäßes mit Eis. Anschließend wurde die Suspension 2 h bei Raumtemperatur und 100 rpm geschüttelt. Die Hapten-Protein-Konjugate wurden mittels Größenausschlusschromatographie gereinigt. Hierbei wurde PBS als mobile Phase verwendet.

Die Fraktionen wurden in einer 96-well-Mikrotiterplatte (niedrige Bindungskapazität) gesammelt und das Produkt wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm und 350 nm identifiziert. Für eine längerfristige Lagerung wurde das Produkt lyophilisiert und bei -20 °C aufbewahrt. Die Konjugate zeigten über zwei Jahre hinweg keinen Aktivitätsverlust durch die Gefriertrocknung and Lagerung. Vor ihrer Verwendung wurden die BSA-Konjugate in 0.1 % Natriumazid resuspendiert und die HRP-Konjugate lediglich in Wasser. Die Zugabe von Natriumazid erhöht die Haltbarkeit der BSA-Konjugate, ist aber bei HRP nicht möglich, da das Protein durch Natriumazid inhibiert wird.

Die Kopplungsdichte wurde über MALDI-TOF-MS bestimmt. Hierzu wurde die durch Größenausschlusschromatographie erhaltene Produktfraktion nach einem Entsalzungsschritt mit C₄-Säulen (ZipTip) verwendet. Es wurden 25 µL Probe (5 - 10 mg/mL) zehn Mal mit ZipTips aufgezogen, anschließend zwei Mal mit Wasser (0.1 % TFA) gewaschen und zuletzt mit 1.5 µL Matrix (gesättigte Zimtsäure, 0.1 % TFA) eluiert. Die Konjugate wurden mit der Matrix auf ein Aluminium-Target gegeben und bei Raumtemperatur getrocknet. Als Referenz wurden BSA und HRP (je 10 mg/mL) in PBS verwendet.

2.5 Immunisierungsprotokoll zur Herstellung monoklonaler Antikörper

Acht 10 Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse wurden mit 75 µg einer B[a]P-BSA Mischung in 200 µL Kochsalzlösung (154 mM) und 300 µL komplettem Freund'schen Adjuvans immunisiert. Bei der Mischung handelte es sich um 6-, 7-, und 10-B[a]P-BSA, die auch schon zur vorangegangenen Immunisierung verwendet wurde (Matschulat, 2005). Die Kopplungsdichte wurde damals mittels MALDI auf 26 Moleküle Benzo[a]pyren pro Molekül BSA bestimmt. Die Immunisierungen wurden nach 5 und 7 Wochen mit je 75 µg B[a]P-BSA Mischung in unvollständigem Freund'schen Adjuvans wiederholt. Jeweils 4 Tage bzw. 1 Tag vor der Fusionierung wurden die Mäuse mit 30 µg B[a]P-BSA Mischung in 200 µL Kochsalzlösung (154 mM) hyperimmunisiert. Für die Fusionierung wurden 10⁸ Milzzellen der immunisierten Mäuse mit 5x10⁷ Zellen der Krebszelllinie P3X63Ag8.653 und Polyethylenglykol 1500 vermengt. Die fusionierten Zellen wurden 3 Wochen lang in einem RPMI-basierten HAT-Selektionsmedium (mit 400 µM Aminopterin, 100 µM Hypoxantin und 16 µM Thymidin) inkubiert und anschließend eine Woche in einem HAT-Medium kultiviert. Zuletzt ließ man die Zellen in RPMI 1640 Medium mit Rinderinsulin (5 mg/L), 10 % fötalem Kälberserum, Gentamicin (80 mg/L), Glucose (2.5 g/L), HEPES (4.77 g/L), L-Glutamin (2 mM), 2-Mercaptoethanol (1 mM), Natriumpyruvat (50 mg/L) und Bernsteinsäure (65 mg/L) wachsen. In einem Vortest wurden 113 Klone von etwa 1500 Klonen in einem indirekten

nichtkompetitivem ELISA ausgewählt. In diesem Vorscreening am Institut für Physiologische Chemie wurde eine Zellkulturüberstandsverdünnung von 1:10 verwendet. Dies ließ zwar eine hohe Anzahl von falsch positiven Klonen vermuten, es konnte dadurch jedoch vermieden werden, dass positive Klone übersehen wurden.

2.6 Indirekt nichtkompetitiver ELISA (Screening)

Beschichtung: Die Mikrotiterplatten wurden je Kavität mit 200 µL Hapten-Protein-Konjugat in Coatingpuffer bei 4 °C über Nacht beschichtet. Das gesamte Screening wurde mit einer Konjugatverdünnung von 1:5000 durchgeführt. Anschließend wurden sie drei Mal mit 300 µL pro Kavität automatisch mit PBST gewaschen.

Blocken: Mit 300 µL einer 1 %igen Caseinlösung pro Kavität wurden die Platten 1 Stunde lang bei Raumtemperatur und 300 rpm geblockt. Anschließend wurde erneut gewaschen.

Primärantikörper: 200 µL einer mit PBS verdünnten Lösung der Zellkulturüberstände (1:100 Verdünnung) wurde in 3 Replikaten in die Mikrotiterplatte gegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 100 rpm und Raumtemperatur wurde erneut automatisch gewaschen.

Sekundärantikörper: Pro Kavität wurden 200 µL einer Lösung mit PBS verdünntem HRP-gekoppeltem anti-Maus Antikörper (1:5000) zugegeben. Nach erneuter einstündiger Inkubation bei 100 rpm und Raumtemperatur wurde drei Mal automatisch gewaschen.

Farbreaktion: Es wurden pro Kavität 200 µL Substratpuffer zugegeben. Die entstehende blaue Färbung wurde per Auge überwacht und je nach Klon zwischen wenigen min und 45 min abgestoppt. Als Stopplösung wurden 100 µL 5 %ige Schwefelsäure verwendet. Anschließend wurde die Absorption bei 450 nm gemessen.

2.7 Direkt nichtkompetitiver ELISA (Screening)

Beschichtung: Die Mikrotiterplatten wurden je Kavität mit 200 µL Ziege anti-Maus (1:5000) bei 4 °C über Nacht vorbeschichtet. Anschließend wurden sie drei Mal mit 300 µL pro Kavität per Hand mit PBST gewaschen. Es stellte sich heraus, dass das automatische Waschen zu hohen Hintergrundsignalen führte. Dies lag vermutlich an der Beschädigung der Mikrotiterplatte durch den Waschautomaten.

Blocken: Siehe indirekt nichtkompetitiver ELISA (Kapitel V.2.6).

Primärantikörper: 200 µL einer mit PBS verdünnten Lösung der Zellkulturüberstände (1:10 Verdünnung) wurde in 3 Replikaten in die Mikrotiterplatte gegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 100 rpm und Raumtemperatur wurde erneut per Hand gewaschen.

Sekundärantikörper: Siehe indirekt nichtkompetitiver ELISA (Kapitel V.2.6).

Farbreaktion: Siehe indirekt nichtkompetitiver ELISA (Kapitel V.2.6).

2.8 Indirekt kompetitiver ELISA

Beschichtung: Siehe indirekt nichtkompetitiver ELISA (Kapitel V.2.6). Die Hapten-Protein-Konjugat-Verdünnung variierte von Experiment zu Experiment.

Blocken: Siehe indirekt nichtkompetitiver ELISA (Kapitel V.2.6).

Kompetition: Für die Kompetition wurden 100 µL Kalibrierlösung pro Kavität in die Mikrotiterplatte gegeben. 100 µL einer mit PBS verdünnten Lösung der Zellkulturüberstände oder Antikörperstammlösung wurden zugegeben und es wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur und 100 rpm geschüttelt. Der Verdünnungsfaktor für die Zellkulturüberstände bzw. Antikörperstammlösungen ist in Kapitel III für jede Anwendung angegeben. Nach einstündiger Inkubation wurde erneut automatisch gewaschen.

Für die Kalibrierung wurde Benzo[a]pyren aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit in 10 % Methanol/Wasser hergestellt. Für die Standardkurven wurde entionisiertes Wasser verwendet.

Die Kalibrierung von Aflatoxinen und Ochratoxin A erfolgte in Hafermatrix. Als Extraktionslösung wurde 80 % Methanol/Wasser verwendet. Diese wurde vor der Messung auf 20 % Methanol mit PBS verdünnt.

Sekundärantikörper: Siehe indirekt nichtkompetitiver ELISA (Kapitel V.2.6).

Farbreaktion: Siehe indirekt nichtkompetitiver ELISA (Kapitel V.2.6).

2.9 Kreuzreaktivitätstests

Im Falle der monoklonalen Antikörper gegen Benzo[a]pyren wurde die Kreuzreaktivität gegenüber allen 16 EPA PAKs bestimmt. Bei den rekombinanten Antikörpern wurde die Kreuzreaktivitätsbestimmung auf folgende Analyten beschränkt: Fluoranthen, Pyren, Benzo[a]anthracen, Chrysen, Benzo[b]fluoranthen und Benzo[k]fluoranthen. Für die Kreuzreaktivitätstests wurde der indirekt kompetitive ELISA verwendet (siehe Kapitel V.2.8). Die Mikrotiterplatten wurden mit 10-B[a]P-BSA beschichtet und für die Kompetition wurde eines der 16 EPA PAKs verwendet. Die EPA PAKs wurden dazu ebenfalls in 10 % Methanol/Wasser verdünnt und in äquimolarer Menge zu Benzo[a]pyren verwendet. Der erhaltene IC₅₀-Wert für die EPA PAKs wurde durch den IC₅₀-Wert für Benzo[a]pyren dividiert und in Prozent angegeben.

Im Falle der Kreuzreaktivitätsbestimmung von anti-Aflatoxin- bzw. Ochratoxin A-Antikörpern wurden als Antigene Aflatoxin B1, B2, G1, G2 und Ochratoxin A in Lösung verwendet. Für die Kreuzreaktivitätsbestimmung des anti-Aflatoxin-Antikörpers wurde die Platte mit Aflatoxin B1-BSA beschichtet und für die Kreuzreaktivitätsbestimmung des anti-Ochratoxin A-Antikörpers mit Ochratoxin A-BSA. Die Berechnung der Kreuzreaktivität erfolgte ebenfalls durch Division der IC_{50} -Werte.

2.10 Mikroarray basiertes Zellkulturüberstandsscreening

Herstellung der Mikroarraychips für das Screening

Die Amino-Polyethylenglycol(Amino-PEG)-Chips (26 mm x 76 mm x 1 mm) wurden wie in Kapitel V.2.2 beschrieben hergestellt. Die Aktivierung mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) erfolgte nach bewährter Methode (Wolter, 2007; Wolter, 2008). Auf einen Diamino-PEG Chip wurden 600 μ L einer DSC-DMAP-Lösung (150 mg DSC, 5 mg DMAP, 190 μ L Triethylamin und 2.4 mL DMF) gegeben und der Chip wurde mit einem zweiten Diamino-PEG-Chip abgedeckt. Nach einer Inkubation über Nacht wurden die Chips in Methanol getrennt und zwei Mal 6 min lang im Ultraschallbad in Methanol gewaschen. Nach dem Trocknen im Stickstoffstrom wurden auf jeden NHS-aktivierten Glaschip 75 μ L (4.3 mg/mL) Ziege-anti-Maus-Antikörper gegeben und mit einem kleineren, nicht aktivierten Glaschip (24 mm x 50 mm) abgedeckt, um ein Austrocknen der Chips zu verhindern. Die Chips wurden in Petrischalen bei Raumtemperatur 4 h inkubiert. In jede Petrischale wurden pro Chip 50 μ L Wasser gegeben, um die Luftfeuchtigkeit konstant hoch zu halten. Anschließend wurden die Chips in entionisiertem Wasser getrennt und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Zellkulturüberstände wurden unverdünnt mit der Stahlnadel SNS 12 (Übertragungsvolumen 5.1 nL) in je 2 Replikaten auf den Chip gespottet. Die Zellkulturüberstände wurden einmal überspottet. Insgesamt wurde ein Muster von 6 x 16 gespottet, wobei die erste und letzte der 16 Reihen ausschließlich aus der Positivkontrolle 22F12 (500 μ g/mL) bestand. Die vorletzte Reihe bestand ausschließlich aus der Negativkontrolle, für die PBS gespottet wurde. Nach dem Spotten wurden die Chips erneut in Petrischalen mit 50 μ L entionisiertem Wasser je Chip über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Nach dieser Inkubation wurden die Mikroarray-Chips 4 Stunden lang bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln in 2 % Casein in PBS geblockt. Vor dem Verkleben der Chips mit dem Plastikträger wurden sie mit entionisiertem Wasser gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

Messungen am MCR 3 (Screening)

Die Auslesung des Mikroarraychips erfolgte auf dem MCR 3. Es ist zu erwähnen, dass nur die Pumpe P0 (Benzo[a]pyren-HRP-Konjugat), Pumpe P3 (Chemilumineszenzsubstrat) und die Pumpe P4 (0.5 % Casein) notwendig waren, um das sehr einfache Spülprogramm zu realisieren. Im ersten Schritt wurde der Chip mit 2000 μL 0.5 % Casein in PBS bei einem Fluss von 200 $\mu\text{L}/\text{s}$ geblockt. Als Antigen dienten 200 μL 10-B[a]P-HRP (1:1000 Verdünnung), die zunächst mit einem Fluss von 100 $\mu\text{L}/\text{s}$ über den Chip gespült wurden. Anschließend wurden 600 μL 10-B[a]P-HRP (dilution 1:1000) bei einer Flussrate von 5 $\mu\text{L}/\text{s}$ gespült. Nach einem Waschschrift mit 2000 μL 0.5 % Casein in PBS bei einem Fluss von 200 $\mu\text{L}/\text{s}$, wurden 400 μL Chemilumineszenzsubstrat (1:1) mit einer Flussrate von 150 $\mu\text{L}/\text{s}$ über den Chip geleitet. Nun wurde mit der CCD-Kamera 60 Sekunden lang ein Bild aufgenommen. Zuletzt wurden Schläuche und Chip mit 2000 μL 0.5 % Casein gespült, um eine Kontamination des nachfolgenden Chips zu vermeiden.

Die generierten Text-Dateien wurden mit der Software Spot Image Processor 0.4 (SIP 0.4, Karsunke Softwarebüro, Wolnzach, Germany) ausgewertet. Eine detailliertere Beschreibung der Auswertesoftware ist in Kapitel V.2.3.3 zu finden. Für die Auswertung der Screening-Chips wurden 5 x 5 Pixel um jedes Spotmaximum integriert. Dies entsprach einer realen Fläche von 0.04 mm^2 auf der Chipoberfläche.

2.11 Oberflächenplasmonenresonanzmessungen

Alle SPR-Messungen wurden im indirekten ELISA-Format mit dem Sensorchip CM 5 durchgeführt. Es wurde, wenn nichts anderes erwähnt, stets bei 25 °C und einer Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ gemessen. Als Laufpuffer diente HBS EP+ (pH 7.4).

