



**TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie

Lehrstuhl für Analytische Chemie

**Untersuchung molekularer Wechselwirkungen von  
*anti*-Benzo[a]pyren-Antikörpern mit polyzyklischen aromatischen  
Kohlenwasserstoffen und Entwicklung einer immunologischen  
Bestimmungsmethode für Speiseöle**

**Michael Pschenitza**

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. apl. Prof. Dr. Dietmar Knopp

Die Dissertation wurde am 02.03.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Chemie am 20.04.2015 angenommen.



## Danksagung

*Diese Arbeit entstand in der Zeit vom April 2011 bis Juni 2014 am Lehrstuhl für Analytische Chemie der Technischen Universität München unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner. Die Arbeit wurde durch ein Stipendium der Hanns-Seidel-Stiftung e. V. gefördert.*

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Reinhard Nießner für die Möglichkeit, das interessante und anspruchsvolle Projekt an seinem Lehrstuhl durchführen zu können. Besonders möchte ich mich für den Zugang zur umfangreichen Laborinfrastruktur bedanken, das stete Vertrauen sowie die Unterstützung der Arbeit.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dietmar Knopp für seine intensive Betreuung und Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit. Darüber hinaus bedanke ich mich für seine vielfältigen Anregungen, sein Vertrauen und die sehr geschätzten Freiheiten in der Forschung.

Bedanken möchte ich mich bei meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Michael Groll und Astrid König vom Lehrstuhl für Biochemie der TU München sowie Prof. Dr. Arne Skerra, Irmgard Neumaier und Dr. Andreas Eichinger vom Lehrstuhl für Biologische Chemie der TUM für die gute Zusammenarbeit und ihre große Unterstützung im Bereich der Fab-Herstellung und Kristallisation. Prof. Skerra und Dr. Eichinger danke ich zudem für wertvolle Anregungen und Kommentare zu dieser Arbeit.

Der squarix GmbH danke ich für die Produktion und Reinigung enzymatisch hergestellter Antikörperfragmente.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Rudolf Hackenberg (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit) für die Bereitstellung kontaminierter Speiseölproben sowie die Durchführung von GC/MS-Messungen.

Bei Herrn Helmut Krause vom Lehrstuhl für Biochemie der Technischen Universität München bedanke ich mich für die Aufnahmen von MALDI-Spektren.

Sehr herzlicher Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen Dr. Xaver Karsunke, Dr. Susanna Oswald, Anna Neumann und Maria Hübner für ihre große Unterstützung im Labor und die gute Atmosphäre am Arbeitsplatz. Außerdem gilt mein besonderer Dank Chrysanthos Stergiopoulos und Tanja Baumgartner für die Unterstützung im Labor.

Für das Korrigieren der Arbeit möchte ich mich bei Maria Hübner und Anna Neumann bedanken. Des Weiteren danke ich meinen Kollegen und Kolleginnen Dr. Johannes Schmid, Dr. Klaus Wutz, Dr. Christoph Haisch, Kathrin Schwarzmeier, Dr. Clemens Helmbrecht, Susanna Mahler, Christine Sternkopf, Sandra Lengger, Dr. Henrike Bladt und Benedikt Grob, sowie allen hier nicht namentlich Erwähnten.

Mein ganz besonderer und tief empfundener Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie für ihre stets uneingeschränkte Unterstützung während der gesamten Arbeit.

**Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht.**

**Lux G., Langer A., Pschenitza M., Karsunke X., Strasser R., Niessner R., Knopp D., Rant U.,** Detection of the carcinogenic water pollutant benzo[a]pyrene with an electro-switchable biosurface, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 4538-4545.

**Pschenitza M., Hackenberg R., Niessner R., Knopp D.,** Analysis of benzo[a]pyrene in vegetable oil using molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) coupled with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Sensors* **2014**, *14*, 9720-9737.

**Pschenitza M., Gavrilova E. S., Tarasov S. A., Knopp D., Niessner R., Epstein O. I.,** Application of heterogeneous immunoassay for the quality control testing of release-active forms of diclofenac, *Int. Immunopharmacol.* **2014**, *21*, 225-230.

**Eisold U., Kupstat A., Klier D., Primus P.-A., Pschenitza M., Niessner R., Knopp D., Kumke M. U.,** Probing the physicochemical interactions of 3-hydroxy-benzo[a]pyrene with different monoclonal and recombinant antibodies by use of fluorescence line-narrowing spectroscopy, *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 3387-3394.

**Wang Y., Yang H., Pschenitza M., Niessner R., Li Y., Knopp D., Deng A.,** Highly sensitive and specific determination of mercury(II) ion in water, food and cosmetic samples with an ELISA based on a novel monoclonal antibody, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 2519-2528.

**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. Methods* **2011**, *371*, 81-90.



'S isch, wia's isch, und's gaut, wia's gaut.

*Allgäuer Lebensweisheit*



## Inhaltsverzeichnis

<b>I Einleitung und Problemstellung</b> .....	<b>1</b>
<b>II Theoretischer Hintergrund</b> .....	<b>4</b>
<b>1 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe</b> .....	<b>5</b>
1.1 Entstehung und Verbreitung .....	5
1.2 Chemische und toxikologische Eigenschaften von Benzo[a]pyren .....	9
1.3 Toxikologische Relevanz in Lebensmitteln .....	12
<b>2 Analytik polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe</b> .....	<b>16</b>
2.1 Probennahme, Extraktion und Aufreinigung .....	16
2.2 Molekular geprägte Polymere zur Festphasenextraktion .....	19
2.3 Klassische Trenn- und Detektionsverfahren .....	23
2.4 Immunanalytische Verfahren .....	25
<b>3 Antikörper</b> .....	<b>30</b>
3.1 Aufbau und Struktur von Antikörpern .....	30
3.2 Herstellung polyklonaler und monoklonaler Antikörper .....	33
3.3 Herstellung von Antikörperfragmenten .....	37
3.4 Charakterisierung der Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen .....	41

<b>III Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>45</b>
<b>1 Herstellung und Charakterisierung von Antikörperfragmenten gegen B[a]P .....</b>	<b>46</b>
1.1 Synthese von Hapten-Protein-Konjugaten .....	46
1.2 Herstellung von Fab-Fragmenten durch enzymatische Spaltung .....	48
1.2.1 Spaltung von IgG mit Papain .....	48
1.2.2 Affinitätsbestimmung mittels ELISA.....	56
1.2.3 Bestimmung der Kreuzreaktivitäten.....	60
1.3 Rekombinante Herstellung von Fab-Fragmenten .....	62
1.3.1 Herstellung und Reinheitskontrolle.....	62
1.3.2 Bestimmung der Affinität mittels ELISA.....	70
1.3.3 Messung von Affinitätskonstanten mittels Oberflächenplasmonenresonanz.....	74
1.4 Herstellung von Einkristallen für den Fab/Hapten-Komplex .....	78
<b>2 ELISA-Verfahren zur Bestimmung von Benzo[a]pyren in Speiseölen .....</b>	<b>81</b>
2.1 Extraktion basierend auf molekular geprägten Polymeren (MIPs).....	81
2.1.1 Optimierung der MIP-Synthese .....	81
2.1.2 Entwicklung einer Extraktionsmethode.....	83
2.1.3 B[a]P-Extraktion für eine Quantifizierung mittels ELISA .....	89
2.2 Test weiterer Extraktionsverfahren.....	94
2.2.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion mit polaren Lösemitteln .....	94
2.2.2 Test verschiedener Materialien für eine Festphasen-Extraktion.....	97
<b>IV Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>104</b>

<b>V Experimenteller Teil.....</b>	<b>109</b>
<b>1 Geräte und Materialien.....</b>	<b>110</b>
1.1 Geräte.....	110
1.2 Software.....	111
1.3 Antikörper und Antigene.....	111
1.4 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....	112
1.5 Pufferlösungen.....	115
<b>2 Standardprozeduren.....</b>	<b>119</b>
2.1 Synthese von Hapten-Protein-Konjugaten.....	119
2.2 Enzymatische Herstellung von Antikörperfragmenten.....	119
2.2.1 Spaltung von Maus-IgG mit Papain.....	119
2.2.2 SDS-PAGE.....	120
2.3 Fab-Charakterisierung.....	120
2.3.1 Indirekt kompetitiver ELISA.....	120
2.3.2 Bestimmung der Kreuzreaktivitäten.....	121
2.3.3 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie.....	121
2.4 Kristallisation des Fab-B[a]P-Komplexes.....	122
2.5 Herstellung molekular geprägter Polymere.....	123
2.6 Bestimmung der B[a]P-Bindekapazität.....	123
2.7 MIP-Selektivität.....	123
2.8 Kreuzreaktivität des monoklonalen Antikörpers.....	124
2.9 Quantifizierung von B[a]P in Speiseölen.....	124
2.9.1 Probenvorbereitung und Extraktion.....	124
2.9.2 Indirekt kompetitiver ELISA.....	125
2.10 Flüssig-Flüssig-Extraktion mit DMSO.....	126
2.11 Normalphasen-SPE mit Silica.....	126
<b>VI Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>127</b>
<b>VII Literaturverzeichnis.....</b>	<b>134</b>



# **I Einleitung und Problemstellung**

Um die Sicherheit unserer Lebensmittel vor chemischen oder biologischen Kontaminanten zu gewährleisten, existieren in Deutschland und der gesamten Europäischen Union strikte Grenzwerte sowie ein flächendeckendes Kontrollnetzwerk. Speziell zur Kontrolle von chemischen Kontaminanten werden mehrheitlich die etablierten und validierten chromatographischen Verfahren, entweder basierend auf Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) oder Gaschromatographie (GC), kombiniert mit verschiedenen Detektoren, eingesetzt. Auch bei der Quantifizierung der ubiquitären, hochgradig kanzerogenen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAKs) liefern chromatographische Methoden sensitive und verlässliche Analyseergebnisse, weisen jedoch aufgrund der erforderlichen zeit- und kostenintensiven Probenvorbereitung Nachteile hinsichtlich Analysendauer und –kosten auf. Abhilfe können hier die zunehmend auch in der organischen Spurenanalytik etablierten immunologischen Verfahren schaffen, die durch die spezifische Antigen-Antikörper-Wechselwirkung Messungen selbst in komplexen Matrices erlauben und so eine aufwendige Probenvorbereitung oftmals überflüssig machen. Wegen der damit verbundenen kürzeren Analysendauer sowie ihrer einfachen Handhabung werden immunanalytische Methoden meist zu Screening-Zwecken eingesetzt.

Entscheidend für den verlässlichen immunologischen Nachweis von PAKs im gesetzlich geforderten ng/L-Bereich ist das Vorhandensein hochaffiner und nachweisstarker anti-PAK-Antikörper. Da vor allem das gut untersuchte und stark toxische Benzo[a]pyren (B[a]P) mit sehr niedrigen Grenzwerten belegt ist, wurden in vorangegangenen Arbeiten hochaffine monoklonale Antikörper sowie rekombinante Antikörperfragmente (scFv) generiert. Zur Messung des für B[a]P in der Trinkwasserverordnung geforderten gesetzlichen Höchstwerts von 10 ng/L erwiesen sich beide Ansätze aber als nicht nachweisstark genug. Ziel dieser Arbeit war daher zum einen eine systematische Untersuchung der Paratop-Epitop-Wechselwirkung der nachweisstärksten Antikörper und darüber hinaus die Entwicklung neuer, sensitiver Analyseverfahren für B[a]P in Lebensmittelmatrices.