Immobilisierung von Benzo[a]pyren

Die Oberfläche des CM 5 Chips wurde 7 min mit einer frisch hergestellten 1:1-Mischung aus 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (0.4 M) und N-Hydroxysuccinimid (0.1 M) aktiviert. Anschließend wurde eine 0.01 mg/mL B[a]P-Peptidlösung in Natriumacetatpuffer (10 mM, pH 5) so lange über den Chip geleitet, bis der gewünschte Bindungslevel erreicht wurde. Eine Spülzeit von einer min entsprach ungefähr 250 *refractive units* (RU). Zuletzt wurde der Sensorchip mit 10 M Ethanolamin 7 min deaktiviert. Die Referenzflusszelle wurde wie die Messzelle aktiviert und deaktiviert, ohne jedoch B[a]P-Peptid darüber zu leiten. Die Chips wurden bei 4 °C in EBS HP+ Puffer gelagert.

Bestimmung der Affinitätskonstanten

Zur Bestimmung der Affinitätskonstanten wurden je Antikörper drei Konzentrationen gemessen. Diese sind in Tabelle 32 aufgeführt.

Tabelle 32: Verwendete Antikörperkonzentrationen für die Bestimmung der Affinitätskonstanten.

Klon	Konzentrationen [$\mu\text{g/mL}$]
BaP 219-3B5	5, 10, 50
BaP 222-4F11	5, 10, 50
BaP 222-5E11	5, 10, 50
BaP 222-5G1	1, 5, 10
BaP 222-10E9	1, 5, 10
BaP 222-10F8	5, 10, 50
BaP 14-22F12	5, 10, 50

Die Antikörperverdünnungsreihen wurden mit dem Laufpuffer HBS EP+ hergestellt. Auf eine Bindungsphase (Assoziation) von 4 min folgte eine Dissoziationsphase von 15 min. Anschließend wurde der Chip mit 50 mM Natriumhydroxidlösung (5 % Acetonitril) 2 min regeneriert. Zuletzt folgte eine Stabilisierungsphase von 3 min mit HBS EP+.

2.12 Entwicklung eines Fluoreszenzpolarisationsimmunoassays (FPIA)

Für den FPIA wird neben dem Antikörper ein Hapten-Fluorescein-Konjugat benötigt. Die Synthese von 10-B[a]P-Fluorescein (10-B[a]P-FITC) erfolgte nach Goryacheva et al. mit Modifikationen (Goryacheva, 2007). Anschließend wurde der FPIA hinsichtlich der 10-B[a]P-FITC-Konzentration und der Antikörperkonzentration optimiert.

Synthese von 10-B[a]P-FITC

In einem 25 mL-Spitzkolben wurden 11.7 mg Fluoresceinisothiocyanat (FITC, 30 μmol , 1 Äq.) in 1 mL Methanol (1 % Triethylamin) gelöst. Anschließend wurden 20.0 mg (150 μmol , 5 Äq.) Ethylendiamin Dihydrochlorid in 5 mL Methanol (1 % Triethylamin) zugegeben. Es wurden 500 μL Diethylether zugegen und die Lösung wurde über Nacht bei RT und 100 rpm geschüttelt. Es fiel ein roter Feststoff aus, der an der Glaswand haftete. Dieser wurde drei Mal mit je 3 mL Methanol gewaschen und anschließend über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 14 mg roten Feststoff (Ausbeute: 93 %).

Optimierter Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay

Eine schwarze 96-well-Platte (*low binding*) wurde 1 h bei RT mit 1 % Casein in PBS geblockt. Anschließend wurde sie ein Mal per Hand mit 300 μL /well mit PBS gewaschen. Es wurden 40 μL /well B[a]P-Standard und 40 μL /well 22F12 in PBS (1/500-Verdünnung) zugegeben und 1 h bei RT bei 100 rpm inkubiert. Daraufhin wurden 20 μL /well 10 $\mu\text{g/L}$ 10-B[a]P-FITC zugegeben und 5 min bei 100 rpm inkubiert. Die Auslesung erfolgte am Fusion α -FP (Perkin Elmer, *well readout time*: 1 s, *number of times to read each well*: 1, *intensity*: 15, *number of flashes*: 80, *high voltage* 1100, *gain settings* 4.5, *excitation filter*: 485 nm, *emission filter*: 535 nm).

3 Mikrobiologische und molekularbiologische Techniken

3.1 Reagenzien, Materialien und Geräte für das mikrobiologische Arbeiten

Reagenzien und Materialien

Agarose (AGA001.100, Bioshop, Burlington, ON, Kanada)

Antarktische Phosphatase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)

Ammoniumpersulfat (APS, 161-0700, BIO-RAD, Hercules, CA, USA)

Carbenicillin, Natriumsalz (C3416, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Casein (C0376, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Dithiothreitol (DTT, DTT001, Bioshop, Burlington, ON, Kanada)

DNaseI (10104159001, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)

E. coli TG1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

E. coli HB2151 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

Ethylendiamintetraacetat (EDTA, E4884, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

EZ-Vision two, 6x (N650-1ML, Amresco, Solon, OH, USA)

Gene Pulser Cuvette 0.2 cm electrode (165-2086, BIO-RAD, Hercules, CA, USA)

GeneRuler 1kb DNA Ladder (SM0311, Fermentas, Kanada)

Glycerin (G33-4, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)

High DNA Mass Ladder (10068-013, Invitrogen, Burlington, ON, Kanada)

HisTrap HP (17-5248-01, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)

Innoculation loop, 1 µL, blue (11-2014, Simport, Beloit, QC, Kanada)

Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG, 15529-019, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

LB Broth, Lennox (BP1427-2, Fisher Bioreagents, Pittsburgh, PA, USA)

Low DNA Mass Ladder (10068-013, Invitrogen, Burlington, ON, Kanada)

Lysozym (10837059001, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)

Magermilchpulver (232100, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)

MgCl₂ für PCR, 25 mM (Fermentas, Kanada)

Natriumacetat (S7670, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Natriumchlorid (S271-3, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)

Natriumdodecylsulfat (SDS001.100, Bioshop, Burlington, ON, Kanada)

Pfu DNA Polymerase (EP0501, Fermentas, Kanada)

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (P-2069, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Phosphatase, alkaline (AP) (10 713 023 001, Roche, Indianapolis, IN, USA)

Pipette 25 mL, steril (94024, TPP, Schweiz)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 93482, Fluka, Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz)
Protein-Free (TBS) Blocking Buffer (37570, Thermo Scientific, Ottawa, Ontario, Kanada)
QIAprep Spin Mini Kit (250) (27106, Qiagen, Mississauga, Ontario, Kanada)
QIAquick Gel Extraction Kit (250) (28706, Qiagen, Mississauga, Ontario, Kanada)
QIAshredder (50) (79654, Qiagen, Mississauga, Ontario, Kanada)
RNeasy Mini Kit (50) (74104, Qiagen, Mississauga, Ontario, Kanada)
Saccharose (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)
SOB-Medium (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)
1-Step™ NBT/BCIP (34042, Thermo Scientific, Ottawa, Ontario, Kanada)
1-Step™ Turbo TMB-ELISA (34022, Thermo Scientific, Ottawa, Ontario, Kanada)
Super Script First-Strand Synthesis System for RT-PCR (11904-018, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
T4-DNA-Ligase (10 481 220 001, Roche, Indianapolis, IN, USA)
Taq DNA Polymerase für PCR (EP0402, Fermentas, Kanada)
Taq Puffer für PCR, 10x (Fermentas, Kanada)
Tetramethylethylendiamin (TEMED, 161-0800, BIO-RAD, Hercules, CA, USA)
TOPO TA Cloning® (Invitrogen, Burlington, ON, Kanada)
Tris Base (BP152-1, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)
2YT-Medium (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)

Antikörper

Monoklonaler Antikörper gegen Hexa-His konjugiert mit alkalischer Phosphatase (ab49746, abcam, Cambridge, MA, USA)
Monoklonaler Antikörper gegen Hexa-His konjugiert mit Peroxidase (A7058, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Monoklonaler Antikörper gegen Penta-His aus Maus (34660, QIAGEN, Hilden)
Ziege Anti-Maus Antikörper konjugiert mit Peroxidase (31437, Thermo Scientific, Pittsburgh, PA, USA)

Restriktionsenzyme

NcoI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
NotI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
Sall (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)

SfiI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)

SwaI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)

XhoI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)

RNase-freie Materialien

Microcentrifuge Tube 1.7 mL (3620, Corning Incorporated, Corning, NY, USA)

0.2 – 10 µL Microvolume Filter Tips (4807, Corning Incorporated, Corning, NY, USA)

1 – 30 µL Microvolume Filter Tips (4821, Corning Incorporated, Corning, NY, USA)

100 – 1000 µL Microvolume Filter Tips (4809, Corning Incorporated, Corning, NY, USA)

RNase AWAY (Molecular BioProducts Inc., San Diego, CA, USA)

RNasen sind im Labor allgegenwärtig. Sie werden von Mikroorganismen ausgeschieden und befinden sich selbst in menschlichem Schweiß. Einfaches Hitzeinaktivieren oder Autoklavieren reicht jedoch nicht aus, um RNasen zu deaktivieren. Alle RNase-freien Materialien wurden vor der Verwendung zusätzlich 20 min bei 121 °C autoklaviert. Der verwendete Abzug wurde gründlich mit RNase AWAY gereinigt und es wurden Pipetten verwendet, die ausschließlich für das Arbeiten mit RNA eingesetzt wurden. RNase-freies Wasser wurde durch Behandlung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) hergestellt. Dazu wurde dest. Wasser mit 1/200 (m/v) DEPC versetzt und über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Wasser 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Geräte

Elektropolarisation: Gene Pulser Xcell (BIO-RAD, Hercules, CA, USA)

FPLC: ÄKTA FPLC Amersham Pharmacia Biotech, P-920, UPC-900 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)

Gelaufnahmen: Universal Hood II (BIO-RAD, Hercules, CA, USA)

Gelelektrophorese: BIO-RAD POWER PAC 300 (BIO-RAD, Hercules, CA, USA)

Ultraschall: Sonic Dismembrator Model 100 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)

UV/Vis Spektrophotometer Ultrospec 3100 pro (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)

Zentrifugen: IEC Micromax (International Equipment Comp., Needham Heights, MA, USA),
IEC Micro CL 16 (Thermo Electron. Corp., Ottawa, Ontario, Kanada)

Lösungen

Coomassie-Brilliantblau 2x (für SDS-PAGE):

60 mL Coomassie-Blau (stock)

500 mL Methanol

400 mL dest. Wasser

100 mL Essigsäure

Entfärbungslösung (für SDS-PAGE):

50 mL Essigsäure

100 mL Methanol

350 mL dest. Wasser

IMAC A (für HisTrap):

10 mM HEPES

0.5 M NaCl

10 mM Imidazol

ad 1000 mL dest. Wasser (mit 37 % HCl auf pH 7.4 einstellen)

IMAC B (für HisTrap):

10 mM HEPES

0.5 M NaCl

0.5 M Imidazol

ad 1000 mL dest. Wasser (mit 37 % HCl auf pH 7.4 einstellen)

Lyse-Puffer (für scFv-Extraktion):

50 mM TRIS-HCl

25 mM NaCl

2 mM EDTA

pH 8.0

SDS-PAGE (12 %, 40 mL):

16.0 mL 30 % Acrylamid Mix
10.0 mL 1.5 M TRIS (pH 8.8)
400 µL 10 % SDS
400 µL 10 % APS
16 µL TEMED
13.2 mL dest. Wasser

SDS-PAGE (5 %, stacking gel, 15 mL):

10.2 mL dest. Wasser
2.53 mL 30 % Acrylamid Mix
1.88 mL 0.5 M TRIS (pH 6.8)
150 µL 10 % SDS
150 µL 10 % APS
15 µL TEMED

SDS-PAGE 5x Laufpuffer:

15.1 g TRIS
72.0 g Glycin
5.0 g SDS
ad 1000 mL dest. Wasser

50x TAE-Puffer:

242 g TRIS
100 mL 0.5 M Na₂EDTA (pH 8.0)
57.1 mL Essigsäure
ad 1000 mL dest. Wasser

TES-Puffer:

100 mL 1 M TRIS-HCl (pH 8.0)
100 g Saccharose
500 µL 0.5 M EDTA
ad 500 mL dest. Wasser

Transferpuffer (Western-Blot):

3.03 g TRIS

14.42 Glycin

40 mL Methanol

ad 1000 mL dest. Wasser

3.2 Methoden für das mikrobiologische Arbeiten

3.2.1 Allgemeine Methoden

Agarplatten

10 g LB Broth, Lennox Medium wurden in 500 mL dest. Wasser gelöst. Zum vollständigen Lösen wurde das Medium leicht erhitzt und dann bei 121 °C 15 min autoklaviert. Die Lösung wurde anschließend in einem Wasserbad auf 50 °C abkühlt und unter Rühren mit 20 mL Glucose (1.25 M) versetzt. Es wurden 500 µL Carbenicillin (50 mg/mL) zugegeben und 2 min gerührt. Anschließend wurden 20 mL der Lösung in eine Platte gefüllt. Nach dem Erstarren der Lösung wurden die Platten max. 1 Woche bei 4 °C gelagert.

Gelelektrophorese für DNA

Für die Gelelektrophorese wurde 1 % Agarose in TAE-Puffer verwendet. Die Suspension wurde bis zum Sieden erhitzt und bei einer Temperatur von ca. 50 °C in die Formen gegossen. Je nach Experiment wurden 1 - 4 µL PCR-Produkt mit 4 µL EZ-Vision two (6x) versetzt und auf 24 µL mit dest. Wasser aufgefüllt. In jede Kavität auf dem Gel wurden 20 µL Probe pipettiert. Für die Gelelektrophorese wurde TAE-Puffer verwendet. Es wurde 30 min lang eine Spannung von 80 - 100 V angelegt. Um die Banden sichtbar zu machen, wurden die Gele unter UV-Licht photographiert.

Gelelektrophorese für Proteine (SDS-PAGE)

Die Gelkammer wurde mit 7 mL SDS-PAGE (12 %) gefüllt und mit Ethanol überschichtet. Nach dem Erstarren wurden 3 mL SDS-PAGE (5 %) darauf gegeben und ausgehärtet. 5 µL Probe wurden mit 15 µL PBS und 5 µL Dye versetzt. Bevor die Probe auf das Gel geladen wurde, wurde diese 2 min im Wasserbad auf 100 °C erhitzt. Es wurde 30 min eine Spannung von 100 V und anschließend eine Spannung von 160 V angelegt, bis die Farbfront an das Gelende gelaufen war (ca. 60 min). Anschließend erfolgte eine Färbung mit 20 mL

Coomassie-Brilliantblau 2x (ca. 30 min). Die Entfärbung erfolgte durch Zugabe von 15 mL Entfärbelösung über Nacht. Anschließend wurde das Gel mit deionisiertem Wasser gewaschen und auf einem handelsüblichen Scanner eingescannt.

Western Blot

Das SDS-PAGE-Gel wurde auf eine in Methanol getränkte Nitrocellulosemembran überführt. Dazu wurde das Gel auf die Membran gespannt und in Transferpuffer gegeben. Anschließend wurde über 60 min bei 4 °C eine Spannung von 100 V angelegt. Die Membran wurde daraufhin in 3 % Milch (aus Milchpulver) über Nacht bei RT geblockt. Anschließend wurde die Membran drei Mal je 10 min mit 20 mL PBST-Puffer (siehe Kapitel V.1.5) gewaschen und 60 min mit 10 mL einer 1/2000-Verdünnung von anti-6x His (konjugiert mit alkalischer Phosphatase) in PBST-Puffer inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die Membran mit 15 mL 1-StepTM NBT/BCIP ca. 1 min angefärbt. Die Farbreaktion wurde durch Waschen mit deionisiertem Wasser gestoppt, die Membran bei RT getrocknet und mit einem handelsüblichen Scanner eingescannt.

Quantifizierung der DNA mittels UV/Vis-Spektrometrie

Die Probe wurde 1/20 in dest. Wasser verdünnt und 100 µL werden in eine Quarzglasküvette überführt. Die optische Dichte wurde bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Reine DNA weist ein Verhältnis 260/280 von 1.8 auf. Ist das Verhältnis 260/280 größer als 1.8, deutet dies auf eine Kontamination durch RNA hin. Ist das Verhältnis geringer, liegt eine Proteinkontamination vor. Die DNA-Konzentration wurde vom Spektrophotometer direkt ausgegeben.

Quantifizierung der DNA mittels Gelelektrophorese

Die Quantifizierung von DNA mittels Gelelektrophorese hat den Vorteil, dass Fremd-DNA nicht mit quantifiziert wird, da nur einzelne Banden integriert werden. Als Standard wurden 4 µL DNA Mass Ladder (Low oder High, Invitrogen) und 1 µL EZ-Vision two (6x) verwendet. 1 bis 3 µL der aufgereinigten DNA-Proben wurden mit 1 µL EZ-Vision two (6x) versetzt und mit dest. Wasser auf ein Gesamtvolumen von 5 µL gebracht. Jede Kavität auf dem 1 % Agarosegel wurde mit 5 µL Probe befüllt. Es wurde 30 min lang eine Spannung von 100 V angelegt. Um die Banden sichtbar zu machen, wurden die Gele unter UV-Licht photographiert. Zur Quantifizierung wurde die Software Quantity One 4.6.9 (BIO-RAD) verwendet.

3.2.2 Herstellung der cDNA aus Hybridomzellsedimenten

Zur Isolierung der mRNA aus den Hybridomzellsedimenten wurde das *RNeasy Mini Kit (50)* und *QIAshredder (50)* nach Herstellerangaben mit Modifikationen verwendet. Zu einem Sediment aus 5×10^6 Hybridomzellen wurden 600 μL RLT-Puffer gegeben und gevortext. Um die Suspension zu homogenisieren, wurde sie auf die Spin-Säule *QIAshredder* gegeben und 2 min bei 17000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde auf die Spin-Säule aus dem *RNeasy Mini Kit* überführt und nach Herstellerangaben gereinigt. Zur Elution wurden 50 μL RNase-freies Wasser verwendet.

Die cDNA-Synthese erfolgte mittels *Super Script First Strand Kit* (Invitrogen). 5 μL der gereinigten RNA, 1 μL 10 mM dNTP, 1 μL oligo(dT) Primer und 3 μL RNase freies Wasser wurden 5 min bei 65 °C inkubiert und daraufhin 1 min auf 4 °C gekühlt. Anschließend wurden 2 μL 10x RT Puffer, 2 μL 25 mM MgCl_2 , 2 μL 0.1 M DTT und 1 μL RNase OUT zugegeben und 2 min bei 42 °C inkubiert. Es wurde 1 μL reverse Transkriptase zugegeben, 50 min bei 37 °C und 15 min bei 70 °C inkubiert. Nun wurde 1 μL RNase H zugesetzt und 20 min bei 37 °C inkubiert.

3.2.3 PCR zur Amplifizierung der V_H und V_L

5 μL PCR Puffer (10x), 4 μL 25 mM MgCl_2 , 1 μL dNTP-Mix, 1 μL *forward*-Primermix **oder** 2 μL *backward*-Primermix, 0.25 μL Taq DNA Polymerase, 35 μL dest. Wasser und 2 μL der synthetisierten cDNA wurden in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben. Die PCR erfolgte in zwei Phasen:

Phase 1: 1. Vorinkubation: 3 min bei 92 °C; 2. Amplifizierung (5 Zyklen): 30 s bei 92 °C (Denaturierung), 1 min bei 55 °C (Primerhybridisierung), 1 min bei 72 °C (Elongation).

Phase 2: 1. Amplifizierung (30 Zyklen): 30 s bei 92 °C (Denaturierung), 1 min bei 63 °C (Primerhybridisierung), 1 min bei 72 °C (Elongation); 3. Nachinkubation: 5 min bei 72 °C.

5 μL PCR-Produkt wurden mittels 1 % Agarosegel überprüft. Eine einzelne Bande bei ca. 350 bp deutete auf ein positives Ergebnis hin. Die DNA-Proben wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert. Die verwendeten Primer sind nachfolgend aufgelistet.

V EXPERIMENTELLER TEIL

Primer variable, schwere Kette (*backward*)

	5`	<u>NcoI</u>		VH →						3`
HB1	catgtg	<u>ccatgg</u>	cc	GAK	GTR	MAG	CTT	CAG	GAG	TC
		M	A	D/E	V	N/Q	L	Q	E	S
HB2	catgtg	<u>ccatgg</u>	cc	GAG	GTB	CAG	CTB	CAG	CAG	TC
		M	A	E	V	Q	L	Q	Q	S
HB3	catgtg	<u>ccatgg</u>	cc	CAG	GTG	CAG	CTG	AAG	SAR	TC
		M	A	Q	V	Q	L	K	Q/E	S
HB4	catgtg	<u>ccatgg</u>	cc	GAG	GTC	CAR	CTG	CAA	CAR	TC
		M	A	E	V	Q	L	Q	Q	S
HB5	catgtg	<u>ccatgg</u>	cc	CAG	GTY	CAG	CTB	CAG	CAR	TC
		M	A	Q	V	Q	L	Q	Q	S
HB6	catgtg	<u>ccatgg</u>	cc	CAG	GTY	CAR	CTG	CAG	CAR	TC
		M	A	Q	V	Q	L	Q	Q	S
HB7	catgtg	<u>ccatgg</u>	cc	CAG	GTC	CAC	GTG	AAG	CAR	TC
		M	A	Q	V	H	V	K	Q	S
HB8	catgtg	<u>ccatgg</u>	cc	GAG	GTG	AAS	STG	GTG	GAR	TC
		M	A	E	V	K/N	L/V	V	E	S
HB9	catgtg	<u>ccatgg</u>	cc	GAV	GTG	AWG	STG	GTG	GAG	TC
		M	A	D/E	V	K/M	L/V	V	E	S
HB10	catgtg	<u>ccatgg</u>	cc	GAG	GTG	CAG	STG	GTG	GAR	TC
		M	A	E	V	Q	L/V	V	E	S
HB11	catgtg	<u>ccatgg</u>	cc	GAK	GTG	CAM	CTG	GTG	GAR	TC
		M	A	D/E	V	H/Q	L	V	E	S
HB12	catgtg	<u>ccatgg</u>	cc	GAG	GTG	AAG	CTG	ATG	GAR	TC
		M	A	E	V	K	L	M	E	S
HB13	catgtg	<u>ccatgg</u>	cc	GAG	GTG	CAR	CTT	GTT	GAR	TC
		M	A	E	V	Q	L	V	E	S
HB14	catgtg	<u>ccatgg</u>	cc	GAR	GTR	AAG	CTT	CTC	GAR	TC
		M	A	E	V	K	L	L	E	S
HB15	catgtg	<u>ccatgg</u>	cc	GAA	GTG	AAR	STT	GAG	GAR	TC
		M	A	E	V	K	L/V	E	E	S
HB16	catgtg	<u>ccatgg</u>	cc	CAG	GTT	ACT	CTR	AAA	SAR	TC
		M	A	Q	V	T	L	K	Q/E	S
HB17	catgtg	<u>ccatgg</u>	cc	CAG	GTC	CAA	CTV	CAG	CAR	CC
		M	A	Q	V	Q	L	Q	Q	P
HB18	catgtg	<u>ccatgg</u>	cc	GAT	GTG	AAC	TTG	GAA	SAR	TC
		M	A	D	V	N	L	E	Q/E	S
HB19	catgtg	<u>ccatgg</u>	cc	GAG	GTG	AAG	GTC	ATC	GAR	TC
		M	A	E	V	K	V	I	E	S

Primer variable, leichte Kette (*backward*)

	5`	XhoI	VL →	3`
LB1	catgtg	<u>ctcgag</u>	t GAY ATC CAG CTG ACT CAG CC	
		S S	D I Q L T Q P	
LB2	catgtg	<u>ctcgag</u>	t GAY ATT GTT CTC WCC CAG TC	
		S S	D I V L T/S Q S	
LB3	catgtg	<u>ctcgag</u>	t GAY ATT GTG MTM ACT CAG TC	
		S S	D I V I/L T Q S	
LB4	catgtg	<u>ctcgag</u>	t GAY ATT GTG YTR ACA CAG TC	
		S S	D I V L T Q S	
LB5	catgtg	<u>ctcgag</u>	t GAY ATT GTR ATG ACM CAG TC	
		S S	D I V M T Q S	
LB6	catgtg	<u>ctcgag</u>	t GAY ATT MAG ATR AMC CAG TC	
		S S	D I K/Q I/M N/T Q S	
LB7	catgtg	<u>ctcgag</u>	t GAY ATT CAG ATG AYH CAG TC	
		S S	D I Q M T/I Q S	
LB8	catgtg	<u>ctcgag</u>	t GAY ATY CAG ATG ACA CAG AC	
		S S	D I Q M T Q T	
LB9	catgtg	<u>ctcgag</u>	t GAY ATT GTT CTC AWC CAG TC	
		S S	D I V L N/I Q S	
LB10	catgtg	<u>ctcgag</u>	t GAY ATT GWG CTS ACC CAA TC	
		S S	D I E/V L T Q S	
LB11	catgtg	<u>ctcgag</u>	t GAY ATT STR ATG ACC CAR TC	
		S S	D I L/V M T Q S	
LB12	catgtg	<u>ctcgag</u>	t GAY RTT KTG ATG ACC CAR AC	
		S S	D I/V V/L M T Q T	
LB13	catgtg	<u>ctcgag</u>	t GAY ATT GTG ATG ACB CAG KC	
		S S	D I V M T Q S/A	
LB14	catgtg	<u>ctcgag</u>	t GAY ATT GTG ATA ACY CAG GA	
		S S	D I V I T Q D/E	
LB15	catgtg	<u>ctcgag</u>	t GAY ATT GTG ATG ACC CAG WT	
		S S	D I V M T Q I/M/F/L	
LB16	catgtg	<u>ctcgag</u>	t GAY ATT GTG ATG ACA CAA CC	
		S S	D I V M T Q P	
LB17	catgtg	<u>ctcgag</u>	t GAY ATT TTG CTG ACT CAG TC	
		S S	D I L L T Q S	
LBλ	catgtg	<u>ctcgag</u>	t GAT GCT GTT GTG ACT CAG GAA TC	
		S S	D A V V T Q E S	

3.2.4 Klonierung neuer DNA in den TOPO[®] TA-Vektor

Die PCR-Produkte wurden zunächst in den kommerziell erhältlichen TOPO[®] TA-Vektor (kurz: TA-Vektor) überführt. Hierzu wurden 1 μ L PCR-Produkt (entweder für V_H oder für V_L) in 3 μ L Wasser, 1 μ L 1:4-verdünnten Puffer (Salzpuffer wird mit Vektor geliefert) und 1 μ L TA-Vektor 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Anschließend wurden 2 μ L dieser Lösung durch Elektropolarisation in 50 μ L *E. coli* TG1 überführt. Je 100 μ L der Suspension wurden auf Agarplatten (50 μ g/mL Carbenicillin und 40 μ L/Platte X-gal (40 mg/mL) in DMF) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nur weiße oder hellblaue Kolonien wurde ausgewählt und in 5 mL LB-Medium (50 μ g/mL Carbenicillin) über Nacht bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. 4 mL der Zellkultur wurden mit dem *Qiagen Mini Prep Kit* nach Herstellerangaben extrahiert. Anschließend wurden 5 μ L Vektor mit 10 Einheiten EcoRI in 20 μ L 1x Puffer H 2 h bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde das Produkt mittels 1 % Agarosegel überprüft. War sowohl eine Bande bei 3.9 kbp, als auch bei 350 bp vorhanden, so war die Klonierung erfolgreich.

3.2.5 Klonierung neuer DNA in den Vektor pIT2#2

Für die Einführung neuer DNA in den Vektor pIT2#2 wurde zunächst die jeweilige Information (V_L oder V_H) aus dem Vektor pIT2#2 entfernt und anschließend wurde der lineare Vektor dephosphoryliert. Das Ausschneiden der V_H erfolgte mit den Restriktionsenzymen NcoI und XhoI, das der V_L mit SalI und NotI. Die dazu notwendigen Schritte sind unten aufgeführt. Die neue Information (V_L oder V_H) wurde aus dem TA-Vektor ausgeschnitten, nicht dephosphoryliert und anschließend mittels Ligase in den linearen Vektor pIT2#2 überführt. Das Ausschneiden der V_H erfolgte mit den Restriktionsenzymen NcoI und XhoI, das der V_L mit XhoI und NotI. Die Restriktionsenzyme SalI und XhoI erzeugen dieselben Enden. Die dazu notwendigen Verfahren sind ebenfalls unten aufgeführt.

Ausschneiden: Für das Ausschneiden genetischer Information wurden 2 μ L je Restriktionsenzym, 2.5 μ L BSA (20x), 5 μ L Puffer 3 (10x), 20 μ L DNA und 18.5 μ L dest. Wasser 5 h lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme 20 min bei 65 °C denaturiert.

Dephosphorylierung: Für die Dephosphorylierung wurden 50 μL Vektor, 10 μL Puffer (10x), 5 μL antarktische Phosphatase und 35 μL dest. Wasser 1 h bei 37 °C und anschließend 10 min bei 65 °C inkubiert. Das Produkt wurde mittels *QIAquick Gel Extraction Kit* gereinigt.

Ligation: Für die Ligation wurden 2 μL dephosphorylierter Vektor (1 \AA q., unter der Annahme, dass der Vektor aus ca. 4.9 kbp besteht), 1 μL Insert (3 \AA q., unter der Annahme, dass V_L und V_H aus ca. 390 bp bestehen), 1 μL 10x Puffer, 1 μL Ligase und 5 μL dest. Wasser verwendet. Der Ansatz wurde 18 h bei 16 °C inkubiert. Das Produkt wurde direkt zur Elektropolarisation verwendet.