Die Wechselwirkung des Antikörpers mit B[a]P sollte vor allem auf ihre strukturellen Grundlagen hin untersucht werden. Die Methode der Wahl zur strukturellen Aufklärung von Protein-Wechselwirkungen ist die Röntgenkristallographie an winzigen Einkristallen des Protein-Hapten-Komplexes. Da zur Strukturbestimmung nur die Antigenbindestelle des Antikörpers relevant ist, sollten zunächst Antikörperfragmente in ausreichender Menge

hergestellt werden, wobei hierfür Fab-Fragmente gewählt wurden. Diese lassen sich traditionell durch Spaltung des ganzen Antikörpers mit entsprechenden Enzymen oder in jüngerer Zeit auch durch rekombinante Expression in Bakterienzellen herstellen. Beide Verfahren bieten gewisse Vorteile, so dass die Fab-Produktion im Zweifelsfall auf zwei Arten erfolgen sollte. Die Identifizierung geeigneter Kristallisationsbedingungen erfolgt typischerweise in stark automatisierten Hochdurchsatz-Verfahren, in denen durch Kombination geeigneter Zusätze eine Vielzahl an Kristallisationsbedingungen getestet werden kann. Nach der Bildung passender Einkristalle schließlich sollte die Strukturbestimmung über Röntgenbeugung und computerbasierte Auswertung der Beugungsmuster erfolgen.

In der klassischen Lebensmittelanalytik können bedenklich hohe PAK-Konzentrationen vor allem in Speiseölen und darin eingelegten, stark fetthaltigen Speisen wie Fisch und Meeresfrüchten angetroffen werden, weiterhin vor allem in geräucherten oder gegrillten Fleisch- und Fischzubereitungen. In aller Regel sind auch bei in Öl eingelegten Nahrungsmitteln schlecht verarbeitete oder billig produzierte Pflanzenöle Ursache der Kontamination, so dass eine schnelle immunanalytische Methode zur Bestimmung der PAK-Belastung in Ölen, die auch hier anhand einer Messung der B[a]P-Konzentration abgeschätzt wird, von Interesse ist. Aufgrund der sehr komplexen und zunächst komplett wasserunlöslichen Öl-Matrix ist für eine sensitive immunologische B[a]P-Quantifizierung die Entwicklung einer effektiven, gleichzeitig aber schnellen und kostengünstigen Extraktionsmethode entscheidend. Da eine B[a]P-Bestimmung in Ölen bisher ausschließlich mit chromatographischen Verfahren erfolgt, sollten hierfür zunächst verschiedene Extraktionsprotokolle entwickelt und getestet werden, um schließlich das geeignetste auszuwählen. Die Detektion sollte mittels Enzymimmunoassay (ELISA) basierend auf den bereits vorhandenen monoklonalen anti-B[a]P-Antikörpern erfolgen. Die Anwendbarkeit der entwickelten Methode sollte durch Messung von belasteten Proben beurteilt werden.

## **II Theoretischer Hintergrund**

# 1 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

## 1.1 Entstehung und Verbreitung

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs) weisen definitionsgemäß mindestens zwei anellierte aromatische Ringsysteme auf, die in einer Ebene liegen. Die Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten, die sich daraus ergibt, führt zu einer hohen strukturellen Variabilität innerhalb der Substanzklasse, die in einer Fülle an Verbindungen resultiert. So beinhalten selbst die engsten Definitionen immer noch mehrere hundert verschiedene Moleküle, und werden noch heteroatomare Derivate sowie alkylierte Verbindungen miteinbezogen, ergibt sich eine schier unendliche Vielfalt an Vertretern (Harvey, 1997). Sie alle teilen sich Eigenschaften wie eine sehr geringe Polarität, niedrige Dampfdrücke, sowie die Bildung farbloser, gelber oder grünlicher kristalliner Feststoffe mit vergleichsweise hohen Schmelz- und Siedepunkten. PAKs sind darüberhinaus meist ungeladen und viele Verbindungen weisen eine starke Fluoreszenz auf. Im Interesse der Forschung stehen PAKs mit vier bis sieben Ringen, die hochgradig kanzerogene sowie akut toxische Substanzen darstellen und daher innerhalb der PAKs die am besten untersuchte Gruppe bilden (Harvey, 1985).

Die Bildung des aromatischen Grundgerüsts geschieht durch unvollständige Verbrennung bei allen Arten von Verbrennungsprozessen organischen Materials, was PAKs zu einer ubiquitären Klasse von Umweltschadstoffen macht. Aus den verschiedensten Kohlenwasserstoffen bilden sich hierbei zunächst kleine aromatische Polyzyklen, die wiederum durch Wachstum und Koagulation größere Partikel bilden können und somit als Nukleationskeime eine wesentliche Rolle bei der Rußbildung spielen (Richter, 2000). Frühe Vorschläge zur PAK-Bildung zu Anfang der 60er Jahre gingen meist von Pyrolysereaktionen kleinerer aromatischer Verbindungen aus (Badger, 1959; Badger, 1960a), wobei bald erkannt wurde, dass nichtaromatische Vorläufermoleküle wie Acetylen oder Olefine ebenso zur Bildung von PAKs führen (Badger, 1960b, Richter, 2002). In den folgenden Jahrzehnten wurde vor allem die Reaktion von Acetylen zu polyaromatischen Verbindungen intensiv untersucht. Hierbei wird im Wesentlichen von einer Anlagerung von Acetylenmolekülen an in der Flamme gebildete Alkylradikale unter Bildung olefinischer Strukturen und Ringschlussreaktionen ausgegangen (Frenklach, 2002). Die so entstandenen kleinen Aryl-Radikale werden durch Reaktion mit weiteren Acetylen-Molekülen sukzessive in größere aromatische Systeme umgewandelt, die als Keime für Rußpartikel dienen können (Long, 1967; Schauer,

2004a). Tatsächlich beinhaltet jedoch vor allem die Bildung der aromatischen Ringe wohl eine Vielzahl von Reaktionen (unter anderem wurden Propargyl- oder Cyclopentadienylradikale als zentrale Bausteine vorgeschlagen (Frenklach, 2002; Xi, 2006)), was den Ablauf der komplexen Reaktionsnetzwerke nur sehr schwer beschreibbar macht. In jedem Fall entsteht im Zuge dieser Verbrennungsreaktionen neben den großen aromatischen Polyzyklen der Rußpartikel auch ein Gemisch der verschiedenen kleineren, toxischen PAKs. Aufgrund der Entstehung von PAKs bei allen Arten von Verbrennungsprozessen sowie Verkokung oder Verschwelung organischen Materials ergibt sich eine Vielzahl an natürlichen und anthropogenen Quellen. Bedeutende anthropogene Quellen sind vor allem industrielle Verbrennungsprozesse fossiler Brennstoffe. Besonders die Verbrennung von Kohle in Kohlekraftwerken und Kokereien, aber auch Kraftfahrzeuge und Heizungen in Privathaushalten stellen wichtige Emissionsquellen dar (Suess, 1976; Ravindra, 2008; Oanh, 1996). Auf natürlichem Weg werden PAKs vor allem bei Vulkanausbrüchen und Waldbränden in nennenswertem Ausmaß in die Atmosphäre freigesetzt (Ravindra, 2008), weiterhin enthalten Torf, Kohle und Rohöl oftmals PAKs in vergleichsweise hohen Konzentrationen (Nießner, 2010). In der Atmosphäre treten PAKs in Abhängigkeit ihrer Ringgröße entweder gasförmig oder, wenn ihr Dampfdruck aufgrund der Molekülgröße zu gering ist, adsorbiert meist an Rußpartikeln auf. Typischerweise sind vor allem PAKs mit zwei bis drei Ringen (Naphthalin, Anthracen, etc.) in der Gasphase, während die Vertreter mit mehr als vier Ringen praktisch ausschließlich partikelgebunden vorliegen (Suess, 1976; Schauer, 2004a). Ein Eintrag in die Geo- und Hydrosphäre kann schließlich durch trockene oder nasse Deposition sowie Auswaschung erfolgen, weshalb in Oberflächengewässern häufig erhöhte PAK-Konzentrationen gefunden werden. Der Eintrag ins Grundwasser ist hingegen meist vernachlässigbar, so dass zwar atmosphärische PAKs zur Kontamination von Trinkwasser beitragen können (Manoli, 1999; Wang, 2008; Liang, 2008), in Deutschland jedoch geteerte Wasserrohrleitungen als Hauptgrund für kontaminiertes Trinkwasser gelten (Matschulat, 2005). In Rohren, die zum Schutz vor Korrosion mit Teer ausgekleidet sind, kann es vor allem bei Druckstößen, Veränderung von Biofilmen oder Umkehr der Fließrichtung zur Freisetzung von PAKs ins Trinkwasser kommen (Maier, 2000). Auch wenn mittlerweile wirksamere und weniger risikoreiche Alternativen zum Korrosionsschutz von Wasserrohren zur Trinkwasserführung gefunden sind, sind die alten Rohre teilweise noch immer in Betrieb und können PAK-Belastungen in Trinkwasser verursachen. Neben belastetem Trinkwasser oder Abgas kommen auch gegrillte, geröstete oder geräucherte sowie

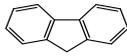
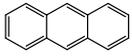
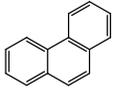
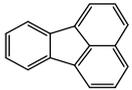
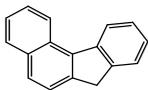
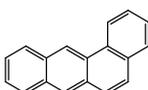
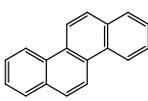
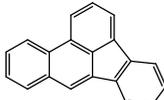
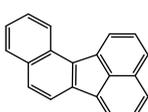
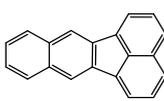
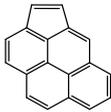
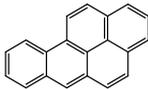
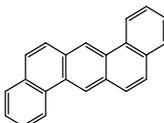
in Öl eingelegte Lebensmittel als Expositionsquelle des Menschen in Betracht (Gilbert, 1994; Danyi, 2009), da es bei diesen Zubereitungen zum Kontakt mit Verbrennungsprodukten kommt (Ravindra, 2008; Houessou, 2007; siehe Kapitel 1.3). Auch Tabakrauch weist generell hohe PAK-Gehalte auf (Gundel, 1994). Die Verbrennung von fossilen Energieträgern oder Biokraftstoffen, vor allem aber photochemische Reaktionen der Polyzyklen in der Atmosphäre unter anderem mit Stickoxiden oder Ozon können zur Entstehung heteroatomar substituierter Derivate führen, vor allem zu Nitro-, Amino- und Oxy-PAKs (Aldehyde, Ketone, Epoxide), deren toxisches Potential das der unsubstituierten PAKs deutlich übersteigen kann (Schauer, 2004b; Ravindra, 2008; Schauer, 2003; Letzel, 1999). Das ubiquitäre Vorkommen von PAKs macht eine Exposition unvermeidlich, so dass wegen des daraus resultierenden Gesundheitsrisikos eine effektive Überwachung der PAK-Belastung aus unterschiedlichsten Quellen nötig ist.

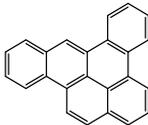
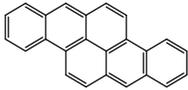
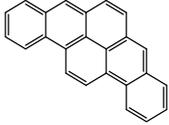
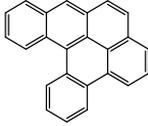
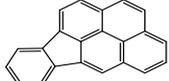
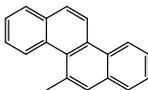
Aufgrund des stark kanzerogenen Potentials zahlreicher PAKs (u. a. Lungen-, Haut- und Prostatakrebs; Rybicki, 2005; Hecht, 2010) sowie ihrer Wirkung als endokrine Disruptoren (Kumar, 2010) wurden von der US-Umweltbehörde EPA 16 PAKs unterschiedlicher Molekülgröße und Kanzerogenität in ihre *priority pollutant list* aufgenommen (EPA, 1982; Abb. 1), um so eine effektive Abschätzung der Gesamt-PAK-Belastung untersuchter Proben zu ermöglichen. In der EU wurden aufgrund ihrer Genotoxizität 15 PAKs durch den Wissenschaftlichen Lebensmittelbeirat (*scientific committee for food; SCF*) zur Überwachung ausgewählt, wobei B[a]P wegen seiner hohen Kanzerogenität als Marker-Substanz herangezogen werden sollte (Preedy, 2010). Von diesen 15 PAKs wurden von der *International Agency for Research on Cancer (IARC)* zwölf als Kanzerogene eingestuft und den IARC-Klassen 1, 2A oder 2B (krebserregend, wahrscheinlich krebserregend bzw. möglicherweise krebserregend) zugeordnet (Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Molekülstrukturen und Kanzerogenitätsklasse der in den USA und der EU als prioritäre Umweltschadstoffe eingestuften PAKs. IARC-Gruppe 1: krebserregend, Gruppe 2A: wahrscheinlich krebserregend, Gruppe 2B: möglicherweise krebserregend, Gruppe 3: keine krebserregende Wirkung bekannt.

Bezeichnung	Abkürzung	Struktur	US-EPA	EU-SCF	IARC
Naphthalin	Nap		X		2B
Acenaphthen	Acn		X		3

## II THEORETISCHER HINTERGRUND

Acenaphthylen	Acy		X		k.A.
Fluoren	Flu		X		3
Anthracen	Ant		X		3
Phenanthren	Phe		X		3
Fluoranthen	Fla		X		3
Benzo[ <i>c</i> ]fluoren	B[ <i>c</i> ]F			X	3
Pyren	Pyr		X		3
Benzo[ <i>a</i> ]anthracen	B[ <i>a</i> ]A		X	X	2B
Chrysen	Chr		X	X	2B
Benzo[ <i>b</i> ]fluoranthen	B[ <i>b</i> ]F		X	X	2B
Benzo[ <i>j</i> ]fluoranthen	B[ <i>j</i> ]F			X	2B
Benzo[ <i>k</i> ]fluoranthen	B[ <i>k</i> ]F		X	X	2B
Cyclopenta[ <i>cd</i> ]pyren	Cpp			X	2A
Benzo[ <i>a</i> ]pyren	B[ <i>a</i> ]P		X	X	1
Dibenzo[ <i>ah</i> ]anthracen	DhA		X	X	2A

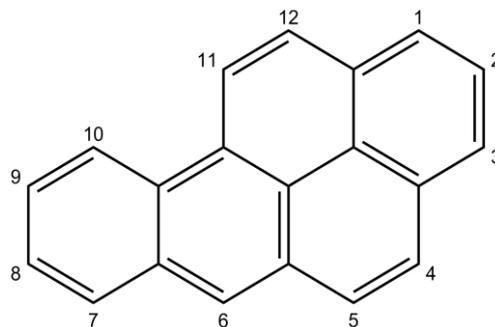
Benzo[ <i>ghi</i> ]perylen	BgP		X	X	3
Dibenzo[ <i>ae</i> ]pyren	DeP			X	3
Dibenzo[ <i>ah</i> ]pyren	DhP			X	2B
Dibenzo[ <i>ai</i> ]pyren	DiP			X	2B
Dibenzo[ <i>al</i> ]pyren	DlP			X	2A
Indeno[1,2,3- <i>cd</i> ]pyren	IcP		X	X	2B
5-Methylchrysen	5Mc			X	2B

## 1.2 Chemische und toxikologische Eigenschaften von Benzo[*a*]pyren

Die erstmalige Beschreibung der gesundheitsschädigenden Wirkung polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe erfolgte bereits Ende des 18. Jahrhunderts, als die krebserzeugende Wirkung von Rußen bei Schornsteinfegern erstmals beschrieben wurde. Bald darauf wurde auch ein Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Exposition gegenüber Steinkohlenteer wie auch Pech und verschiedenen Krebsarten erkannt (Harvey, 1985). Aber erst als in den 1930er Jahren deren polyzyklische Inhaltsstoffe wie Dibenzo[*a,h*]anthracen, Benzo[*a*]pyren (B[*a*]P) und Benzo[*e*]pyren identifiziert und als kanzerogen eingestuft werden konnten, rückten PAKs in den Fokus der Krebsforschung (Letzel, 2001; Beloglazova, 2008). In den darauffolgenden Jahrzehnten zeigte sich eine starke Kanzerogenität besonders bei den PAKs mit vier bis sieben aromatischen Ringen und vor allem B[*a*]P wurde aufgrund seiner hohen Toxizität intensiv untersucht. Aufgrund seiner ausgeprägten Kanzerogenität und des ubiquitären Vorkommens hat sich B[*a*]P inzwischen zur

Leitsubstanz in der PAK-Analytik entwickelt (Letzel, 1999; Menichini, 1999) und wird als Indikator für die Gesamtbelastung an PAKs verwendet, wenngleich sein Anteil an der Gesamtkonzentration kanzerogener PAKs in der Regel lediglich 1 bis 20 % beträgt (Ravindra, 2008).

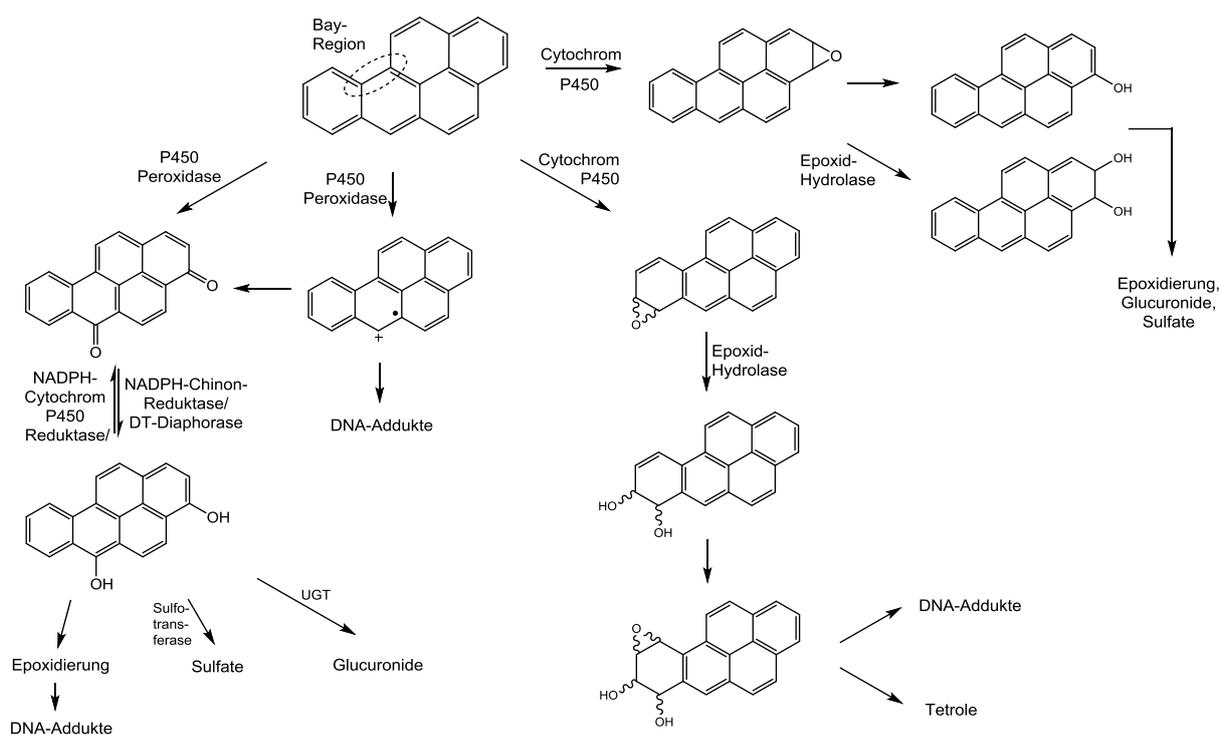
B[a]P, von der IUPAC als Benzo[d,e,f]chrysen bezeichnet, weist die typischen Eigenschaften der stark kanzerogenen PAKs von mittlerer Molekülgröße auf. Mit etwa 175 °C bzw. 496 °C zeigt es einen hohen Schmelz- bzw. Siedepunkt, sowie einen sehr niedrigen Dampfdruck (ca.  $10^{-6}$  Pa bei 20 °C; Dabestani, 1999; Todeschini, 1995). Die Löslichkeit in Wasser wird meist mit 3.8 µg/L angegeben (de Maagd, 1998), was im Wesentlichen durch die ausgeprägte Hydrophobizität des Moleküls bedingt ist. Aufgrund seiner Vielzahl aromatischer  $\pi$ -Elektronen zeigt B[a]P außerdem eine ausgeprägte Fluoreszenz, was oftmals zur einfachen analytischen Detektion von B[a]P und anderen PAKs genutzt wird (Dabestani, 1999; Prieto-Blanco, 2010; Rehwagen, 2005).



**Abbildung 1:** Chemische Struktur von Benzo[a]pyren.

Die Aufnahme von B[a]P in den menschlichen Organismus erfolgt in aller Regel entweder inhalativ, beispielsweise durch das Einatmen belasteter Abgase oder von Tabakrauch (Courter, 2007; Matschulat, 2006; Lee, 1976; Hecht, 2003; Wiencke, 2003), oral durch die Aufnahme von kontaminierter Nahrung oder belastetem Trinkwasser (Gilbert, 1994; Ravindra, 2008; Manoli, 1999; Wang, 2008; Liang, 2008; Danyi, 2009), oder auch dermal durch direkten Hautkontakt (Yang, 1989; van Rooij, 1993; Elovaara, 1995). Durch enzymatische Metabolisierung entfaltet sich das kanzerogene Potential des Moleküls, indem der PAK durch die NADPH-abhängigen Cytochrom P450 Monooxygenasen (siehe Abb. 2) oxidiert wird (Topinka, 1998). Vor allem Cytochrome aus einer als Familie 1 bezeichneten Untergruppe (CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 1B1) sind für ihre durch PAKs induzierte Aktivität bekannt (Shimada, 1998). Als Reaktionsprodukte entstehen primär Epoxide (vor allem die

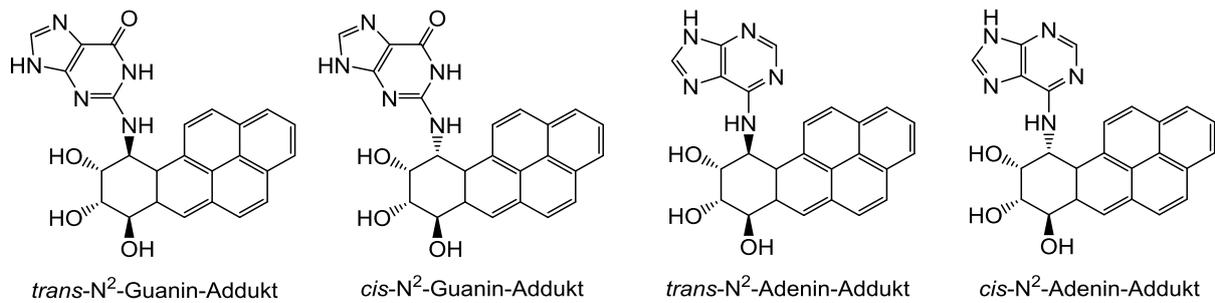
2,3-, 4,5-, 7,8- und 9,10-Epoxide), die dann in Phenole umgelagert werden können oder, was besonders für die instabileren 7,8-Epoxide meist eintritt, durch Epoxid-Hydrolasen, wie die hepatische, im Komplex mit P450 Cytochromen auftretende mikrosomale Epoxid-Hydrolase, in *trans*-Diolen umgewandelt werden (Walters, 1986). Bei den 7,8- und 9,10-Diolen kann nun eine vicinale Epoxidierung stattfinden, die vor allem für die 7,8-Diole gut untersucht ist, da hierbei die als ultimative Karzinogene geltenden *bay*-Region-Diolepoxide entstehen, wobei als Hauptprodukt (+)-*anti*-B[a]P-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid gebildet wird (Hecht, 2010; Yang, 1988). Durch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen tritt eine Interkalation der Diolepoxide in die DNA auf (Hargis, 2010), was dann durch nucleophile Öffnung des Oxiranrings durch die exozyklischen Aminogruppen der Nucleobasen zur Bildung kovalenter DNA-Addukte führen kann, wie in Abb. 3 dargestellt (Harvey, 1988; Geacintov, 1997).