3.2.6 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Elektropolarisation müssen die *E. coli*-Zellen (TG1 oder HB2151) in salzfreier Lösung vorliegen, um einen Überschlag während der Elektropolarisation zu verhindern. Dazu wurden 100 μL einer *E. coli*-Stammlösung auf einer Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine einzelne Kolonie wurde in 10 mL 2YT Medium über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Anschließend wurden 5 mL dieser Lösung in 800 mL 2YT Medium überführt und ca. 2 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Die OD_{600} sollte zwischen 0.6 und 0.9 liegen (exponentielle Wachstumsphase). Anschließend wurde die Lösung auf 4 °C gekühlt und während des gesamten Reinigungsprozesses auf 4 °C gehalten. Die Lösung wurde 20 min bei 4000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde der Rückstand langsam in dest. Wasser (4 °C) resuspendiert und erneut 20 min bei 4000 g zentrifugiert und der Überstand wiederum verworfen. Dieser Vorgang wurde zwei Mal durchgeführt. Anschließend wurde der Rückstand in 10 % (v/v) Glycerol/Wasser (4 °C) resuspendiert und 20 min bei 4000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Auch dieser Schritt wurde wiederholt. Der Rückstand wurde in 1 mL 10 % (v/v) Glycerol/Wasser (4 °C) resuspendiert. 10 μL der Suspension wurden in 990 μL 10 % (v/v) Glycerol/Wasser gegeben und es wurde die OD_{600} bestimmt. Diese sollte bei ca. 1.0 liegen, was einer Konzentration von 2.5×10^8 Zellen/mL entspricht. Die ursprüngliche Lösung sollte folglich bei ca. 2.5×10^{10} Zellen/mL liegen. Die gereinigten *E. coli* wurden in Aliquoten zu je 100 μL bei -80 °C gelagert.

3.2.7 Elektropolarisation

50 μL einer *E. coli*-Suspension (ca. 2.5×10^{10} Zellen/mL) wurden mit 2 μL Plasmid (in Ligationspuffer) versetzt und 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in eine Elektropolarisationküvette (2 mm) überführt und es wurde 5 ms eine Spannung von 2500 V (25 μF , 200 Ω) angelegt. Es wurden unverzüglich 450 μL SOC-Medium (SOC-Medium: SOB-Medium mit 20 mL steriler 1 M Glucoselösung pro Liter SOB-Medium versetzt) zugegeben und die Suspension wurde 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Vektoren aus 10 zufällig ausgewählten Kolonien wurden gereinigt und sequenziert.

3.2.8 Extraktion und Reinigung der DNA aus Bakterienzellen

4 mL Zellsuspension (*E. coli* TG1 oder *E. coli* HB2151) wurden 5 min bei 17000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* (250) extrahiert und gereinigt. Die Elution erfolgte mit 50 μL 10 mM Tris-HCl (pH 7.6). Der ursprüngliche Vektor pIT2#2 wurde zusätzlich mittels Phenolextraktion gereinigt. Hierbei wurde die DNA-Lösung auf ein Gesamtvolumen von 400 μL mit 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) ergänzt. Anschließend wurden 500 μL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1, v/v/v) zugegeben und die Suspension wurde 2 min geschüttelt. Die Phasen wurden durch Zentrifugation (17000 g, 5 min) getrennt und die obere Pufferphase wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Die Phenolextraktion wurde wiederholt, wobei die Pufferphase in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt wurde. Zur vollständigen Entfernung organischer Lösungsmittel, wurde die Pufferlösung zwei Mal mit 500 μL Diethylether extrahiert. Überschüssiger Ether wurde im Stickstoffstrom entfernt. Anschließend wurden 40 μL 3 M Natriumacetatlösung und 1 mL Ethanol zugegeben, um die DNA zu fällen. Das Reaktionsgefäß wurde 30 min bei -80 °C inkubiert und anschließend wurde das Fällungsprodukt zentrifugiert (17000 g, 10 min) und der Überstand verworfen. Das weiße Produkt wurde mit 1.2 mL kaltem Ethanol (70 %) gewaschen und 5 min bei RT getrocknet und anschließend in 100 μL 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) gelöst. Die gereinigten Vektoren wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.9 PCR für das Screening der ausgewählten Klone

Die zu testenden Zellkolonien wurden einzeln in 6 mL LB-Medium (0.08 μ M Glucose, 50 μ g/mL Carbenicillin) überführt und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Die DNA von 4 mL Zellsuspension wurde mittels *QIAprep Spin Miniprep Kit* nach Herstellerangaben isoliert und gereinigt. Die gereinigte DNA wurde mit 50 μ L EB-Puffer eluiert. Anschließend wurde die DNA mittels PCR vervielfältigt. Dazu wurden 1 μ L der DNA in folgende Lösung überführt: 5 μ L 10x Taq-Puffer, 1 μ L dNTP Mix (10 mM), 4 μ L MgCl₂ (25 mM), 1 μ L Primer LMB3 (25 μ M), 1 μ L Primer pHEN seq (25 μ M), 0.5 μ L Taq DNA Polymerase und 36.5 μ L Wasser. Verwendete Primer:

LMB3: 5`-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3`
pHEN seq: 5`-CTA TGC GGC CCC ATT CA-3`

Folgende Einstellungen wurden für die PCR verwendet: 1. Vorinkubation: 3 min bei 92 °C; 2. Amplifizierung (30 Zyklen): 30 s bei 92 °C (Denaturierung), 1 min bei 55 °C (Primerhybridisierung), 30 s bei 72 °C (Elongation); 3. Nachinkubation: 5 min bei 72 °C.

3.2.10 Synthese und Reinigung von löslichen scFv-Fragmenten

Die jeweiligen Vektoren wurden mittels Elektropolarisation in *E. coli* HB2151 überführt. *E. coli* HB2151 ist ein sog. *nonsuppressor strain* und kann deshalb lösliche, nicht an Phagen gebundene scFv herstellen. Nach der Elektropolarisation wurden die Zellen ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Ausgewählte Zellkolonien wurden in 5 mL 2YT-Medium (1 % Glucose, 50 μ g/mL Carbenicillin) suspendiert und über Nacht bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. 800 μ L dieser Suspension wurden in 160 mL 2YT-Medium (1 % Glucose, 50 μ g/mL Carbenicillin) gegeben und ca. 2 h bei 200 rpm und 37 °C inkubiert, bis eine OD von ca. 0.6 – 0.9 (exponentielle Wachstumsphase) erreicht wurde. Anschließend wurde die Suspension 20 min bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Rückstand wurde in 160 mL 2YT-Medium (0.1 % Glucose, 50 μ g/mL Carbenicillin, 0.5 mM Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid, IPTG) resuspendiert und 24 h bei 200 rpm und 26 °C inkubiert. Anschließend wurden je 50 mL bei 4 °C und 7500 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels indirekt nichtkompetitivem ELISA auf B[a]P-spezifische scFv überprüft. Die scFv wurden auf drei verschiedene Arten aus dem Zellpellet extrahiert:

- a) Extraktion der löslichen scFv aus dem Periplasma (osmotischer Schock): Während der gesamten Prozedur wurden alle Reagenzien mit Eis gekühlt. Das Zellpellet wurde in 0.8 mL 1x TES-Puffer resuspendiert und 30 min inkubiert. Anschließend wurden 1.2 mL 1:4-verdünnter TES-Puffer zugegeben und die Suspension wurde kurz gevortext. Nach einer weiteren Inkubation über 30 min, wurde die Suspension in 2 mL Gefäße überführt und 15 min bei 15000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Rückstand wurde verworfen und der Überstand bei 4 °C gelagert.
- b) Extraktion der löslichen scFv aus der ganzen Zelle (Ultraschallmethode): Die Zellpellets wurden in 1.5 mL PBS-Puffer resuspendiert und auf Eis gelagert. Anschließend wurden sie acht Mal je 30 s mit einem Ultraschallstab behandelt (Sonic Dismembrator, Fa. Fisher Scientific). Nach jeder Behandlung wurden sie auf Eis gekühlt. Die Suspension wurde in 2 mL Gefäße überführt und 15 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Der Rückstand wurde verworfen und der Überstand bei 4 °C gelagert.
- c) Extraktion der löslichen scFv aus der ganzen Zelle (enzymatische Methode): Die Zellpellets wurden in 4 mL Lyse-Puffer resuspendiert und über Nacht bei -20 °C gelagert. Es wurden 40 µL Phenylmethylsulfonylfluorid (100 mM in Ethanol) und 8 µL Dithiothreitol (1 M in Wasser) auf das gefrorene Pellet gegeben und dieses wurde bei RT aufgetaut. Anschließend wurden 200 µL frisch zubereitete Lysozymlösung (3 mg/mL in Wasser) zugegeben und die Suspension wurde ca. 40 min bei RT inkubiert, bis eine viskose Lösung entstand. Nun wurden 10 µL DNaseI (15 units/µL in 1 M MgCl₂) zugegeben und ca. 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung bei 4 °C und 12000 rpm 20 min zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde bei 4 °C gelagert und das Zellpellet wurde verworfen.

Bei Lagerzeiten über einer Woche, wurde 10 % Glycerin zugegeben und die Lösungen wurden bei -20 °C gelagert. Die aufgeführten Extraktionsmethoden beziehen sich auf ein Zellpellet von 40 mL Zellkultur. Für die Produktion größerer Mengen an löslichen scFv wurden Zellkulturansätze von 1 L verwendet. Anschließend wurden die scFv mittels enzymatischer Methode extrahiert. Die Überstände wurden über Nacht gegen 4 L PBS (0.5 mM EDTA) dialysiert (12 - 14 kDa MWCO) und anschließend filtriert (0.22 µm). Die Reinigung erfolgte über eine 5 mL *HisTrap HP* (GE Healthcare). Dabei wurde ein Fluss von

2 mL/min verwendet. Die Nickel-Säule wurde zunächst mit 100 mL IMAC A (pH 7.4) gespült und anschließend wurde der dialysierte Überstand (ca. 100 mL) über die Nickel-Säule geleitet. Die Säule wurde mit ca. 200 mL IMAC A gewaschen und daraufhin wurde die schrittweise Elution eingeleitet. Die Elution erfolgte durch stufenweises Anheben des Anteils an IMAC B. Es wurden je 25 mL 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50 und 100 % IMAC B verwendet. Die Detektion erfolgte mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die Peaks wurden separat aufgefangen und mittels SDS-PAGE, Western Blot und indirekt nichtkompetitivem ELISA untersucht. Anschließend wurden diejenigen Fraktionen, die scFv enthielten über Nacht gegen PBS-Puffer dialysiert und bei 4 °C gelagert. Für Lagerzeiten über einer Woche wurden die Lösungen mit 0.1 % Natriumazid versetzt und bei 4 °C gelagert. Für die folgende Anwendung wurde ebenfalls stets ein Fluss von 2 mL/min verwendet. Nach jeder Proteinreinigung wurde die *HisTrap*-Säule mit 50 mL EDTA-Lösung gespült, um die Nickelbelegung zu entfernen. Anschließend wurde mit je 40 mL IMAC A und dest. Wasser gewaschen. Für die erneute Belegung mit Nickel(II) wurden 10 mL 0.1 M NiCl₂-Lösung in dest. Wasser über die Säule geleitet. Es wurde mit 60 mL dest. Wasser und danach mit 40 mL IMAC A gespült. Die Säule wurde zur Lagerung mit 40 mL 20 % Ethanol gespült.

3.2.11 Indirekt kompetitiver ELISA für scFv-Fragmente

Beschichtung: Die Mikrotiterplatten wurden je Kavität mit 100 µL Hapten-Protein-Konjugat in Coatingpuffer bei 4 °C über Nacht beschichtet. Die Verdünnung des Hapten-Protein-Konjugat variierte von Experiment zu Experiment. Für das Screening wurden sowohl Verdünnungen von 1/1000 als auch 1/5000 verwendet. Anschließend wurden sie mit 400 µL PBST pro Kavität automatisch drei Mal gewaschen.

Blocken: Mit 300 µL *Protein-Free (TBS) Blocking* Puffer pro Kavität wurden die Platten 1 Stunde lang bei RT und 300 rpm geblockt. Anschließend wurde erneut drei Mal gewaschen.

Kompetition: Für die Kompetition wurden 50 µL Kalibrierlösung pro Kavität in die Mikrotiterplatte gegeben. 50 µL einer mit PBS verdünnten Lösung der scFv-Extrakte oder gereinigte scFv wurden zugegeben und es wurde 1 Stunde bei RT und 100 rpm geschüttelt. Der Verdünnungsfaktor für die scFv-Extrakte bzw. für die gereinigten scFv variierte von Experiment zu Experiment. Nach einstündiger Inkubation wurde erneut drei Mal mit PBST gewaschen.

Für die Kalibrierung wurde Benzo[a]pyren aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit in 10 % Methanol/Wasser gelöst. Für die Standardkurven wurde entionisiertes Wasser

verwendet. Es wurden folgende Kalibrierlösungen verwendet: 1000, 500, 100, 50, 10, 1, 0.1 und 0 µg/L B[a]P.

Anti-HIS-HRP: Pro Kavität wurden 100 µL einer Lösung mit PBS verdünntem Anti-HIS-HRP-Antikörper (1:10000) zugegeben. Nach erneuter einstündiger Inkubation bei 100 rpm und RT wurde drei Mal mit PBST gewaschen.

Farbreaktion: Es wurden pro Kavität 100 µL Substratlösung zugegeben. Die entstandene blaue Färbung wurde visuell überwacht und je nach Klon zwischen wenigen Minuten und 45 Minuten abgestoppt. Als Stopplösung wurden 100 µL 5 %ige Schwefelsäure verwendet. Anschließend wurde die Absorption bei 450 nm gemessen.

3.2.12 Bestimmung der Affinitätskonstanten der scFv-Fragmente

Für die Bestimmung der Affinitätskonstanten wurde analog zu Kapitel V.2.11 vorgegangen. Nach der Immobilisierung des 10-B[a]P-Peptids auf einem CM5-Chip wurde für die Bestimmung der Affinitätskonstanten je scFv zwei, bzw. drei Konzentrationen gemessen. Diese sind in Tabelle 33 aufgeführt. Bei allen scFv handelt sich um gereinigte scFv, die mittels Dialyse in HBS EP+ Puffer umgepuffert wurden. Die Konzentrationen wurden mittels UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Die Extinktionskoeffizienten wurden anhand der bekannten Proteinsequenzen errechnet, wozu folgende Webseite verwendet wurde: <http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>.

Tabelle 33: Verwendete Antikörperkonzentrationen für die Bestimmung der Affinitätskonstanten.

Klon	Konzentrationen [nM]
L3H3	5.7, 28.3, 56.6
L3H7	283, 566, 1132
L3H9	283, 566, 1132
L7H3	526, 1132
L3H9	202, 566, 1132

Die scFv-Verdünnungsreihen wurden mit dem Laufpuffer HBS EP+ hergestellt. Auf eine Bindungsphase (Assoziation) von 5 min folgte eine Dissoziationsphase von 15 min. Anschließend wurde der Chip mit 30 mM Natriumhydroxidlösung (10 % Acetonitril) 30 s regeneriert. Zuletzt folgte Stabilisierungsphase von 3 min mit HBS EP+. Die

Affinitätskonstanten wurden mittels Biacore Evaluation Software (1:1 Bindungsmodell) berechnet.