**Abbildung 2:** Ausgewählte Stoffwechselwege der Biotransformation von Benzo[a]pyren (Letzel, 2001; Hecht, 2003; Geacintov, 1997; Jacob, 1996). Nicht dargestellt ist die Möglichkeit einer metabolischen Deaktivierung der Epoxide durch Bildung von Glutathion-Konjugaten katalysiert durch GST.

Neben der Epoxidierung ist zur metabolischen Aktivierung auch die Bildung verschiedener Radikalkationen durch Cytochrom P 450 und Peroxidasen möglich, die dann ebenfalls zu DNA-Addukten reagieren können (Jacob, 1996). Die gebildeten Phenole, die mit verschiedenen chinoiden Strukturen im Gleichgewicht stehen, können, mit oder ohne

vorheriger Bildung reaktiverer Spezies, ebenfalls DNA-Addukte bilden, jedoch tritt hier in den meisten Fällen eine metabolische Deaktivierung auf (Burczynski, 2000). Diese kann generell durch Glucuronidierung, Sulfatierung oder Glutathion-Konjugation erfolgen (Hecht, 2009). Die so transformierten Metaboliten können dann meist über den Urin ausgeschieden werden (Vatsavai, 2008).



**Abbildung 3:** Hauptsächlich auftretende *cis*- und *trans*-Addukte von Guanin und Adenin an Benzo[a]pyren-Diolepoxid. Gebildet werden vor allem Guanin-Addukte, Adenin-Addukte sind deutlich seltener und Cytosin-Addukte kommen praktisch nicht vor (Yang, 1988).

Die gebildeten DNA-Addukte wirken sich nun auf die Bindung verschiedener Enzyme an die DNA aus und führen so in der Regel zur Inaktivierung des entsprechenden Gens (Yakovleva, 2006). Tritt diese Inhibition an bestimmten Tumorsuppressorgenen wie P53 auf, erklärt dies die kanzerogene Wirkung der DNA-Addukte (Denissenko, 1996).

Mit der Kanzerogenität von PAKs scheint außerdem ein immunotoxischer Effekt einherzugehen, da in Tierversuchen eine Hemmung der humoralen und zellulären Immunantwort nach Exposition gegenüber den kanzerogenen PAKs festgestellt werden konnte. Weiterhin konnten in Tiermodellen eine hämatotoxische Wirkung sowie Reproduktions- und Entwicklungsstörungen nachgewiesen werden. Ob und in welchem Ausmaß diese Effekte jedoch im menschlichen Organismus auftreten, ist bisher nur unzureichend untersucht (Karakaya, 2004; Preedy, 2010).

### 1.3 Toxikologische Relevanz in Lebensmitteln

Wenngleich in der EU gemäß Richtlinie 2004/107/EG ein Zielwert für B[a]P in Luft von 1 ng/m<sup>3</sup> (Gesamtgehalt der PM10-Fraktion als Durchschnitt eines Kalenderjahres) gefordert ist und auch Trinkwasser laut deutscher Trinkwasserverordnung mit einem sehr niedrigen Grenzwert von 0.010 µg/L belegt ist, gelten Nahrungsmittel für Nichtraucher als größte

Expositionsquelle für PAKs (Plaza-Bolaños, 2010). Eine Kontamination potentieller Nahrungsmittelrohstoffe erfolgt vornehmlich durch Aufnahme aus der Umwelt. So kann bei Obst, Gemüse, Sämereien und Getreide die Deposition von PAKs aus belasteter Umgebungsluft auf der Fruchtoberfläche zu einer Kontamination führen, wobei der Kontakt der Pflanzen mit PAKs beispielsweise durch Industrie- und Verkehrsabgase während der Wachstumsphase, aber auch im Zuge von Ernte, Transport und Lagerung durch maschinelle Abgase sowie während der Weiterverarbeitung durch Trocknung mit Verbrennungswärme erfolgen kann (Moret, 2000a). Über die Möglichkeit zur Kontamination pflanzlichen Materials durch die Aufnahme von PAKs aus belasteten Böden oder Wässern existieren hingegen widersprüchliche Ergebnisse (Rodríguez-Acuña, 2008). Bei tierischen Lebensmitteln spielt die PAK-Belastung durch die Umwelt generell keine Rolle, da eventuell von den Tieren aufgenommene PAKs metabolisiert werden und sich so nicht in der Nahrungskette anreichern. Fisch und Meeresfrüchte variieren jedoch stark hinsichtlich ihres Potentials zur PAK-Anreicherung. So wird bei vertebraten Fischen von einer schnellen Metabolisierung ausgegangen, während Muscheln und andere Weichtiere eher zur Anreicherung neigen (Speer, 1990; Plaza-Bolaños, 2010).

Die meisten tierischen Lebensmittel wie Milch, Eier oder Fleisch und daraus hergestellte Produkte weisen demzufolge kaum PAKs in nennenswerten Konzentrationen auf. PAK-Belastungen entstehen hier vornehmlich durch die Weiterverarbeitung der Rohprodukte durch große Hitze oder Kontakt mit Verbrennungsprodukten, wie dies bei Räucher-, Grill-, Röst- und Trocknungsprozessen auftritt. Aufgrund des hydrophoben Charakters der PAKs scheiden sich diese aus gasförmigen oder partikulären Verbrennungsprodukten bevorzugt an fetthaltigen Lebensmitteln ab oder werden durch Pyrolyse verschiedener organischer Lebensmittelbestandteile unter Hitze einwirkung gebildet. Werden die Lebensmittel keiner Weiterbehandlung unterzogen, die zur Reduzierung der PAK-Konzentrationen beiträgt, verbleiben die PAKs bis zum Verzehr in den so verarbeiteten Waren und werden schließlich in den menschlichen Organismus aufgenommen. Da die Abgase der Holz- und Kohleverbrennung generell hohe PAK-Konzentrationen enthalten, kann vor allem das Grillen über Holzkohle zu hohen PAK-Belastungen führen (Mottier, 2000; Lijinski, 1964), aber auch das Räuchern von Fleisch- und Fischereiprodukten kann PAK-Kontaminationen in den entsprechenden Nahrungsmitteln verursachen (García Falcón, 1996; Speer, 1990). In jüngerer Zeit werden von der Lebensmittelindustrie vermehrt Rauchkondensate (*smoke flavoring primary products*) als Aromastoffe in bestimmten Lebensmitteln eingesetzt, in denen

ebenfalls erhöhte PAK-Konzentrationen nachgewiesen werden konnten, wenngleich die PAK-Belastungen gegenüber direktem Räuchern generell niedriger sind (Simon, 2010). Bei Fisch und Meeresfrüchten, die durch Einlegen in Ölen haltbar gemacht werden, konnte hingegen gezeigt werden, dass die in den eingelegten Erzeugnissen teilweise gefundenen PAK-Kontaminationen nicht aus den zugrundeliegenden tierischen Rohstoffen stammen, sondern durch Absorption aus den umgebenden Ölen zustande kommen, in denen dann meist deutlich höhere PAK-Konzentrationen gemessen werden können (Pietschmann-Keck, 2012; Moret, 2005).

Aufgrund ihres hohen Gehalts an langkettigen, gesättigten oder ungesättigten Fettsäureestern besitzen Fette und Öle einen stark hydrophoben Charakter und damit eine hohe Löslichkeit für PAKs. Vor allem in pflanzlichen Fetten und Ölen sind oftmals PAKs nachweisbar, auch wenn der Grad der Belastung in Abhängigkeit von zugrunde liegender Pflanze bzw. Pflanzenteil, Art der Ölgewinnung und Nachbehandlung des Rohöls stark variieren kann. Neben der bereits beschriebenen Ablagerung von PAKs auf dem zur Ölgewinnung verwendeten Pflanzenmaterial kommen als Kontaminationsursachen eine Trocknung des Materials vor der Ölgewinnung mit Verbrennungsabgasen sowie verunreinigte Extraktionsmittel, die zur Ölgewinnung verwendet werden, in Frage (Pandey, 2004). Vor allem in Traubenkernöl wurden aufgrund der Trocknung der aus dem Trester abgetrennten Traubenkerne in der Vergangenheit hohe PAK-Belastungen (v.a. schwere PAKs) festgestellt (Moret, 2000b). Aber auch in Kokosnussöl und Oliventresteröl, wo die Rohstoffe vor der Ölgewinnung ebenfalls getrocknet werden müssen, konnten erhöhte PAK-Belastungen in den Rohölen gemessen werden (Moret, 2000a; Ballesteros, 2006). Bei Ölen, deren Ausgangsstoffe keiner Trocknung unterzogen werden müssen, wurden gemessene PAK-Kontaminationen in den zur Ölextraktion verwendeten Lösemitteln angenommen. Eine Extraktion des nach der Pressung im Rückstand verbliebenen Öls wird bei vielen Ölsorten zur Erhöhung der Ausbeute angewandt, wobei die gewonnenen Öle in aller Regel von geringerer Qualität sind. Meist wird Hexan als stark unpolares, leicht verfügbares und flüchtiges Lösemittel verwendet, in dem aber ebenso auch PAKs gut löslich sind. Obwohl immer wieder als Kontaminationsquelle angenommen, konnte eine signifikante Belastung von Ölen durch Extraktionsmittel aber in mehreren Studien nicht bestätigt werden (Howard, 1968; Cejpek, 1998). Eindeutig nachgewiesen werden konnte hingegen die Möglichkeit einer Kontamination aus Verpackungsmaterialien wie recyceltem Polyethylen oder Jutesäcken, die mit Erdölrückständen behandelt wurden (Šimko, 1995; Grob, 1991).

Generell sind PAK-Konzentrationen in unraffinierten, nativen Ölen höher als in Ölen, die einer Raffination unterzogen werden (Barranco, 2003). Die Raffination von Speiseölen schließt typischerweise eine Entschleimung, Neutralisation (Entsäuerung), Bleichung sowie Desodorierung ein. Während Entschleimung und Neutralisation hauptsächlich der Entfernung von lipidischer Materie dienen und PAK-Konzentrationen nicht wesentlich beeinflussen, führt die Behandlung mit Aktivkohle während der Bleichung zu einer deutlichen Reduktion des Gehalts an schweren PAKs, wohingegen leichte PAKs vor allem während der zur Desodorierung eingesetzten Wasserdampfdestillation reduziert werden (Guillén, 2004; Speer, 1990). So konnte für Sonnenblumenöl eine Reduzierung der Gesamtkonzentration der gemessenen PAKs um 72% beobachtet werden, für Sojaöl um 87% (Teixeira, 2007).