VI Abkürzungsverzeichnis

Äq.	Äquivalent
AF	Aflatoxin
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> (Chemische Ionisation unter Normaldruck)
APS	Ammoniumpersulfat
a.u.	<i>Arbitrary units</i> (willkürliche Einheiten)
B[a]P	Benzo[a]pyren
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
bp	<i>Base pairs</i> (Basenpaare)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CCD	<i>Charged Coupled Device</i> (Digitalkamera)
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CDR1-3	<i>Complementarity determining region 1-3</i> (Antikörperbindungsstelle 1-3)
CE	<i>Capillary electrophoresis</i> (Kapillarelektrophorese)
C _H 1-3	<i>Constant region heavy chain 1-3</i> (konstante Region der schweren Kette 1-3)
CMO	Carboxymethoxylamin
CR	<i>Cross Reactivity</i> (Kreuzreaktivität)
CSR	<i>Class-switch recombination</i> ("Klassenwechselrekombination")
CV	<i>Coefficient of Variation</i> (Variationskoeffizient)
Da	Dalton
DAPEG	Diaminopolyethylenglykol
DSC	Di-(<i>N</i> -succinimidyl)carbonat
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIPEA	<i>N,N'</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	1,4-Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> / Desoxyribonukleinsäure
DNT	Dinitrotoluol
DON	Deoxynivalenol
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDF	Fluoresceinthiocarbamylethylendiamin

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ESI	<i>Electrospray Ionisation</i> (Elektrospray-Ionisation)
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> (Umweltschutzbehörde)
Fab	<i>Fragment antigen binding</i> (Antigen bindendes Fragment)
F(ab') ₂	<i>Fragment antigen binding 2</i> (Antigen bindendes Fragment 2)
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FPIA	<i>Fluorescence Polarization Immunoassay</i> (Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay)
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> (schnelle Protein-Flüssigkeitschromatographie)
FR1-4	<i>Framework 1-4</i> (Grundgerüst des variablen Teils 1-4)
Fv	<i>Variable fragment</i> (variables Fragment)
GC	Gaschromatographie
GOPTS	3-Glycidylxypropyltrimethoxysilan
GPC	Gelpermeationschromatographie
HAT	Hypoxanthin/Aminopterin/Thymidin-Medium
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HT	Hypoxanthin/Thymidin-Medium
IAE	Immunoaffinitätsextraktion
IC ₅₀	Testmittelpunkt der ELISA-Kalibrierkurve
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
IUPAC	<i>Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IWC	Institut für Wasserchemie (Technische Universität München)
KA	Affinitätskonstante [1/M]
ka	Assoziationsratenkonstante [1/Ms]
kd	Dissoziationsratenkonstante [1/s]
KLH	<i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i> (Schlüsselloch-Schnecken-Hämocyanin)

LC	Flüssigkeitschromatographie
LD ₅₀	Mittlere letale Dosis
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i> (Flüssig-Flüssig-Extraktion)
LOD	<i>Limit of Detection</i> (Nachweisgrenze)
LOQ	<i>Limit of Quantification</i> (Bestimmungsgrenze)
m	Anzahl der Mehrfachmessung
M	Molar
mAk	Monoklonaler Antikörper
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation</i> (Matrix-unterstützte Laserdesorptionsionisation)
MCR 3	<i>Munich Chip Reader 3</i>
MHmV	Mykotoxin-Höchstmengenverordnung
MIP	<i>Molecular Imprinted Polymer</i> (molekular geprägtes Polymer)
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MTP	Mikrotiterplatte
MWCO	<i>Molecular Weight Cut-Off</i> (Molekulargewichtsgrenze)
n	Anzahl der Messpunkte einer Kalibrierung
NHS	<i>N-Hydroxysuccinimid</i>
OTA	Ochratoxin A
pAk	Polyklonaler Antikörper
PAK(s)	Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe
PASA	<i>Parallel Affinity Sensor Array</i> (paralleler Affinitätssensorarray)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction</i> (Reverse Transkriptase - Polymerase-Kettenreaktion)

RU	<i>Refractive Units</i>
s	Standardabweichung
scFv	<i>Single-chain fragment variable</i> (einkettiges variables Fragment)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Festphasenextraktion)
SPNE	<i>Solid Phase Nano Extraction</i> (Festphasennanoextraktion)
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i> (Oberflächenplasmonenresonanz)
tBu	<i>tert</i> -Butyl
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Thyroglobulin
TIS	Triisopropylamin
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i> (Dünnschichtchromatographie)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
UV	Ultraviolettes Licht
V _H	<i>Variable heavy chain</i> (variabler Teil der schweren Kette)
Vis	Sichtbarer Bereich des Lichts
V _L	<i>Variable light chain</i> (variabler Teil der leichten Kette)
v/v	Volumenprozent
w/v	Massenprozent
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
ZEA	Zearalenon
ZKÜ	Zellkulturüberstand
ZRM	Zertifiziertes Referenzmaterial

VII Literaturverzeichnis

Aamot E., Steinnes E., Schmid R., Polycyclic aromatic hydrocarbons in Norwegian forest soils: impact of long range atmospheric transport, *Environ. Pollut.* **1996**, *92*, 275-280.

Aburatani T., Ueda H., Nagamune T., Importance of a CDR H3 basal residue in V_H/V_L interaction of human antibodies, *J. Biochem.* **2002**, *132*, 775-782.

Alarcon S. H., Palleschi G., Compagnone G., Pascale M., Visconti A., Barna-Vetro I., Monoclonal antibody based electrochemical immunosensor for the determination of ochratoxin A in wheat, *Talanta* **2006**, *69*, 1031-1037.

Alarie J. P., Bowyer J. R., Sepaniak J. M., Hoyt A. M., Vo-Dinh T., Fluorescence monitoring of a benzo[a]pyrene metabolite using a regenerable immunochemical-based fiber-optic sensor, *Anal. Chim. Acta* **1990**, *236*, 237-244.

Alexandrov K., Rojas M., Satarug S., The critical DNA damage by benzo(a)pyrene in lung tissues of smokers and approaches to preventing its formation, *Toxicol. Lett.* **2010**, *198*, 63-68.

Alt F. W., Blackwell T. K., Yancopoulos G. D., Development of the primary antibody repertoire, *Science* **1987**, *238*, 1079-1087.

Alvarez-Rueda N., Behar G., Ferre V., Pugniere M., Roquet F., Gastinel L., Jacquot C., Aubry J., Baty D., Barbet J., Birkle S., Generation of llama single-domain antibodies against methotrexate, a prototypical hapten, *Mol. Immunol.* **2007**, *44*, 1680-1690.

Amblard M., Fehrentz J.-A., Martinez J., Subra G., Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis, *Mol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 239-254.

Arbabi-Ghahroudi M. A., Desmyter A., Wyns L., Hamers R., Muyldermans S., Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies, *FEBS Lett.* **1997**, *414*, 521-526.

Arevalo J. H., Stura E. A., Taussig M. J., Wilson I. A., Three-dimensional structure of an anti-steroid Fab' and progesterone-Fab' complex, *J. Mol. Biol.* **1993**, *231*, 103-118.

Arroyo-Manzanares N., Gamiz-Gracia L., Garcia-Campana A. M., On-line preconcentration for the determination of aflatoxins in rice samples by micellar electrokinetic capillary chromatography with laser-induced fluorescence detection, *Electrophoresis* **2010**, *31*, 2080-2085.

Azcona-Olivera J. I., Abouzied M. M., Plattner R. D., Pestka J. J., Production of monoclonal antibodies to the mycotoxins fumonisin B1, B2 and B3, *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 531-534.

Bagheri H., Mohammadi A., Pyrrole-based conductive polymer as the solid-phase extraction medium for the preconcentration of environmental pollutants in water samples followed by gas chromatography with flame ionization and mass spectrometry detection, *J. Chromatogr. A* **2003**, *1015*, 23-30.

Barbulovic-Nad I., Lucente M., Sun Y., Zhang M., Wheeler A. R., Bussmann M., Bio-microarray fabrication techniques - A review, *Crit. Rev. in Biotechnol.* **2006**, *26*, 237-259.

Barna-Vetro I., Solti L., Teren J., Gyöngyösi A., Szabo E., Wölfing A., Sensitive ELISA test for determination of ochratoxin A, *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 4071-4074.

Beloglazova N. V., Goryacheva I. Y., de Saeger S., Louise-Scippo M., Niessner R., Knopp D., New approach to quantitative analysis of benzo[a]pyrene in food supplements by an immunochemical column test, *Talanta* **2011**, in press.

Bennett J. W., Klich M., Mycotoxins, *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 497-516.

Berglund G. L., Carlsson G. H., Smith A. T., Szöke H., Henriksen A. Hajdu J., The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution, *Nature* **2002**, *427*, 463-468.

Better M., Chang C. P., Robinson R. R., Horwitz A. H., *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment, *Science* **1998**, *240*, 1041-1043.

Bezuidenhout S. C., Gelderblom W. C. A., Gorst-Allman C. P., Horak R. M., Marasas W. F. O., Spiteller G., Vleggaar R., Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, 743-745.

Biselli S., Analytische Methoden für die Kontrolle von Lebens- und Futtermitteln auf Mykotoxine, *J. Verbr. Lebensm.* **2006**, *1*, 106-114.

Blount W. P., Turkey „X“ disease, *Turkeys* **1961**, *9*, 52-61.

Boujday S., Gu C., Girardot M., Salmain M., Pradier C.-M., Surface IR applied to rapid and direct immunosensing of environmental pollutants, *Talanta* **2009**, *78*, 165-170.

Breitling F., Dübel S., Recombinant Antibodies, Wiley Verlag New York, **1999**.

Britten A. J., Naikwadi K. P., New nano stationary phase GC capillary columns for fast analysis of PAH by GC and GC/MS, *Polycycl. Aromat. Comp.* **2008**, *28*, 165-180.

Brum D. M., Casella R. J., Netto A. D. P., Multivariate optimization of a liquid-liquid extraction of the EPA-PAHs from natural contaminated waters prior to determination by liquid chromatography with fluorescence detection, *Talanta* **2008**, *74*, 1392-1399.

Burczynski M. E., Penning T. M., Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones generated by aldo-keto reductase induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 908-915.

Burmistrova N. A., Goryacheva I. Y., Basova E. Y., Franki A.-S., Elewaut D., van Beneden K., Deforce D., van Peteghem C., de Saeger S., Application of a new anti-zearalenone monoclonal antibody in different immunoassay formats, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 1301-1307.

Burnet F. M., A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection, *Aust. J. Sci.* **1957**, *20*, 67-69.

Canziani G. A., Klakamp S., Myszka D. G., Kinetic screening of antibodies from crude hybridoma samples using Biacore, *Anal. Biochem.* **2005**, *325*, 301-307.

Castegnaro M., Tozlovabu M., Wild C., Molinie A., Sylla A., Pfohl-Leszkowicz A., Advantages and drawbacks of immunoaffinity columns in analysis of mycotoxins in food, *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 480-487.

Carpino L. A., Han G. Y., 9-Fluorenylmethoxycarbonylamino-protecting group, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404–3409.

Cazzaniga D., Basilico J. C., Gonzales R. J., Torres R. L., Greef D. M., Mycotoxins inactivation by extrusion cooking of corn flour, *Lett. Appl. Microbiol.* **2001**, *33*, 144-147.

Cervino C., Knopp D., Weller M. G., Niessner R., Novel aflatoxin derivatives and protein conjugates, *Molecules* **2007**, *12*, 641-653.

Cervino C., Weber E., Knopp D., Niessner R., Comparison of hybridoma screening methods for the efficient detection of high-affinity hapten-specific monoclonal antibodies, *J. Immunol. Meth.* **2008a**, *329*, 184-193.

Cervino C., Asam S., Knopp D., Niessner R., Use of isotope-labeled aflatoxins for LC-MS/MS stable isotope dilution analysis of foods, *J. Agric. Food Chem.* **2008b**, *56*, 1873-1879.

Cervino C., Entwicklung von immunanalytischen, chromatographischen und massenspektrometrischen Methoden zur Bestimmung von Aflatoxinen in Lebensmitteln, Dissertation, Herbert Hieronymus Verlag, München, **2009**.

Cleveland T. E., Dowd P. F., Desjardins A. E., Bhatnagar D., Cotty P. J., United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service research on pre-harvest prevention of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in US crops, *Pest. Manag. Sci.* **2003**, *59*, 629-642.

Cho Y.-J., Lee D.-H., Kim D.-O., Min W.-K., Bong K.-T., Lee G.-G., Seo J.-H., Production of a monoclonal antibody against ochratoxin A and its application to immunochromatographic assay, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8447-8451.

Chu F. S., Ueno I., Production of antibody against aflatoxin B1, *Appl. Environ. Microbiol.* **1977a**, *33*, 1125-1128.

Chu F. S., Hsia M. T. S., Sun P. S., Preparation and characterization of aflatoxin B1-1-(Ocarboxymethyl)-oxime, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* **1977b**, *60*, 791-794.

Chumsae C., Gaza-Bulseco G., Sun J., Liu H. C., Comparison of methionine oxidation in thermal stability and chemically stressed samples of a fully human monoclonal antibody, *J. Chromatogr. B* **2007**, *850*, 285-294.

Clackson T., Hoogenboom H. R., Griffiths A. D., Winter G., Making antibody fragments using phage display libraries, *Nature* **1991**, *352*, 624-628.

Cortez-Retamozo V., Lauwereys M., Hassanzadeh G. H., Gobert M., Conrath K., Muyldermans S., de Baetselier P., Revets H., Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels, *Int. J. Cancer* **2002**, *98*, 456-462.

Cortez-Retamozo V., Backmann N., Senter P. D., Wernery U., de Baetselier P., Muyldermans S., Revets H., Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 2853-2857.

Cramer B., Bretz M., Humpf H.-U., Stable isotope dilution analysis of the *Fusarium* mycotoxin zearalenone, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 8353-8358.

Cras J. J., Rowe-Taitt C. A., Nivens D. A., Ligler F. S., Comparison of chemical cleaning methods of glass in preparation for silanization, *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 683-688.

Cruz-Aguado J. A., Penner G., Fluorescence polarisation based displacement assay for the determination of small molecules with aptamers, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8853-8855.

De Costa C., St Anthony's fire and living ligatures: a short history of ergometrine, *Lancet* **2002**, *359*, 1768-1770.

De Girolamo A., Solfrizzo M., Visconti A., Effect of processing on fumonisine concentration in cornflakes, *J. Food Protect.* **2001**, *64*, 701-705.

De Groene E. M., Jahn A., Horbach G. J., Fink-Gremmels J., Mutagenicity and genotoxicity of the mycotoxin ochratoxin A, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **1996**, *1*, 21-26.

Denissenko M. F., Pao A., Tang M., Pfeifer G. P., Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53, *Science* **1996**, *274*, 430-432.

De Wildt R. M. T., Mundy C. R., Gorick B. D., Tomlinson I. M., Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 989-994.

Di Noia J. M., Neuberger M. S., Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation, *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 1-22.

Dirheimer G., Creppy E. E., Mechanism of action of ochratoxin A, *IARC Scientific Publications* **1991**, *115*, 171-186.

Dieterle M., Blaschke T., Hasse H., Microcalorimetric study of adsorption of human monoclonal antibodies on cation exchange chromatographic materials, *J. Chromatogr. A* **2008**, *1205*, 1-9.

Dostalek J., Pribyl J., Homola J., Skladal P., Multichannel SPR biosensor for detection of endocrine-disrupting compounds, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 1841-1847.

Dreyer A., Radke M., Turunen J., Blodau C., Long-term change of polycyclic hydrocarbon deposition to peatlands of eastern Canada, *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 3918-3924.

Eaton D. L., Gallagher E. P., Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1994**, *34*, 135-172.

Elbs M., Brock R., Determination of binding constants on microarrays with confocal fluorescence detection, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4793-4800.

Ehrlich K. C., Daigle K. W., Protein synthesis inhibition by 8-Oxo-12,13-epoxy-trichothecenes, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *923*, 206-213.

Ekins R. P., Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays, *Clin. Chem.* **1998**, *44*, 2015-2030.

Fährnich K. A., Pravda M., Guilbault G. G., Immunochemical detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *Anal. Lett.* **2002**, *35*, 1269-1300.

FAO, Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed 2003, Food and Agriculture Organization, **2002**.

Feng Y., Ke X., Ma R., Chen Y., Hu G., Liu F., Parallel detection of autoantibodies with microarrays in rheumatoid diseases, *Clin. Chem.* 2004, *50*, 416-422.

Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F., Whitehouse C. M., Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science* **1989**, *246*, 64-71.

Fetzer J. C., Kershaw J. R., Identification of large polycyclic aromatic hydrocarbons in coal tar pitch, *Fuel* **1995**, *74*, 1533-1536.

Findlay J. W. A., Dillard A. F., Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays, *The APPS Journal* **2007**, *9*, 260-267.

Fink-Gremmels J., Mykotoxine in der Ätiologie humaner Erkrankungen, *Ernährungs-Umschau* **1994**, *41*, 226-229.

Furzer G. S., Veldhuis L., Hall J. C., Development and comparison of three diagnostic immunoassay formats for the detection of azoxystrobin, *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 688-693.

Gadgil H. S., Bondarenko P. V., Pipes G. D., Dillon T. M., Banks D., Abel J., Kleemann G. R., Treuheit M. J., Identification of cysteinylolation of a free cysteine in the Fab region of a recombinant monoclonal IgG1 antibody using Lys-C limited proteolysis coupled with LC/MS analysis, *Anal. Biochem.* **2006**, 355, 165-174.

Garet E., Cabado A. G., Vieites J. M., Gonzales-Fernandes A., Rapid isolation of single-chain antibodies by phage display technology directed against one of the most potent marine toxins: palytoxin, *Toxicon* **2010**, 55, 1519-1526.

Gelderblom W. C. A., Jaskiewicz K., Marasas W. F. O., Thiel P. G., Fumonisin - novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*, *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, 54, 1806-1811.

Gfrerer M., Serschen M., Lankmayr E., Optimized extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil samples, *J. Biochem. Biophys. Meth.* **2002**, 53, 203-216.

Gobi K. V., Miura N., Highly sensitive and interference-free simultaneous detection of two polycyclic aromatic hydrocarbons at parts-per-trillion levels using a surface plasmon resonance immunosensors, *Sensor. Actuat. B* **2004**, 103, 265-271.

Göbel R., Lusky K., Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, and zearalenone in grains by new immunoaffinity column / liquid chromatography, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* **2004**, 87, 411-416.

Gottschalk P. G., Dunn J. R., Determining the error of dose estimates and minimum and maximum acceptable concentrations from assays with nonlinear dose-response curves, *Comput. Meth. Prog. Bio.* **2005**, 80, 204-215.

Grijo S. J. L., Frenich A. G., Vidal J. L. M., Romero-Gonzales R., Determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2 and ochratoxin A in animal feed by ultra high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* **2010**, 33, 502-508.

Grove J. F., Non-macrocyclic trichothecenes, *Nat. Prod. Rep.* **1988**, 5, 187-209.

Grove J. F., Macrocyclic trichothecenes, *Nat. Prod. Rep.* **1993**, *10*, 429-448.

Gundel L. A., Mahanama K. R. R., Daisey J. M., Semivolatile and particulate polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental tobacco smoke: cleanup, speciation, and emission factors, *Environ. Sci. Technol.* **1995**, *29*, 1607-1614.

Gyönggyösi-Horvath A., Barna-Vetro I., Solti L., A new monoclonal antibody detecting ochratoxin A at the picogram level, *Lett. Appl. Biochem.* **1996**, *22*, 103-105.

Hage D. S., Survey of recent advances in analytical applications of immunoaffinity chromatography, *J. Chromatogr. B* **1998**, *715*, 3-28.

Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hamer C., Songa E. B., Bendahman N., Hamers R., Naturally occurring antibodies devoid of light chains, *Nature* **1993**, *363*, 446-448.

Hart L. P., Schabenberger O., Variability of vomitoxin in truckloads of wheat in a wheat scab epidemic year, *Plant Dis.* **1998**, *82*, 625-630.

Hecht S. S., Carmella S. G., Villalta P. W., Hochalter J. B., Analysis of phenanthrene and benzo[*a*]pyrene tetraol enantiomers in human urine: relevance to the bay region diol epoxide hypothesis of benzo[*a*]pyrene carcinogenesis and to biomarker studies, *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 900-908.

Henry S. H., Bosch F. X., Bowers J. C., Aflatoxin, hepatitis and worldwide liver cancer risks, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2002**, *504*, 229-233.

Hernandez M. J., Garcia-Moreno M. V., Duran E., Guillen D., Barroso C. G., Validation of two analytical methods for the determination of ochratoxin A by reversed-phased high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection in musts and sweet wines from Andalusia, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *566*, 117-121.

Hines H. B., Brüggemann E. E., Holcomb M., Fumonisin B1 analysis with capillary electrophoresis electrospray-ionization mass-spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 519-524.

Ho J.-A. A., Wauchope R. D., A strip liposome immunoassay for aflatoxin B1, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1493-1496.

Hoerger C. C., Schenzel J., Strobel B. J., Bucheli T. D., Analysis of selected phytotoxins and mycotoxins in environmental samples, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 1261-1289.

Honjo T., Kinoshita K., Muramatsu M., Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation, *Annu. Rev. Immunol.* **2002**, *20*, 165-196.

Hoogenboom H. R., Selecting and screening recombinant antibody libraries, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1105-1116.

Houessou J. K., Maloug S., Leveque A.-S., Delteil C., Heyd B., Camel V., Effect of roasting conditions on the polycyclic aromatic hydrocarbon content in ground arabica coffee and coffee brew, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 9719-9726.

Hussein S. H., Brasel J. M., Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals, *Toxicology* **2001**, *167*, 101-134.

Ikediodi C. O., Hsu I. C., Bamberg J. R., Strong F. M., Gas-liquid chromatography of mycotoxins of the trichothecene group, *Anal. Biochem.* **1971**, *43*, 327-340.

Jameson D. M., Ross J. A., Fluorescence polarisation/anisotropy in diagnostics and imaging, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2685-2708.

Johnson K. A., Paisley-Flango K., Tangarone B. S., Porter T. J., Rouse J. C., Cation exchange-HPLC and mass spectrometry reveal C-terminal amidation of an IgG1 heavy chain, *Anal. Biochem.* **2007**, *360*, 75-83.

Johnston M. F. M., Eisen H. N., Cross-reactions between 2,4-dinitrophenol and menadione (vitamine K3) and the general problem of antibody specificity, *J. Immunol.* **1976**, *117*, 1189-1196.

Jolley M. E., Stroupe S. D., Wang C.-H. J., Panas H. N., Keegan C. L., Schmidt R. L., Schwenzler K. S., Fluorescence polarization immunoassay. I. Monitoring aminoglycoside antibiotics in serum and plasma, *Clin. Chem.* **1981**, *27*, 1190-1197.

Kabat E. A., Wu T. T., Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites, *J. Immunol.* **1991**, *147*, 1709-1719.

Kappenstein O., Brockmeyer A., Dietrich R., Curtui V., Klaffke H., Lepschy J., Märtlbauer E., Schneider E., Seidler C., Thielert G., Usleber E., Weber R., Wolff J., Zearalenon in Lebensmitteln, *Mycotoxin Research* **2005**, *2*, 79-82.

Karas M., Hillenkamp F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299-2301.

Ke L., Bao W., Chen L., Wong Y. S., Fung N., Tam Y., Effects of humic acid on solubility and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid media and mangrove sediment slurries, *Chemosphere* **2009**, *76*, 1102-1108.

Khayoon W. S., Saad B., Yan C. B., Hashim N. H., Ali A. S. M., Salleh A. S. M., Salleh B., Determination of aflatoxins in animal feeds by HPLC with multifunctional column clean-up, *Food Chem.* **2008**, *118*, 882-886.

Kim I. S., Ritchie L., Setford S., Taylor J., Allen M., Wilson G., Heywood R., Pahlavanpour B., Saini S., Quantitative immunoassay for determining polyaromatics in electrical insulating oils, *Anal. Chim. Acta* **2001**, *450*, 13-25.

Kloth K., Niessner R., Seidel M., A regenerable immunochip for the rapid determination of 13 different antibiotics in raw milk, *Analyst* **2009a**, *134*, 1433-1439.

Kloth K., Niessner R., Seidel M., Development of an open stand-alone platform for regenerable automated microarrays, *Biosens. Bioelectron.* **2009b**, *24*, 2106-2112.

Knopp D., Seifert M., Vaeaenaenen V., Niessner R., Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated water and soil by immunological and chromatographic methods, *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 2035-2041.

Kobayashi N., Ohtoyo M., Wada E., Kato Y., Mano N., Goto J., Generation of a single-chain Fv fragment for the monitoring of deoxycholic acid residues anchored on endogenous proteins, *Steroids* **2005**, *70*, 285-294.

Kobayashi N., Iwakami K., Kotoshiba S., Niwa T., Kato Y., Mano N., Goto J., Immunoenzymometric assay for a small molecule, 11-deoxycortisol, with attomole-range sensitivity employing an scFv-enzyme fusion protein and anti-idiotypic antibodies, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2244-2253.

Kobayashi N., Kato Y., Oyama H., Taga S., Niwa T., Sun P., Ohtoyo M., Goto J., Anti-estradiol-17 β single chain Fv-fragments: generation, characterization, gene randomization, and optimized phage display, *Steroids* **2008**, *73*, 1485-1499.

Kobayashi N., Oyama H., Kato Y., Goto J., Söderlind E., Borrebaeck C. A. K., Two-step in vitro antibody affinity maturation enables estradiol-17 β assays with more than 10-fold higher sensitivity, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1027-1038.

Köhler G., Milstein C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* **1975**, *256*, 495-497.

Krämer P., Immunochemische Methoden in der Umweltanalytik. In: Höll: Wasser - Nutzung im Kreislauf: Hygiene, Analyse und Bewertung, R. Nießner (Hrsg.), 9. Auflage, Walter de Gruyter Verlag, Berlin/New York, **2010**.

Krska R., Baumgartner S., Josephs R., The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2001**, *371*, 285-299.

Kuby J., Immunology, W. H. Freeman and Company Verlag, New York, **2007**.

Kühn I., Valenta H., Rohr K., Determination of ochratoxin A in bile of swine by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* **1995**, 668, 333-337.

Kuiper-Goodman T., Scott P. M., Risk assessment of the mycotoxin zearalenone, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **1987**, 3, 253-306.

Kumar A., Xagorarakis I., Pharmaceuticals, personal care products and endocrine-disrupting chemicals in U.S. surface and finished drinking waters: a proposed ranking system, *Sci. Tot. Environ.* **2010**, 408, 5972-5989.

Langseth W., Rundberget T., Instrumental methods for determination of nonmacrocytic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures, *J. Chromatogr. A* **1998**, 815, 103-121.

Larrick J. W., Danielsson L., Brenner C. A., Rapid cloning of rearranged immunoglobulin genes from human hybridoma cells using mixed primers and the polymerase chain reaction, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1989**, 160, 1250-1256.

Lauer B., Oettleben I., Jacobsen H.-J., Reinard T., Production of a single-chain variable fragment antibody against fumonisin B1, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 899-904.

Lawrence J. F., Niedzwiedek B., Scott P. M., Effect of temperature and solvent composition on extraction of fumonisin B1 and B2 from corn products, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* **2000**, 83, 604-611.

Leonard P., Saefsten P., Hearty S., McDonnell B., Finlay W., O'Kennedy, R., High throughput ranking of recombinant avian scFv antibody fragments from crude lysates using the Biacore A 100, *J. Immunol. Meth.* **2007**, 323, 172-179.

Letzel T., Rosenberg E., Wissiack R., Grasserbauer M., Niessner R., Separation and identification of polar degradation products of benzo[a]pyrene with ozone by atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry after optimized column chromatographic clean-up, *J. Chromatogr. A* **1999**, 855, 501-514.

Levin W., Chang R. L., Wood A. W., Thakker D. R., Yagi H., Jerina D. M., Conney A. H., Tumorigenicity of optical isomers of the diastereomeric bay-region 3,4-diol-1,2-epoxides of benzo(c)phenanthrene in murine tumor models, *Cancer Res.* **1986**, *46*, 2257-2261.

Li K., Chen R., Zhao B., Liu M., Karu A. E., Roberts V. A., Li Q. X., Monoclonal antibody-based ELISAs for part-per-billion determination of polycyclic aromatic hydrocarbons: effects of haptens and formats on sensitivity and specificity, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 302-309.

Li T., Zhang Q., Liu Y., Chen D., Hu B., Blake D. A., Liu F., Production of recombinant scFv antibodies against methamidophos from a phage-display library of a hyperimmunized mouse, *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9085-9091.

Li P., Zhang Q., Zhang J., Chen X., Jiang J., Xie L., Zhang D., Development of a class-specific monoclonal antibody-based ELISA for aflatoxins in peanuts, *Food Chem.* **2009**, *115*, 313-317.

Li Q., Rodriguez L. G., Farnsworth D. F., Gildersleeve J. C., Effects of hapten density on the induced antibody repertoire, *Chem. Bio. Chem.* **2010**, *11*, 1686-1691.

Liang Y., Baker M. E., Yeager B. T., Denton M. B., Quantitative analysis of aflatoxins by high-performance thin-layer chromatography utilizing a scientifically operated charge-coupled device detector, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3885-3891.