Für Öle und Fette aller Art gelten in der EU daher niedrige Grenzwerte, aber auch für andere Lebensmittel wurden Höchstmengen festgelegt (Tabelle 2). Hierbei wird in der Regel B[a]P als Markersubstanz verwendet, was eine schnelle und einfache Überwachung der PAK-Belastung erlaubt. Weiterhin gelten verschiedene Summengrenzwerte für B[a]P, B[a]A, B[b]F und Chr.

**Tabelle 2:** Ausgewählte gesetzliche Höchstmengen für PAKs in verschiedenen Lebensmittelmatrices nach der EU-Verordnung 835/2011.

Erzeugnis	Höchstmenge [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	
	Benzo[a]pyren	Summe von B[a]P, B[a]A, B[b]F und Chr
Öle und Fette	2.0	10.0
Kakaobohnen und Folgeerzeugnisse	5.0	35.0
Kokosnussöl	2.0	20.0
Geräuchertes Fleisch und -erzeugnisse	5.0	30.0
Geräucherter Fisch und Fischereierzeugnisse	5.0	30.0
Getreidebeikost für Säuglinge und Kleinkinder	1.0	1.0
Säuglingsnahrung und Folgenahrung	1.0	1.0

## 2 Analytik polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe

### 2.1 Probennahme, Extraktion und Aufreinigung

Das ubiquitäre Auftreten von PAKs führt zu einer Vielzahl von festen, flüssigen oder gasförmigen Matrices, in denen ihre quantitative Bestimmung notwendig ist. Beispiele hierfür sind Boden- und Wasserproben, Abgaskondensate, Zigarettenrauch sowie verschiedenste Lebensmittel. Die Konzentrationsbereiche reichen dabei in Abhängigkeit von der Matrix vom unteren ppt- bis in den ppb-Bereich, wodurch die Analyse mittels instrumenteller Verfahren meist einer aufwendigen Probenvorbereitung bedarf, um störende Begleitstoffe zu entfernen sowie durch Anreicherung eine Analyse im Spurenbereich überhaupt erst zu ermöglichen (Gey, 2008).

Bei flüssigen und gasförmigen Proben ist meist eine direkte Extraktion möglich. Bei Aerosolen muss vor der Extraktion eine Abtrennung und Anreicherung der Partikel, an denen PAKs adsorbiert sind, erfolgen. Hierfür werden meist Glasfaserfilter (Panther, 1999; Shimmo, 2002; Omar, 2002) oder Filter aus Quarzfasern, teilweise in Verbindung mit Polyurethanfiltern (Park, 2002; Oda, 2001; Wingfors, 2001), verwendet. Feststoffe benötigen eine vorhergehende Homogenisierung, um reproduzierbare Ergebnisse zu liefern. Bei Bodenproben beispielsweise beinhaltet dies nach der Probenahme zunächst eine Trocknung mit darauf folgender Zerkleinerung und Durchmischung, an die sich noch ein Sieben des so gewonnenen Pulvers anschließen kann (Knopp, 2000; Rey-Salgueiro, 2009). Für feste Lebensmittelproben kann je nach Art der Probe eine Trocknung entfallen, in jedem Fall ist aber auch hier in der Regel eine Homogenisierung nötig (Houessou, 2007; Kipopoulou, 1999).

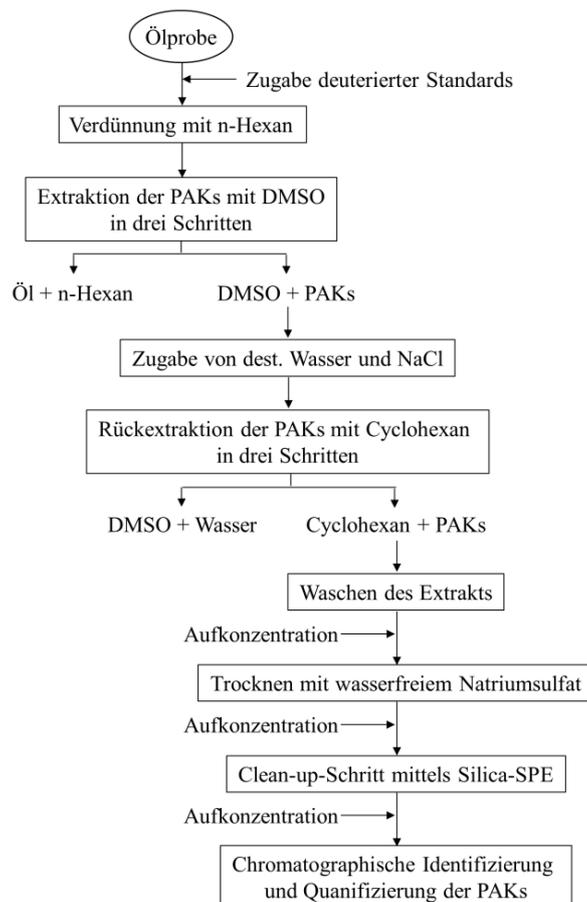
Traditionell wird zur Extraktion der PAKs aus verschiedensten Matrices die Soxhlet-Extraktion verwendet. Diese ist jedoch zeitaufwendig und benötigt große Mengen an organischen Lösemitteln, weshalb eine ganze Reihe alternativer Extraktionstechniken entwickelt wurde (Cammann, 2001). Zu nennen sind hier die Ultraschall-unterstützte Flüssigextraktion (UAE; Noel, 1996; Chuang, 1998), die überkritische Fluidextraktion (SFE; Barco-Bonila, 2009), die Hochdruck-Flüssigkeitsextraktion (PLE; Houessou, 2007; Poster, 2006), die beschleunigte Flüssigextraktion (ASE; Wilcke, 1999; Dreyer, 2005) sowie die Mikrowellen-unterstützte Extraktion (MAE; Purcaro, 2009). Der Extraktion mit Lösemittel schließt sich oftmals noch eine Festphasenextraktion (SPE) als Aufreinigungsschritt an. Als Sorbens kommen je nach Matrix Silica-basierte Normal- oder Umkehrphasenmaterialien

sowie organische Polymere zum Einsatz (Houessou, 2007; Poster, 2006). Daneben kann auch eine säulenchromatographische Aufreinigung verwendet werden, meist über unmodifiziertem Silica oder Aluminiumoxid (Danyi, 2009; Rey-Salgueiro, 2009).

Eine der größten Herausforderungen stellt die Bestimmung der PAKs in fetthaltigen Lebensmitteln dar, da die selektive Extraktion der unpolaren PAKs aus der ebenfalls unpolaren Matrix sowie eine möglichst vollständige Entfernung der in der chromatographischen Analyse äußerst störenden Fettbestandteile große Schwierigkeiten birgt. Je nachdem, ob es sich um feste oder flüssige Proben handelt, können verschiedene Möglichkeiten zur Extraktion angewandt werden. Bei festen Proben wie Fleisch oder Fisch wird meist auf einen zweistufigen Ansatz zurückgegriffen, der zunächst eine Extraktion der getrockneten und homogenisierten Probe mit Lösemittel und eine anschließende SPE zur Aufreinigung enthält (Plaza-Bolaños, 2010). Aufgrund ihrer hohen Effizienz wird trotz einer Vielzahl an Nachteilen die Soxhlet-Extraktion hier immer noch vielfach angewandt (Chen, 1997; Anyakora, 2005). Alternativ wurden UAE-, MAE- und vor allem PLE-Methoden entwickelt, die eine Verringerung von Extraktionsdauer und Lösemittelverbrauch sowie im Fall der PLE auch eine Halbautomatisierung erlauben (Chen, 1996; Pena, 2006; Wang, 1999). Als abschließender Aufreinigungsschritt wird typischerweise eine SPE oder Säulenchromatographie mit Silica oder Magnesiumsilikat (Florisil) eingesetzt. Eine verbesserte Abtrennung lipidischen Materials kann durch einen zusätzlichen Verseifungsschritt meist mit methanolischen oder ethanolischen NaOH- oder KOH-Lösungen vor oder unmittelbar nach der Lösemittelextraktion erreicht werden (Moret, 2000a). Durch den Einsatz einer Gelpermeationschromatographie anstelle der klassischen SPE kann auch ohne Verseifung ein hoher Anteil der Lipide entfernt werden (Jira, 2004).

Auch bei flüssigen fetthaltigen Matrices, wobei für die PAK-Analytik hauptsächlich Speiseöle von Bedeutung sind, bedingt die komplexe Matrixzusammensetzung eine aufwendige Probenvorbereitung, um die benötigten niedrigen Nachweisgrenzen zu erreichen. Abb. 4 zeigt beispielhaft ein Schema der Extraktion von PAKs aus Oliventresteröl. Zur Extraktion von PAKs aus Speiseölen existieren zwei prinzipielle Strategien (Plaza-Bolaños, 2010). Klassischerweise wird eine Extraktion mittels LLE durchgeführt, an die sich ein Aufreinigungsschritt mittels SPE anschließt. Aufgrund von Weiterentwicklungen in der SPE-Technologie ist es mittlerweile aber auch möglich, auf die LLE zu verzichten und die Extraktion direkt mit einer SPE durchzuführen. Die LLE wird nach Verdünnung der Ölprobe (meist mit *n*-Hexan) in der Regel mit DMSO oder DMF/Wasser-Mischungen durchgeführt,

wobei anschließend eine Rückextraktion beispielsweise mit Cyclohexan erfolgen kann (Menichini, 1991; Barranco, 2003). Als Festphasen für die SPE können verschiedenste Normalphasenmaterialien (Silica, Aminopropyl-modifiziertes Silica) wie auch Umkehrphasen ( $C_{18}/C_8$ -modifiziertes Silica, Polystyrol/Divinylbenzol-Copolymere) verwendet werden (Guillén, 2004; Mottier, 2000; Veyrand, 2007), wobei sich bei Verwendung als alleinige Extraktionsmethode  $C_{18}$ /Florisil-Mischungen oder PS/DVB-Copolymere bewährt haben (Bogusz, 2004; Weißhaar, 2002). Verschiedene Ansätze wurden versucht, um eine spezifischere Abtrennung der PAKs von Matrixbestandteilen zu erreichen. Dabei wurde beispielsweise die Komplexbildung von PAKs mit Coffeinmolekülen ausgenutzt, um die Selektivität der LLE zu erhöhen (Kolarovic, 1982), aber auch mit der Anwendung der Donor-Akzeptor-Komplex-Chromatographie (DACC), die starke  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen Festphase und Analyt zur Abtrennung nutzt, gelang eine spezifischere Abtrennung der PAKs von der Ölmatrix (Barranco, 2004). Wie auch bei anderen Lebensmittelproben kann die SPE-Aufreinigung durch eine GPC ersetzt werden, die zwar eine effektive Aufreinigung sicherstellt, jedoch gleichzeitig große Mengen an Lösemittel verbraucht (Plaza-Bolaños, 2010).