Liao B. C., Jong T. T., Lee M. R., Chang C. M. J., Supercritical fluid extraction and quantification of aflatoxins in *Zizyohi Fructus* by liquid chromatography / atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Sp.* **2007**, *21*, 667-673.

Liu M., Li Q. X., Rechnitz G. A., Flow injection immunosensing of polycyclic aromatic hydrocarbons with a quartz crystal microbalance, *Anal. Chim. Acta* **1999**, *387*, 29-38.

Liu B.-H., Tsao Z.-J., Wang J.-J., Yu F.-Y., Development of a monoclonal antibody against ochratoxin A and its application in enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 7029-7035.

Love J. C., Ronan J. L., Grotenbreg G. M., van der Veen A. G., Ploegh H. L., A microengraving method for rapid selection of cells producing antigen-specific antibodies, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 703-707.

Lowry M., Fakayode S. O., Geng M. L., Baker G. A., Wang L., McCarroll M. E., Patonay G., Warner I. M., Molecular fluorescence, phosphorescence and chemiluminescence spectrometry, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 4551-4574.

Lucci P., Derrien D., Alix F., Perollier C., Bayouhd S., Molecular imprinted polymer solid-phase extraction for detection of zearalenone in cereal sample extracts, *Anal. Chim. Acta* **2010**, *672*, 15-19.

Mackay A.A., Gschwend P. M., Enhanced concentrations of PAHs in groundwater at a coal tar site, *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 1320-1328.

Maggon K. K., Gupta S. K., Venkatasubramanian T. A., Biosynthesis of aflatoxins, *Bacteriol. Rev.* **1977**, *41*, 822-855.

Maier M., Maier D., Lloyd B. J., Factors influencing the mobilization of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) from the coal-tar lining of water mains, *Water Res.* **2000**, *34*, 332-337.

Maier N. M., Buttinger G., Welhartizki S., Gavioli E., Lindner W., Molecular imprinted polymer-assisted sample clean-up of ochratoxin A from red wine: merits and limitations, *J. Chromatogr. B* **2004**, *804*, 103-111.

Maier R. H., Maier C. J., Rid R., Hintner H., Bauer J. W., Oender K., Epitope mapping of antibodies using a cell array based polypeptide library, *J. Biomol. Screen.* **2010**, *15*, 418-426.

Makvandi-Nejad S., Sheedy C., Veldhuis L., Richard G., Hall J. C., Selection of single chain variable fragment (scFv) antibodies from a hyperimmunized phage display library for the detection of the antibiotic monensin, *J. Immunol. Meth.* **2010**, *360*, 103-118.

Malawska M., Bojakowska I., Wilkomirski B., Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in peat and plants from selected peat-bogs in the north-east of Poland, *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **2002**, *165*, 686-691.

Manetta A. C., Di Guiseppe L., Giammarco M., Fusaro I., Simonella A., Gramenzi A., Formigoni A., High-performance liquid chromatography with post-column derivatisation and fluorescence detection for sensitive determination of aflatoxin M1 in milk and cheese, *J. Chromatogr. A* **2005**, *1083*, 219-222.

Manis J. P., Tian M., Alt F. W., Mechanism and control of class-switch recombination, *Trends Immunol.* **2002**, *23*, 31-39.

Mankar S. N., Banerjee D., Vaidya P. S., Husain M. I., Jaiswal P. K., Aflatoxin B1 in amla whole (dry), amla powder, castor seed shikakai, hahua and tamarind, *J. Inst. Chem. (India)* **2005**, *77*, 169-170.

Maragos C. M., Capillary zone electrophoresis and HPLC for the analysis of fluorescein isothiocyanate-labeled fumonisin B1, *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 390-394.

Maragou N. C., Rosenberg E., Thomaidis N. S., Koupparis M. A., Direct determination of the estrogenic compounds 8-prenylnaringenin, zearalenone, α - and β -zearalenol in beer by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **2008**, *1202*, 47-57.

Marquardt H., Schäfer S. G., Lehrbuch der Toxikologie, BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim, **1994**.

Matschulat D., Deng A., Niessner R., Knopp D., Development of a highly sensitive monoclonal antibody based ELISA for detection of benzo[a]pyrene in potable water, *Analyst* **2005**, *130*, 1078-1086.

Matschulat D., Prestel H., Haider F., Niessner R., Knopp D., Immunization with soot from a non-combustion process provokes formation of antibodies against polycyclic aromatic hydrocarbons, *Analyst* **2006**, *310*, 159-170.

McCafferty J., Griffiths A. D., Winter G., Chiswell D. J., Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains, *Nature* **1990**, *348*, 552-554.

Melendez-Colon V. J., Luch A., Seidel A., Baird W. M., Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites, *Carcinogenesis* **1999**, *20*, 1885-1891.

Merrifield R. B., Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.

Mesci A., Carlyle J. R., A rapid and efficient method for the generation and screening of monoclonal antibodies specific for cell surface antigens, *J. Immunol. Meth.* **2007**, *323*, 78-87.

MHmV, Mykotoxin-Höchstmengenverordnung, Digitalverlag GmbH, **2004**.

Milstein C., Neuberger M. S., Maturation of the immune response, *Adv. Protein Chem.* **1996**, *49*, 451-485.

Min W.-K., Cho Y.-J., Park J.-B., Bae Y.-H., Kim E.-J., Park K., Park Y.-C., Seo J.-H., Production and characterization of monoclonal antibody and its recombinant single chain variable fragment specific for a food-born mycotoxin, fumonisin B1, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2010**, *33*, 109-115.

Monbaliu S., van Poucke C., Detavernier C., Dumoulin F., van de Velde M., Schoeters E., van Dyck S., Averkieva O., van Peteghem C., de Saeger S., Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method, *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 66-71.

Mol H. G. J., Plaza-Bolanos P., Zomer P., Rijk T. C., Stolker A. A. M., Mulder P. P. J., Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrices, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 9450-9459.

Moore E. J., Kreuzer M. P., Pravda M., Guilbault G. G., Development of a rapid single-drop analysis biosensor for screening of phenanthrene in water samples, *Electroanalysis* **2004**, *16*, 1653-1659.

Mücke W., Lemmen, C., Schimmelpilze: Vorkommen - Gesundheitsgefahren - Schutzmaßnahmen, Ecomed Medizin Verlag, Landsberg am Lech, **2004**.

Murakami A., Takahashi Y., Nishimura M., Shimizu T., Azuma T., The amino acid residue at position 95 and the third CDR region in the H chain determine the ceiling affinity and the maturation pathway of an anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl antibody, *Mol. Immunol.* **2010**, *48*, 48-58.

Ngundi M. M.; Shriver-Lake L. C.; Moore M. H.; Lassman M. E.; Ligler F. S.; Taitt C. R., Array biosensor for detection of ochratoxin A in cereals and beverages, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 148-154.

Ngundi M. M.; Shriver-Lake L. C.; Moore M. H.; Ligler F. S.; Taitt C. R., Multiplexed detection of mycotoxins in food with a regenerable array, *J. Food Protect.* **2006**, *69*, 3047-3051.

Nicol M. J., Lauren D. R., Miles C. O., Jones W. T., Production of a monoclonal antibody with specificity for deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol and 15-acetyldeoxynivalenol, *Food Agric. Immunol.* **1993**, *5*, 199-209.

Nießner R. (Hrsg.), Höll: Wasser - Nutzung im Kreislauf: Hygiene, Analyse und Bewertung, 9. Auflage, Walter de Gruyter Verlag, Berlin/New York, **2010**.

Oda M., Uchiyama S., Noda M., Nishi Y., Koga M., Mayanagi K., Robinson C. V., Fukui K., Kobayashi Y., Morikawa K., Azuma T., Effects of antibody affinity and antigen valence on molecular forms of immune complexes, *Mol. Immunol.* **2009**, *47*, 357-364.

Olsson J., Börjesson T., Lundstedt T., Schnürer J., Detection and quantification of ochratoxin A and deoxynivalenol in barley grains by GC-MS and electronic nose, *Int. J. Food Microbiol.* **2002**, *72*, 203-214.

Ovrebo S., Haugen A., Hemminki K., Szyfter K., Drablos P. A., Skogland M., Studies of biomarkers in aluminum workers occupationally exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Cancer Detect. Prev.* **1995**, *19*, 258-267.

Pande J., Szewczyk M. M., Grover A. K., Phage display: concept, innovations, applications and future, *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 849-858.

Pansri P., Jaruseranee N., Rangnoi K., Kristensen P., Yamabhai M., A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens, *BMC Biotechnology* **2009**, *9*, 1-16.

Park J.-W., Kurosawa S., Aizawa H., Hamano H., Harada Y., Asano S., Mizushima Y., Higaki M., Dioxin immunosensor using anti-2,3,7,8-TCDD antibody which was produced with mono 6-(2,3,6,7-tetrachloroxanthene-9-ylidene) hexyl succinate as a hapten, *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *22*, 409-414.

Parker C. O., Lanyon Y. H., Manning M., Arrigan D. W. M., Tothill I. E., Electrochemical immuno chip sensor for aflatoxin M1 detection, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5291-5298.

Pavanello S., Siwinska E., Mielzynska D., Clonfero E., GSTM1 null genotype as a risk factor for anti-BPDE-DNA adduct formation in mononuclear white blood cells of coke-oven workers, *Mutat. Res.* **2004**, *558*, 53-62.

Pena R., Alcaraz M. C., Arce L., Rios A., Valcarel M., Screening of aflatoxins in feed samples using a flow system coupled to capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* **2002**, *967*, 303-314.

Peraica M., Radic B., Lucic A., Pavlovic M., Toxic effect of mycotoxins in humans, *Bulletin of the World Health Organization* **1999**, *77*, 754-766.

Persson H., Lantto J., Ohlin M., A focused antibody library for improved hapten recognition, *J. Mol. Biol.* **2006**, *357*, 607-620.

Pichler H., Krska R., Szekacs A., Grasserbauer M., An enzyme-immunoassay for the detection of the mycotoxin zearalenone by use of yolk antibodies, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1998**, *362*, 176-177.

Piehler J., Brecht A., Valiokas R., Liedberg B., Gauglitz G., A high-density poly(ethylene glycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces, *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 473-481.

Pittet A., Modern methods and trends in mycotoxin analysis, *Mitt. Lebensm. Hyg.* **2005**, *96*, 2402-2411.

Plaza G. A., Krzysztof U., Tien A. J., Immunotechniques as a tool for detection of hydrocarbons. In: Soil biology, Vol. 5, Manual for soil analysis, Springer Verlag, Heidelberg, **2005**.

Plückthun A., Pack P., New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments, *Immunotechnol.* **1997**, *3*, 83-105.

Pohland A. E., Nesheim S., Friedman L., Ochratoxin A: a review, *Pure Appl. Chem.* **1992**, *64*, 1029-1046.

Pope M. E., Soste M. V., Eyford B. A., Anderson N. L., Pearson T. W., Anti-peptide antibody screening: selection of high affinity monoclonal reagents by a refined surface plasmon resonance technique, *J. Immunol. Meth.* **2009**, *341*, 86-96.

Poster D. L., Sander L. C., Wise S. A., In: The handbook of environmental chemistry, PAHs and related compounds, O. Hutzinger (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, **1998**.

Prieto-Blanco M. C., Iglesias M. P., Lopez-Mahia P., Lorenzo S. M., Rodriguez D. P., Simultaneous determination of carbonyl compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter by liquid chromatography-diode array detection-fluorescence detection, *Talanta* **2010**, *80*, 2083-2093.

Qinto M., Spadaccino G., Palermo C., Centonze D., Determination of aflatoxins in cereal flours by solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography and post-column photochemical derivatization-fluorescence detection, *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 8636-8641.

Qiu X.-Q., Wang H., Cai B., Wang L.-L., Yue S.-T., Small antibody mimetics comprising two complementarity-determining regions and a framework region for tumor targeting, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 921-929.

Quelven E., Tjollyn S., Rocher L., Mille G., Fourneron J.-D., Development of an antibody against polycyclic aromatic hydrocarbons, *Polycycl. Aromat. Comp.* **1999**, *13*, 93-103.

Radova Z., Holadova K., Hajslova J., Comparison of two clean-up principles for determination of trichothecenes in grain extract, *J. Chromatogr. A* **1998**, *829*, 259-267.

Ravindra K., Sokhi R., van Grieken R., Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source attribution, emission factors and regulation, *Atmos. Environ.* **2008**, *42*, 2895-2921.

Reiß J., Schimmelpilze - Lebensweise, Nutzen, Schaden, Behandlung, Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, **1986**.

Rheeder J. P., Marasas W. F., Vismer H. F., Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 2102-2105.

Rieger M., Cervino C., Saucedo J. C., Niessner R., Knopp D., Efficient hybridoma screening technique using capture antibody based microarrays, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 2373-2377.

Roda A., Bacigalupo M. A., Ius A., Minutello A., Development and applications of an ultrasensitive quantitative enzyme immuno-assay for benzo(a)pyrene in environmental samples, *Environ. Technol.* **1991**, *12*, 1027-1035.

Roda A., Pistillo A., Jus A., Armanino C., Baraldini M., Analysis of air particulate benzo[a]pyrene by a specific enzyme immunoassay: correlation with chemical and atmospheric parameters, *Anal. Chim. Acta* **1994**, *298*, 53-64.

Romer T. R., Boling T. M., MacDonald J. L., Gas-liquid-chromatographic determination of T-2 toxin and diacetoxyscirpenol in corn and mixed feeds, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1978**, *61*, 801-808.

Romero-Gonzales R., Vidal J. L. M., Aguilera-Luiz M. M., Frenich A. G., Application of conventional solid-phase extraction for multimycotoxin analysis in beer by ultrahigh-liquid performance chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 9385-9392.

Rosner H., Rohrmann B., Peiker G., Ochratoxin A in human serum, *Arch. Lebensmittelhygiene* **2000**, *51*, 104-107.

Rybicki B. A., Nock N. L., Savera A. T., Tang D., Rundle A., Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct formation in prostate formation, *Cancer Lett.* **2006**, *239*, 157-167.

Rychlik M., Asam S., Stable isotope dilution in mycotoxin analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 617-628.

Santella R., Immunological methods for detection of carcinogen-DNA damage in humans, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **1999**, *8*, 733-739.

Sapsford K. E., Taitt C. R., Fertig S., Moore M. H., Lassman M. E., Maragos C. M., Shriver-Lake L. C., Indirect competitive immunoassay for detection of aflatoxin B1 in corn and nut products using the array biosensor, *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 2298-2305.

Sasaki K., Glass T. R., Ohmura N., Validation of accuracy of enzyme-linked immunosorbent assay in hybridoma screening and proposal of an improved screening method, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1933-1939.

Sashwati R., Chandan K. S., cDNA microarrays screening in food safety, *Toxicology* **2006**, *221*, 128-133.

Satterwhite J. E., Pugh A. M., Danell A. S., Hvastkovs E. G., Electrochemical detection of *anti*-benzo[a]pyrene diol epoxide DNA damage on TP53 codon 273 oligomers, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 3327-3335.