**Abbildung 4:** Beispiel für den Ablauf einer Extraktion von PAKs aus Olivenölproben (Plaza-Bolaños, 2010).

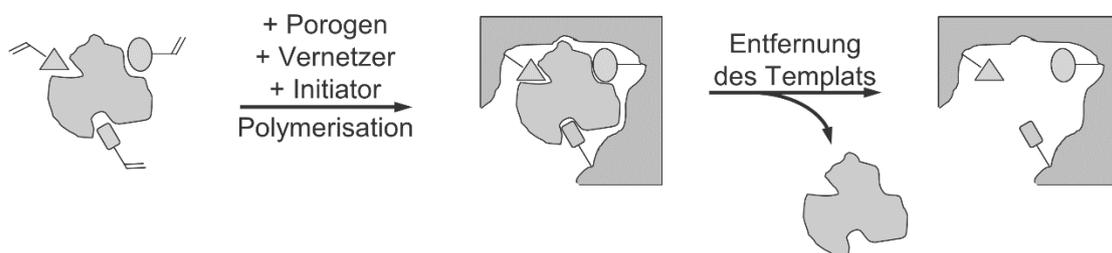
## 2.2 Molekular geprägte Polymere zur Festphasenextraktion

Neben klassischen Festphasen wurden zur Abtrennung und Anreicherung von PAKs bzw. B[a]P verschiedene molekular geprägte Polymere (*molecularly imprinted polymers*, MIPs) entwickelt (Lai, 2004; Traviesa-Alvarez, 2007; Krupadam, 2009; Ho, 2010). Diese weisen gegenüber klassischen SPE-Phasen den Vorteil einer selektiven Bindung eines oder mehrerer, strukturell ähnlicher Analytmoleküle auf, so dass eine Coelution von Matrixbestandteilen mit der Analytfraktion vermieden und die Abtrennung des Analyten wesentlich effizienter wird.

Spezifische Analyt-Bindestellen werden im Zuge der Synthese der Polymere (siehe Abb. 5) durch den Einsatz eines Templatmolekuls eingeführt. An diese Bindestellen können nach Entfernung des Templats Analytmoleküle binden. Die Spezifität der Bindestellen für das Templat wie auch den Analyten wird erreicht durch Wechselwirkung des Templats mit dem Monomer, wobei sich unter Ausnutzung verschiedener Arten der Wechselwirkung drei prinzipielle Synthesewege für MIPs etabliert haben (Turiel, 2010; Caro, 2006). Beim sogenannten kovalenten Ansatz werden kovalent verknüpfte Konjugate aus Templat und Monomer mit Hilfe von bifunktionellen Quervernetzern in ein dreidimensionales Polymernetzwerk eingebaut. Nach Abspaltung des Templats kann unter erneuter Ausbildung kovalenter Bindungen dann der Analyt gebunden werden (Wulff, 1972; Shea, 1978). Wenngleich hierdurch ein unkontrollierter Einbau von Monomer in das Polymer und damit die Bildung unspezifischer Bindestellen effektiv verhindert wird, sind die geeigneten Analyt-Monomer-Kombinationen begrenzt, da zur vollständigen Entfernung des Templats nach der Polymersynthese wie auch zur Elution des Analyten die kovalenten Bindungen unter möglichst milden Bedingungen quantitativ gespalten werden müssen. Um Analytbindung und -elution einfacher zu gestalten, wurde ein semi-kovalenter Ansatz entwickelt (Whitcombe, 1995). Hierbei werden kovalente Templat-Monomer-Komplexe polymerisiert, die so beschaffen sind, dass nach Entfernung des Templats nichtkovalente Wechselwirkungen der Bindestelle mit dem Analyt ausgebildet werden können (Khasawneh, 2001; Ikegami, 2004). Diese können dann deutlich einfacher wieder gespalten werden. Auch hier gestaltet sich jedoch oftmals die Auswahl und Herstellung des Templat-Monomer-Komplexes sowie die vollständige Entfernung des Templats schwierig.

Aufgrund der deutlich einfacheren Polymersynthese wie auch der höheren Vielfalt an Monomeren und Templaten hat sich vor allem für SPE-Anwendungen der nicht-kovalente Ansatz durchgesetzt. Hierbei werden zur Ausbildung eines Templat-Monomer-Komplexes nicht-kovalente Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, ionische

Wechselwirkungen,  $\pi$ - $\pi$ - oder van der Waals-Wechselwirkungen ausgenutzt (Haupt, 2003). Die nach Entfernung des Templats gebildete Bindestelle kann nun den Analyt ebenfalls durch nicht-kovalente Wechselwirkungen binden. Um eine maximale Komplexierung des Templats mit Monomeren zu erhalten, müssen bei der Polymersynthese typischerweise deutliche Monomerüberschüsse verwendet werden. Dies führt zum Einbau von freiem Monomer in das Polymer, wodurch der gegenüber kovalent geprägten Polymeren höhere Anteil an unspezifischen Bindungen von Analytmolekülen bedingt wird. Auch ergeben sich verglichen mit kovalenten Ansätzen schwächere Bindungen des Analyten an das Polymer (Caro, 2006), jedoch sind für eine Anwendung als SPE-Materialien diese meist ausreichend.

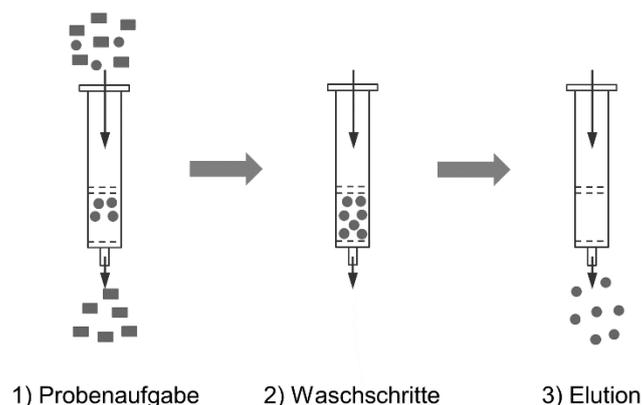


**Abbildung 5:** Prinzip der Herstellung nicht-kovalent geprägter Polymere.

Im Fall von organischen Polymeren wird bei der Polymersynthese fast ausschließlich auf eine radikalische Polymerisation von Vinyl- oder Acrylmonomeren zurückgegriffen, deren funktionelle Gruppen mit dem Templat wechselwirken können (Mosbach, 1994). Bei anorganischen Polymermatrices wie Silica oder Titandioxid, die deutlich seltener verwendet werden, kommen zur Synthese meist Sol-Gel-basierte Verfahren zum Einsatz (Han, 2005; Haupt, 2003). Als Porogene werden oftmals aprotische Lösemittel niedriger Polarität ausgewählt, die eine gute Löslichkeit aller Komponenten sicherstellen sowie möglichst geringe Wechselwirkungen mit dem Templat ausbilden, um die Komplexbildung zwischen Templat und Monomer nicht zu beeinflussen. Die radikalische Polymerisation wird meist thermo- oder photoinduziert mit Azoverbindungen als Initiatoren ausgeführt und der Einfachheit wegen bis heute meist als *bulk*-Polymersation. Der entstandene Polymermonolith wird anschließend gemahlen und die Partikel mit der gewünschten Größe abgetrennt. Da die Form der Partikel für SPE-Anwendungen von eher untergeordneter Bedeutung ist, werden damit einhergehende irregulär geformte Polymerteilchen und eine breite Größenverteilung ebenso in Kauf genommen wie auch ein relativ hoher Verlust an Polymer bei der gröbenselektiven Fraktionierung. Die Herstellung von hinsichtlich Form und Größe sehr viel einheitlicheren Mikro- und Nanopartikeln ist mit Suspensions-, Emulsions- und

Fällungspolymerisation sowie verschiedenen *core-shell*-Ansätzen möglich (Poma, 2010; Qiao, 2006), ist aber mit deutlich erhöhtem Aufwand bei der Synthese verbunden. Nach der Herstellung der Polymerpartikel muss in jedem Fall noch das Templat entfernt werden, was meist durch Extraktion mit Lösemittel (z. B. Soxhlet-, Ultraschall-assistierte Extraktion) geschieht. Eine vollständige Entfernung des Templats ist gerade in der Spurenanalytik essentiell, da hier ein „Bluten“ von Templat bei der späteren Extraktion auch noch in sehr kleinen Konzentrationen detektiert wird. Um diese Problematik zu umgehen, kann statt mit dem Analyten mit einer strukturell ähnlichen Verbindung geprägt werden, die bei der Detektion vom Analyt unterschieden werden kann (Owens, 1999).

Ebenso wie die konventionelle SPE wird die molekular geprägte SPE (MISPE) klassischerweise entkoppelt vom Detektionssystem im *off-line* Modus durchgeführt. Das partikuläre Polymer (typischerweise 15 – 500 mg) wird in Glas- oder Kunststoffkartuschen gepackt und mit Fritten fixiert. Mit Konditionierung, Probenaufgabe, Waschschritten und Elution folgt der Ablauf typischen SPE-Protokollen. Das Eluat wird anschließend dem entsprechenden Analyse- und Detektionssystem zugeführt (Caro, 2006). *On-line* oder *in-line* Verfahren haben sich bisher nicht durchgesetzt, erstere aufgrund verbreiteter Probleme hinsichtlich der Kompatibilität des MISPE-Elutionsmittels mit dem angeschlossenen, in der Regel chromatographischen Analyseverfahren, letztere, bei denen eine Detektion unmittelbar nach der MISPE durchgeführt wird, da aufgrund geringer Nachweisstärken oft zu aufwendigen Elutionsverfahren gegriffen werden muss (Turiel, 2010).



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung einer Festphasenextraktion mit molekular geprägten Polymeren. 1) Aufgabe der Probe, Bindung des Analyten an das Polymer und Durchfluss von Matrixbestandteilen. 2) Auswaschen unspezifisch gebundener Restmatrix. 3) Elution des Analyten.

Aufgrund der prinzipiellen Analogie zwischen konventioneller SPE und MISPE können auch Weiterentwicklungen der SPE auf MIPs übertragen werden. So wurden beispielsweise verschiedene Formate für die molekular geprägte Festphasenmikroextraktion (*molecularly imprinted solid phase microextraction*, MISPME) entwickelt, die die Vorteile der SPME mit der Selektivität von MIPs verbinden (Mullett, 2001; Djozan, 2007). Aber auch Techniken wie *matrix solid-phase dispersion* (MSPD) oder *stir bar sorptive extraction* (SBSE) wurden erfolgreich auf MIPs als Festphase übertragen (Yan, 2007; Zhu, 2006).

### 2.3 Klassische Trenn- und Detektionsverfahren

Die klassischen Methoden zur Quantifizierung von PAKs beruhen nahezu vollständig auf einer chromatographischen Trennung der PAK-Gemische und anschließender Detektion der einzelnen PAKs. In Abhängigkeit der Art der Chromatographie werden unterschiedliche Detektoren bevorzugt (EPA, 1982; Poster, 2006).