Sauceda-Friebe J. S., Immunoanalytical determination of mycotoxin in food with an automatized instrumental platform, Dissertation, TU München, **2011**.

Scharnweber T., Suchanek M., Fisher M., Knopp D., Niessner R., 2001. Monoclonal antibody to polycyclic aromatic hydrocarbons based on a new benzo[a]pyrene immunogen, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2001**, *371*, 578-585.

Schauer C., Niessner R., Pöschl U., Polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air particulate matter: decadal and seasonal trends, chemical degradation, and sampling artifacts, *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 2861-2868.

Schauer C., Niessner R., Pöschl U., Analysis of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometry detection: air particulate matter, soot, and reaction product studies, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 725-736.

Schneider E., Usleber E., Märtlbauer E., Dietrich R., Terplan G., Multimycotoxin dipstick enzyme immunoassay applied to wheat, *Food Addit. Contam. A* **1995**, *12*, 387-393.

Schneider L., Pichler H., Krska R., An enzyme linked immunoassay for the determination of deoxynivalenol in wheat based on chicken egg yolk antibodies, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *367*, 98-100.

Scotti C., Gherardi E., Structural basis of affinity maturation of the TEPC15/Vκ45.1 anti-2-phenyl-5-oxazolone antibodies, *J. Mol. Biol.* **2006**, *359*, 1161-1169.

Seagraves S., Gelber Regen - Der Terror chemischer Kriegsführung, Universitas Verlag, München, **1983**.

Seal S. N., Monestier M., Radic M. Z., Diverse roles for the third complementarity determining region of the heavy chain (H3) in the binding of immunoglobulin Fv fragments to DNA, nucleosomes and cardiolipin, *Eur. J. Immunol.* **2000**, *30*, 3432-3440.

Shaw I., O'Reilly A., Charleton M., Kane M., Development of a high-affinity anti-domoic acid sheep scFv and its use in detection of the toxin in shellfish, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 3205-3212.

Shepherd G. S., Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins, *J. Chromatogr. A* **1998**, *815*, 31-39.

Shepherd G. S., Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 2468-2477.

Shim W.-B., Kolosova A. Y., Kim Y.-J., Yang Z.-Y., Park S.-J., Eremin S. A., Lee I.-S., Chung D. H., Fluorescence polarization immunoassay based on a monoclonal antibody for the detection of ochratoxin A, *Int. J. Food Sci. Technol.* **2004**, *39*, 829-837.

Shimada T., Yamazaki H., Foroozesh M., Hopkins N. E., Alworth W. L., Guengerich F. P., Selectivity of polycyclic inhibitors for human cytochrome P450s 1A1, 1A2, and 1B1, *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 1048-1056.

Simon R., Palme S., Anklam E., Determination of the 15 European priority PAHs in primary smoke condensates by GC-MS: collaborative validation, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* **2006a**, *98*, 772-781.

Simon R., Palme S., Anklam E., Single-laboratory validation of a gaschromatography-mass-spectrometry method for quantification of 15 European priority polycyclic aromatic hydrocarbons in spiked smoke condensates, *J. Chromatogr. A* **2006b**, *1103*, 307-313.

Simon R., Palme S., Anklam E., Validation (in-house and collaborative) of a method based on liquid chromatography for the quantitation of 15 European priority polycyclic aromatic hydrocarbons in smoke flavourings: HPLC-method validation for 15 EU priority PAH in smoke condensates, *Food Chem.* **2007**, *104*, 876-887.

Simon R., Gomez-Ruiz J. A., Wenzl T., Results of an European inter-laboratory comparison study on the determination of the 15 + 1 EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in liquid smoke condensates, *Food Chem.* **2010**, *123*, 819-826.

Sims P., Grover P. L., Swaisland A., Pal. K., Hewer A., Metabolic activation of benzo[a]pyrene proceeds by a diol-epoxide, *Nature* **1974**, *252*, 326-328.

Sinha R. C., Savard M. E., Lau R., Production of monoclonal antibodies for the specific detection of deoxynivalenol and 15-acetyldeoxynivalenol by ELISA, *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1740-1744.

Siuti N., Kelleher N. L., Decoding protein modifications using top-down mass spectrometry, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 817-821.

Skerra A., Plückthun A., Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*, *Science* **1988**, *240*, 1038-1041.

Smith C. J., Evolution of immunoassay. In: Development and application of immunoassay for food analysis, Rittenberg (Hrsg.), Elsevier Applied Science, London, **1990**.

Smith D. S., Eremin S. A., Fluorescence polarization immunoassays and related methods for simple high-throughput screening of small molecules, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1499-1507.

Spanjier M. C., Rensen P. M., Scholten J. M., LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs, *Food Addit. Contam. A*, **2008**, *25*, 472-489.

Spier C. R., Bromage E. S., Harris T. M., Unger M. A., Kaattari S. L., The development and evaluation of monoclonal antibodies for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Anal. Biochem.* **2009**, *387*, 287-293.

Stöger E., Sack M., Nicholson L., Fischer R., Christou P., Recent progress in plantibody technology, *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11*, 2439-2457.

Sulyok M., Krska R., Schuhmacher R., Application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method to multi-mycotoxin determination in raw cereals and evaluation of matrix effects, *Food Addit. Contam. A* **2007**, *24*, 1184-1195.

Sun S. Q., Mo W. J., Liu S. Y., Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 708-712.

Sundberg K., Widersten M., Seidel A., Mannervik B., Jernstrom B., Glutathion conjugation of bay- and fjord-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by glutathione transferases M1-1 and P1-1, *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 1221-1227.

Tang D., Saucedo J. C., Lin Z., Ott S., Basova E., Goryacheva I., Biselli S., Lin J., Niessner R., Knopp D., Magnetic nanogold microspheres-based lateral-flow immunodipstick for rapid detection of aflatoxin B1 in food, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *25*, 514-518.

Thirumala-Devi K., Mayo M. A., Reddy S. V., Delfosse P., Production of polyclonal antibodies against ochratoxin A and its detection in chilies by ELISA, *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5079-5082.

Tonegawa S., Somatic generation of antibody diversity, *Nature* **1983**, *302*, 575-581.

Traviesa-Alvarez J. M., Sanchez-Barragan I., Costa-Fernandez J. M., Pereiro R., Sanz-Medel A., Room temperature phosphorescence optosensing of benzo[a]pyrene in water using halogenated molecularly imprinted polymers, *Analyst* **2007**, *132*, 218-223.

Tseng W.-L., Chang H.-T., Hsu S.-M., Chen R.-J., Lin S., Immunoaffinity capillary electrophoresis: determination of binding constants and stoichiometry for antibody-antigen interaction, *Electrophoresis* **2002**, *23*, 836-846.

Tsumoto K., Yokota A., Tanaka Y., Ui M., Tsumuraya T., Fujii I., Kumagai I., Nagumo Y., Oguri H., Inoue M., Hiramama M., Critical contribution of aromatic rings to specific recognition of polyether rings, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 12259-12266.

Tsunoda M., Chemiluminescence detection with separation techniques for bioanalytical applications, *Bioanal. Rev.* **2009**, *1*, 25-34.

Turner N. W., Subrahmanyam S., Piletsky S. A., Analytical methods for the determination of mycotoxins: a review, *Anal. Chim. Acta* **2009**, *632*, 168-180.

Uracca J. L., Marazuela M. D., Merino E. R., Orellana G., Moreno-Bondi M. C., Molecular imprinted polymers with a streamlined mimic for zearalenone analysis, *J. Chromatogr. A* **2006**, *1116*, 127-134.

Uracca J. L., Carbajo M. C., Torralvo M. J., Gonzales-Vazquez J., Orellana G., Moreno-Bondi M. C., Effect of the template and functional monomer on the textural properties of molecular imprinted monomers, *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24*, 155-161.

Urusov A. E., Zherdev A. V., Dzantiev B. B., Immunochemical Methods of Mycotoxin Analysis (Review), *Appl. Biochem. Microbiol.* **2010**, *46*, 253-266.

van der Gaag B., Spath S., Dietrich H., Stigter E., Boonzaaijer G., van Osenbruggen T., Koopal K., Biosensors and multiple mycotoxin detection, *Food Control* **2003**, *14*, 251-254.

van der Linden R. H., Frenken L. G., de Geus B., Harmsen M. M., Ruuls R. C., Stok W., de Ron L., Wilson S., Davis P., Verrips C. T., Comparison of physical chemical properties of llama V_HH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1431*, 37-46.

Vendl O., Berthiller F., Crews C., Krska R., Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, and their major masked metabolites in cereal-based food by LC-MS-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *385*, 1347-1354.

Vo-Dinh T., Tromberg B. J., Griffin G. D., Ambrose K. R., Sepaniak M. J., Gardenhire E. M., Antibody-based fiberoptics biosensor for the carcinogen benzo(a)pyrene, *Appl. Spectrosc.* **1987**, *41*, 735-738.

Vo-Dinh T., Fetzer J., Campiglia A. D., Monitoring and characterization of polyaromatic compounds in the environment, *Talanta* **1998**, *47*, 943-969.

Voet D., Voet J. G., Pratt C. W., Lehrbuch der Biochemie, *Wiley VCH* Weinheim, **2002**.

Wang H., Campiglia D., Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water samples by solid-phase nanoextraction and high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8202-8209.

Wang Y., Wei D., Yang Y., Xing W., Li Y., Deng A., Development of a highly sensitive and specific monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of Sudan I in food samples, *Talanta* **2009**, *77*, 1783-1989.

Wang C., Lin M., Liu Y., Lei H., A dendritic nanosilica-functionalized electrochemical immunosensor with sensitive enhancement for the rapid screening of benzo[a]pyrene, *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 1988-1994.

Wark K. L., Hudson P. J., Latest technologies for the enhancement of antibody affinity, *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2006**, *58*, 657-670.

Weinstein I. B., Jeffrey A. M., Jennette K. W., Blobstein S. H., Harvey R. G., Harris C., Autrup H., Kasai H., Nakanishi K., Benzo(a)pyrene diol epoxides as intermediates in nucleic acid binding in vitro and in vivo, *Science* **1976**, *193*, 592-595.

Weller M. G., Schuetz A. J., Winklmair M., Niessner R., Highly parallel affinity sensor for the detection of environmental contaminants in water, *Anal. Chim. Acta* **1999**, *393*, 29-41.

Weller M. G., Immunochromatographic techniques - a critical review, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 635-645.

WHO, WHO Global strategy for food safety: safer food for better health. World Health Organization (WHO), Geneva, **2002**.

Wilcke W., Lilienfein J., Lima S. D., Zech W., Contamination of highly weathered urban soils in Uberlandia, Brazil, *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **1999**, *162*, 539-548.

Wolter A., Niessner R., Seidel M., Preparation and characterization of functional poly(ethylene glycol) surfaces for the use of antibody microarrays, *Anal. Chem.*, **2007**, *79*, 4529-4537.

Wolter A., Niessner R., Seidel M., Detection of Escherichia coli O157:H7, Salmonella typhimurium, and Legionella pneumophila in water using a flow-through chemiluminescence microarray readout system, *Anal. Chem.*, **2008**, *80*, 5854-5863.

Wood A. W., Chang R. L., Levin W., Thakker D. R., Yagi H., Sayer J. M., Jerina D. M., Conney A. H., Mutagenicity of the enantiomers of the diastereomeric bay-region benzo(c)phenanthrene 3,4-diol-1,2-epoxides in bacterial and mammalian cells, *Cancer Res.* **1984**, *44*, 2320-2324.

Xu J. L., Davis M. M., Diversity in the CDR3 region of V_H is sufficient for most antibody specificities, *Immunity* **2000**, *13*, 37-45.

Yakovleva L., Handy C. J., Yagi H., Sayer J. M., Jerina D. M., Shuman S., Intercalating polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts poison DNA religation by vaccinia topoisomerase and act as roadblocks to digestion by exonuclease III, *Biochemistry* **2006**, *46*, 7644-7653.

Yan B., Valliere-Douglass J., Brady L., Steen S., Han M., Pace D., Elliott S., Yates Z., Han Y., Balland A., Wang W., Pettit D., Analysis of post-translational modifications in recombinant monoclonal antibody IgG1 by reversed-phase liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **2007**, *1164*, 153-161.

Yang S. K., McCourt D. W., Roller P. P., Gelboin H. V., Enzymatic conversion of benzo(a)pyrene leading predominantly to the diol-epoxide r-7,t-8-dihydroxy-t-9,10-oxy-1,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene through a single enantiomer of r-7,t-8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene, *Proc. Natl Acad. Sci.* **1976**, *73*, 2594-2598.

Yang J., Wang S., Liu J., Raghani A., Determination of tryptophan oxidation of monoclonal antibody by reversed phase high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* **2007**, *1156*, 174-182.

Yang L., Ding H., Gu Z., Zhao J., Chen H., Tian F., Chen Y. Q., Zhang H., Chen W., Selection of single-chain fragment variables with direct coating of aflatoxin B1 to enzyme-linked immunosorbent assay plates, *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 8927-8932.

Yau K. Y. F., Dubuc G., Li S., Dirama T., MacKenzie R., Jermutus L., Hall J. C., Tanha J., Affinity maturation of a V_HH by mutational hotspot randomization, *J. Immunol. Meth.* **2005**, *297*, 213-224.

Ying H., Liu H., Identification of an alternative signal peptide cleavage site of mouse monoclonal antibodies by mass spectrometry, *Immunol. Lett.* **2007**, *111*, 66-68.

Yu F.-Y., Chu F. S., Production and characterization of monoclonal antibodies against fumonisin B1, *Food Agric. Immunol.* **1999**, *11*, 297-306.

Yuan Q., Clarke J. R., Zhou H. R., Linz J. E., Pestka J. J., Hart L. P., Molecular cloning, expression, and characterization of a functional single-chain Fv antibody to the mycotoxin zearalenone, *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 263-269.

Zeck A., Eikenberg A., Weller M. G., Niessner R., Highly sensitive immunoassay based on a monoclonal antibody for [4-arginine]microcystins, *Anal. Chim. Acta* **2001**, *441*, 1-13.

Zhang D., Li P., Zhang Q., Zhang W., Huang Y., Ding X., Jiang J., Production of ultrasensitive generic monoclonal antibodies against major aflatoxins using a modified two-step screening method, *Anal. Chim. Acta* **2009a**, *636*, 63-69.

Zhang Z., Pan H., Chen X., Mass spectrometry for structural characterization of therapeutic antibodies, *Mass Spectrom. Rev.* **2009b**, *28*, 147-176.

Zhang X., Zhang C., Liu Y., Yu X., Liu X., Construction of scFv phage display library with hapten-specific repertoires and and characterization of anti-ivermectin fragment isolated from the library, *Eur. Food Res. Technol.* **2010**, *231*, 423-430.

Zheng Z., Humphrey C. W., King R. S., Richard J. L., Validation of an ELISA test kit for the detection of total aflatoxins in grain and grain products by comparison with HPLC, *Mycopathologia* **2005**, *159*, 255-263.