Die gaschromatographische Auftrennung erlaubt durch den Einsatz von Kapillarsäulen eine hohe Auflösung einer Vielzahl von PAKs, die immer als Gemische vorliegen (Barco-Bonila, 2009). Die Trennung erfolgt traditionell auf unpolaren stationären Phasen (basierend auf 5% Phenyl-95% Methylpolysiloxan), wobei mit schwach bis mittelmäßig polaren Phasen bessere Auflösungen einzelner PAK-Gruppen erreicht werden können (Gómez-Ruiz, 2009). Zur Injektion werden vor allem *splitless*-, aber auch *cold on-column injection* oder *programmed temperature vaporization* verwendet (Plaza-Bolaños, 2010). Aufgrund der Vorzüge, die eine massensensitive Detektion bezüglich Signalidentifizierung und –bestätigung bietet, sind GC/MS-Kopplungen in der PAK-Analytik weit verbreitet. Meist kommen dabei Single-Quadrupol-Analysatoren im *selected ion monitoring* (SIM) Modus zum Einsatz (Fernandez, 2002; Dachs, 2002), es wurden aber auch Ionenfallen- oder Triple-Quadrupol-Analysatoren beschrieben (Ballesteros, 2006; Plaza-Bolaños, 2010). Die Ionisation wird meist über Elektronenstoß-Ionisation erreicht (EI; Wingfors, 2001; Potter, 1994), in der Regel im *selected ion monitoring* (SIM) Modus (Fernandez, 2002; Dachs, 2002). Alternativ zur EI wird auch Chemische Ionisation (CI) verwendet (Hecht, 2010; Poster, 2010). Mit MS-Detektoren können neben der Identifizierung der PAKs anhand ihrer Molekulargewichte vor allem durch den Einsatz von Tandem-MS auch koeluiierende PAKs und Isomere mittels charakteristischer Tochterionen unterschieden werden (Veyrand, 2007). Weiterhin besteht die Möglichkeit einer Zugabe isopenmarkierter Standards zur Abschätzung von Extraktionsverlusten, wobei sowohl  $^{13}\text{C}$ - als auch  $^2\text{H}$ -markierte PAKs verwendet werden (Diletti, 2005; Veyrand, 2007).

Neben Massenspektrometern werden aufgrund ihres einfacheren Aufbaus und den damit verbundenen geringeren Kosten auch Flammenionisationsdetektoren (FID) verwendet, wie dies beispielsweise in der EPA-Standardmethode zur Detektion für PAKs festgelegt ist (EPA, 1982).

Bei einer Trennung mittels HPLC kommen standardmäßig UV/vis- oder Fluoreszenzdetektoren (FLD) zum Einsatz. UV/vis-Detektoren sind dabei nicht auf das Vorhandensein einer nativen Fluoreszenz des Analyten, wie sie beispielsweise bei Cyclopenta[*cd*]pyren fehlt, angewiesen (Simon, 2008), weshalb sie als Universaldetektoren zum Einsatz kommen (Manoli, 1999). Es können Detektoren mit variabler Anregungswellenlänge verwendet werden oder auch Diodenarray-Detektoren (DAD), die sich durch einen höheren Informationsgewinn aufgrund der gleichzeitigen Detektion einer Vielzahl von Wellenlängen auszeichnen (Vo-Dinh, 1998; Manoli, 1999). Wegen der im Vergleich zu Fluoreszenzdetektoren deutlich schlechteren Selektivität und der damit einhergehenden Anfälligkeit für Matrixeinflüsse sowie der hohen intrinsischen Fluoreszenz vieler Polyzyklen wird in der PAK-Analytik aber in aller Regel auf LC-FLD-Kombinationen zurückgegriffen (Rehwagen, 2005; Brum, 2008; Perugini, 2008). Vor allem bei komplexen Matrices, die meist nur wenige andere fluoreszierende Substanzen enthalten, eignen sich Fluoreszenzdetektoren durch die Möglichkeit variabler Anregungs- und Emissionswellenlängen für einen selektiven PAK-Nachweis (Manoli, 1999; Noel, 1996). Dadurch werden auch hinsichtlich Nachweisstärke UV/vis-Detektoren deutlich übertroffen. Moderne HPLC-Systeme sind aber oftmals mit beiden Detektoren ausgestattet, so dass beide Methoden kombiniert werden können (Danyi, 2009; Götze, 1991). In den letzten Jahren wurden darüber hinaus auch verschiedene LC/MS-Methoden zum Nachweis von PAKs entwickelt. Zur Ionisation kann Elektronenspray-Ionisation (ESI) eingesetzt werden, die allerdings eine Nachsäulenderivatisierung mit Tropylium- oder Silberkationen erfordert (Lien, 2007; Takino, 2001) oder auch Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI; Marvin, 1999). Für die stark unpolaren PAKs am besten geeignet scheint jedoch eine Photoionisation bei Atmosphärendruck (APPI), mit der PAKs in verschiedenen Umwelt- und Lebensmittelproben nachgewiesen werden konnten (Hutzler, 2011; Hollosi, 2011). Um die Ionenausbeute zu optimieren, werden auch hier standardmäßig Reagenzien wie Benzol oder Toluol nach der HPLC zugegeben (Smith, 2009). Unabhängig vom eingesetzten Detektor wird bei der chromatographischen Auftrennung der PAKs fast ausschließlich mit

Umkehrphasen (vor allem C<sub>18</sub>) gearbeitet. Hiermit können vor allem für schwerere PAKs gute Auflösungen erzielt werden (Moret, 2000a).

Besonders wenn komplexe PAK-Gemische, wie sie beispielsweise in fossilen Kohlenstoffgemischen aus Erdöl und Kohle vorkommen, getrennt und analysiert werden sollen, ist die GC/MS-Kopplung den HPLC-Systemen aufgrund besserer Trennleistung und Identifizierung der einzelnen Substanzen überlegen (Šimko, 2002). Weniger komplexe PAK-Gemische, wie sie typischerweise aus Verbrennungsrückständen resultieren, können jedoch in der Regel mit ausreichender Genauigkeit mit HPLC/FLD quantifiziert werden. Positive Ergebnisse können zusätzlich mit GC/MS bestätigt werden (Plaza-Bolaños, 2010). Gravierendster Nachteil ist die deutlich intensivere Probenvorbereitung vor GC/MS-Messungen, weshalb zur Aufreinigung und Fraktionierung eine HPLC vorgeschaltet werden kann (Lee, 1976; Hecht, 2010; Shimmo, 2002). So wurden beispielsweise für PAK-Messungen in ölhaltigen Matrices LC-GC/MS- und LC-LC-GC/FID-Techniken entwickelt, wobei mit Normalphasen-LC eine gute Abtrennung der lipidischen Matrixbestandteile erreicht werden kann (Vreuls, 1991). Analog kann eine Probenvorbereitung mittels LC auch vor eine HPLC-FLD-Analyse geschaltet werden, was ebenfalls für lipidische Proben angewandt wurde (Perrin, 1993; Moret, 1998).

Um die aufwendige, zeitintensive chromatographische Trennung zu umgehen, wurden spektroskopische Methoden zur Quantifizierung von PAKs entwickelt. Prinzipiell kommen dafür verschiedene Fluoreszenz- und Phosphoreszenz-spektroskopische Techniken in Frage (Vo-Dinh, 1998). Diese wurden bisher vor allem in relativ einfachen Matrices wie Wasser oder Urin eingesetzt (Vatsavai, 2008; Saitoh, 2009), stellen aber zur Analyse komplexerer Proben keine Alternative zur Chromatographie dar.

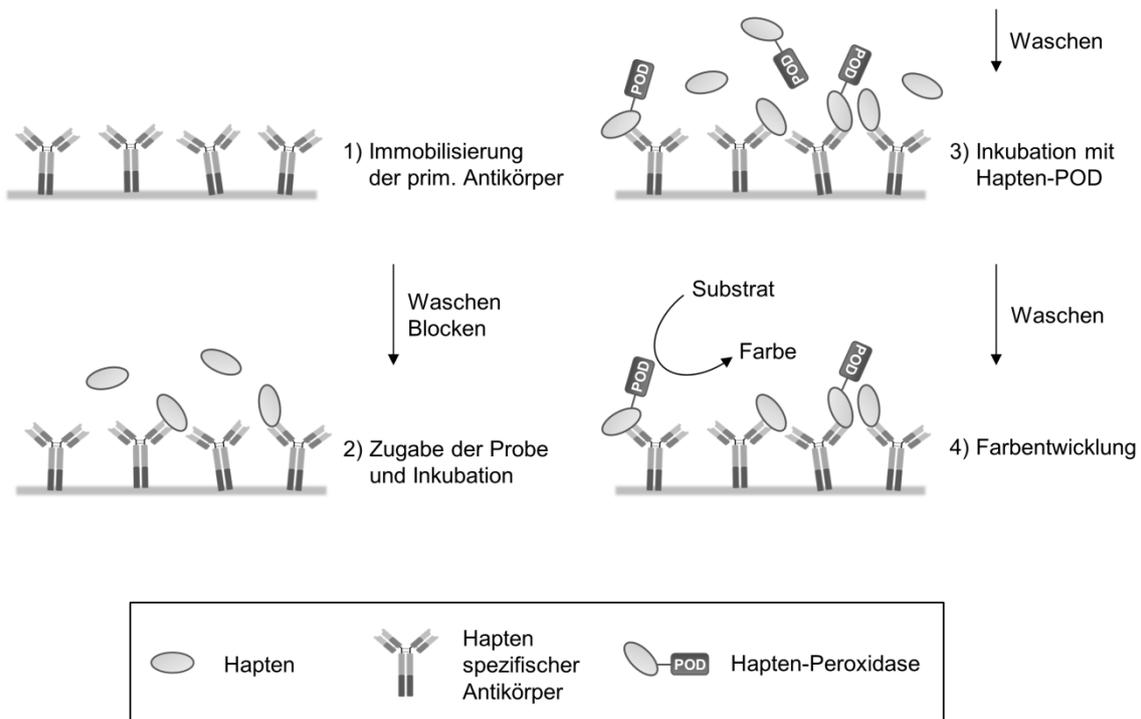
### **2.4 Immunanalytische Verfahren**

Ihre hohe Nachweisstärke sowie die Möglichkeit, oftmals auf eine aufwendige Probenvorbereitung verzichten zu können, machen Immunoassays zu schnellen und kostengünstigen Analysemethoden. Gerade in der Routineanalytik stellen sie damit eine praktikable Alternative zu den etablierten chromatographischen Verfahren dar (Findlay, 2000).

In den letzten Jahrzehnten wurde eine Vielzahl verschiedener Immunoassays und Immunosensoren entwickelt, die sich im Wesentlichen in der Art der Detektion der spezifischen Antigen-Antikörper-Wechselwirkung unterscheiden. In den ersten Assays kamen dafür

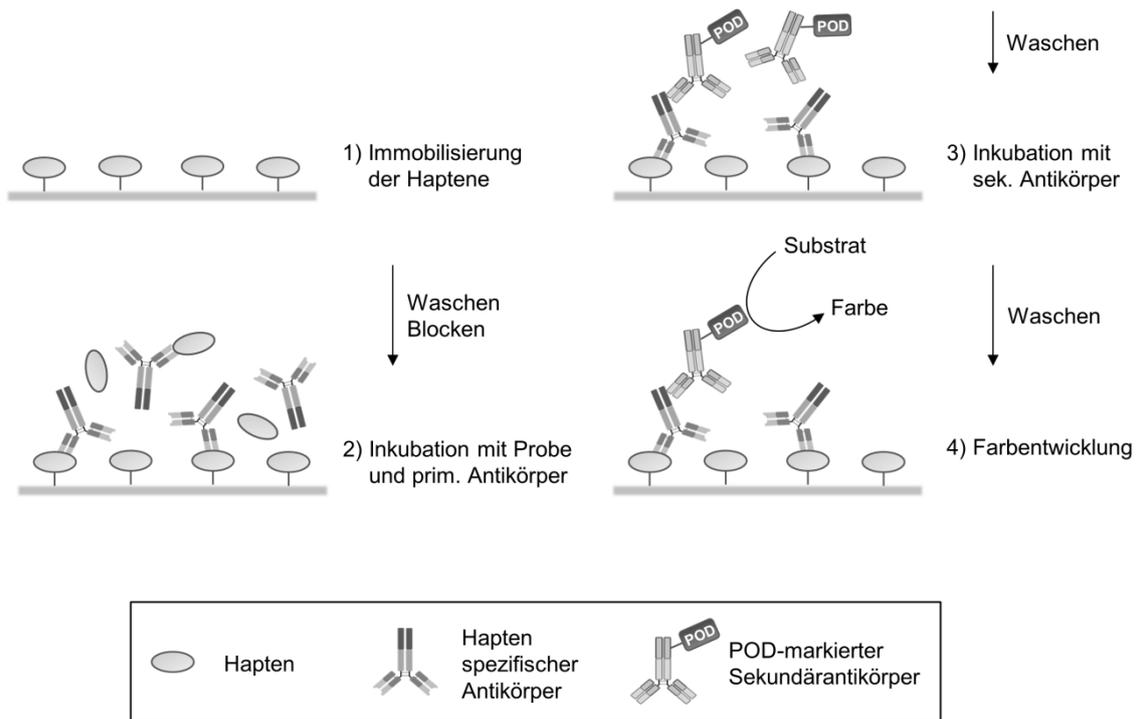
radioaktiv markierte Antikörper zum Einsatz (Yalow, 1959), ein großer Schritt hin zu einem massentauglichen Analyseverfahren wurde jedoch erst mit Entwicklung des ELISA durch die Kopplung der spezifischen Antikörperbindung mit einer enzymatischen Reaktion als Detektionsmethode geschafft (Engvall, 1971; van Weemen, 1971; Lequin, 2005). Bis heute wurde für den klassischen ELISA eine Reihe unterschiedlicher Varianten entwickelt, von denen sich vor allem heterogene Verfahren, die aufgrund der Immobilisierung entweder von Antigen oder Antikörper an einer Oberfläche, beispielsweise Kunststoff, Glas oder Gold, deutlich unempfindlicher gegenüber Matrixeinflüssen sind als homogene Varianten, bei der Quantifizierung verschiedenster Analyten bewährt haben (Darwish, 2006; Bonwick, 2004).

Vor allem für kleine organische Moleküle (Haptene), für die kein *sandwich*-ELISA verwendet werden kann, da sie nur ein Epitop besitzen, haben sich kompetitive ELISAs als äußerst sensitiv herausgestellt. Diese können im direkten oder indirekten Format durchgeführt werden. Beim direkt kompetitiven ELISA wird ein Analyt-spezifischer Antikörper kovalent (Glas-, Goldoberfläche) oder adsorptiv (Kunststoffoberfläche) immobilisiert (Abb. 7). Die kompetitive Reaktion um die Bindestellen der Antikörper findet dann zwischen dem Analyten sowie einem zugegebenen enzymmarkierten Analytderivat statt. Die Menge an Analytderivat, die an die Antikörper binden kann, ist dabei abhängig von der Analytkonzentration. Nach einem Waschschrift verbleiben nur die spezifisch an die Oberfläche gebundenen Analyten bzw. Analytderivate. Die Menge an gebundenem Analytderivat kann nun anhand einer enzymatisch katalysierten Farbreaktion sichtbar gemacht und über eine Absorptionsmessung ausgelesen werden. Als Enzyme werden hierfür meist einfache Peroxidasen verwendet (Rodriguez-Lopez, 2001; Hiner, 2002). Die Auslesung ist auch mittels einer Chemilumineszenzreaktion oder Fluoreszenzmessung möglich. Die Signalintensität ist in jedem Fall indirekt proportional zur Analytkonzentration, wobei zur Quantifizierung sigmoidale Kalibrierkurven verwendet werden, die meist mit der 4-Parameter-Logistikfunktion beschrieben werden (Dudley, 1985; Findlay, 2007).



**Abbildung 7:** Prinzip des direkt kompetitiven ELISA: 1) Immobilisierung der Primärantikörper. 2) Inkubation mit der Probe. 3) Inkubation mit POD-markiertem Analyten (Kompetition). 4) Substratzugabe zum Auslösen einer Farbreaktion.

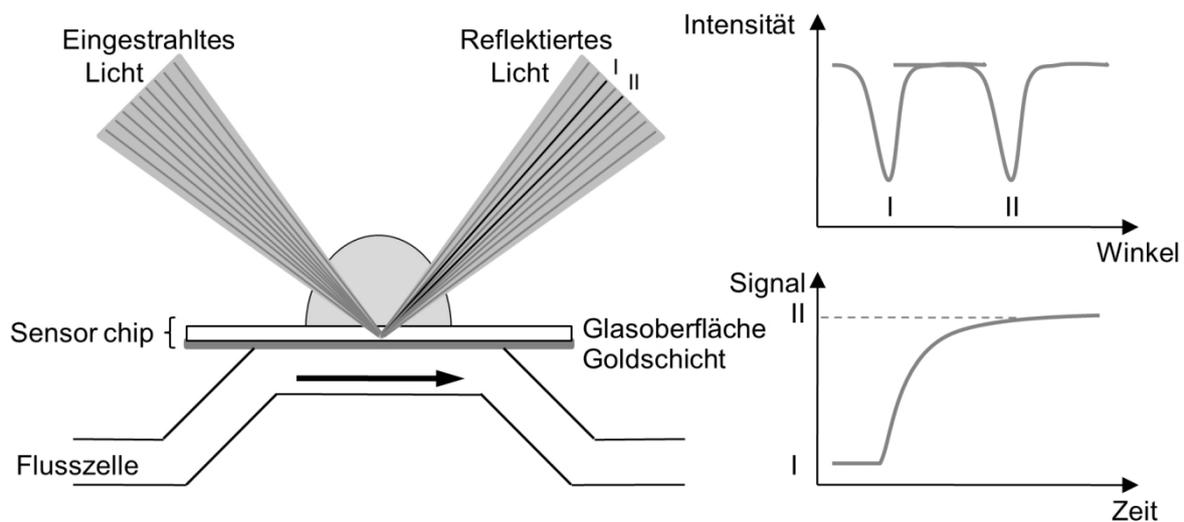
Als indirekt kompetitiv werden ELISA-Formate bezeichnet, bei denen nicht der Antikörper, sondern der Analyt an einer Oberfläche immobilisiert wird (Abb. 8). Haptene werden zur adsorptiven Immobilisierung in Mikrotiterplatten (MTP) meist an Proteine gekoppelt. Im kompetitiven Schritt werden dann gleichzeitig der Analyt sowie ein Analyt-spezifischer Primärantikörper zugegeben, so dass die Kompetition zwischen dem Analyt in Lösung und dem immobilisierten Analyt stattfindet. Nach einem Waschschrift verbleiben die an der Oberfläche gebundenen Primärantikörper, die dann mit einem enzymmarkierten Sekundärantikörper, der an die Primärantikörper bindet, detektiert werden. Die Signalentwicklung und Auslesung erfolgt dabei analog zum direkt kompetitiven Format und es ergeben sich ebenfalls sigmoidale Kalibrierkurven mit indirekter Proportionalität des Signals zur Analytkonzentration.



**Abbildung 8:** Prinzip des indirekt kompetitiven ELISAs: 1) Immobilisation der Haptene. 2) Inkubation der Probe mit dem primären Antikörper (Kompetition). 3) Inkubation mit POD-markierten sekundären Antikörpern. 4) Substratzugabe zum Auslösen einer Farbreaktion.

Bei der Entwicklung von Immunoassays gegen PAKs stellt die Herstellung sensitiver Antikörper gegen die stark hydrophoben Polyzyklen eine große Herausforderung dar (Matschulat, 2006). Von den zahlreichen entwickelten Assays (Roda, 1991; Roda, 1994; Kipp, 1998; Krämer, 1998; Li, 1999; Quelven, 1999; Knopp, 2000; Kim, 2001; Scharnweber, 2001; Fähnrich, 2002; Fritcher, 2002; Moore, 2004; Matschulat, 2005; Spier, 2009) erlauben deshalb nur wenige eine hochsensitive Quantifizierung von PAKs und zum Nachweis von B[a]P in Trinkwasser, der eine Bestimmungsgrenze von 10 ng/L erfordert, ist bisher kein Immunoassay in der Lage. Darüber hinaus werden oftmals deutliche Überbestimmungen festgestellt, wenn einzelne PAKs quantifiziert werden sollen (Zühlke, 1998). Hohe Kreuzreaktivitäten der Antikörper sind aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der PAKs ein generelles Problem. Viele der entwickelten Antikörper sind für den Nachweis nur eines einzelnen PAKs nicht selektiv genug, weshalb kommerzielle Tests oft als Summentests ausgelegt sind (Waters, 1997; Barceló, 1998; Chuang, 1998; Chuang, 2003; Nording, 2003). Vor allem innerhalb der letzten zehn Jahre wurden zunehmend Immunoassays auf der Basis der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) zur Detektion entwickelt. Diese beruht auf der Generierung eines evaneszenten elektromagnetischen Felds an der Oberfläche eines dünnen Metallfilms (50 – 100 nm), wobei typischerweise Goldfilme auf Glasoberflächen verwendet

werden. Dazu wird ein speziell polarisierter Lichtstrahl über ein Glasprisma unter Totalreflexion auf den Goldfilm gerichtet. Der Goldfilm absorbiert bestimmte Wellenlängen des entstehenden evaneszenten Feldes unter Anregung von Oberflächenplasmonen, was zu einer Abnahme der Intensität dieser Wellenlänge im reflektierten Lichtstrahl führt. Da die Absorption abhängig vom Winkel des eingestrahlten Lichts ist, tritt das Intensitätsminimum nur bei einem bestimmten Winkel auf, der als SPR-Winkel bezeichnet wird (siehe Abb. 9). Dieser Winkel kann wiederum durch eine Modifikation der Oberfläche des Goldfilms beispielsweise durch die Bindung von Molekülen an die Goldoberfläche verschoben werden. In SPR-Biosensoren wird dies ausgenutzt, um durch immobilisierte Fänger-moleküle an der Goldoberfläche den jeweiligen Bindungspartner aus einer Probenlösung zu binden, die über die Oberfläche (auf der unbelichteten Seite) geleitet wird. Da sich der SPR-Winkel mit zunehmender Masse der beschichteten Oberfläche verändert, wird die Winkeländerung über die Zeit gemessen, wodurch die Bildung der Antigen-Antikörper-Bindung in Echtzeit verfolgt werden kann (Hodnik, 2009; Shankaran, 2007; Marquette, 2006).



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung der Funktionsweise von SPR.

Zur Konzentrationsbestimmung verschiedener Analyten können prinzipiell die gleichen Assay-Varianten wie beim ELISA eingesetzt werden (direkt/indirekt, kompetitiv/nichtkompetitiv). Für die Detektion von Haptenen ist die durch Antigen-Bindung entstehende Massendifferenz jedoch sehr klein, weshalb hier das indirekt kompetitive Format bevorzugt wird (Hodnik, 2009; Rebe Raz, 2009). Für die Immobilisierung von Benzo[a]pyren, das bisher als einziger PAK mit SPR analysiert wurde (Homola, 2009), kann analog zum indirekt kompetitiven ELISA das BSA-Konjugat adsorptiv an die Oberfläche gebunden werden

(Miura, 2003; Gobi, 2003; Gobi, 2004; Kawazumi, 2005). Da die Messungen sequentiell erfolgen, ist eine Regeneration der Oberfläche nötig. Durch eine kovalente Kopplung von B[a]P-Derivaten oder B[a]P-Protein-Konjugaten an die Oberfläche kann die Regenerierbarkeit der Oberfläche deutlich verbessert werden (Dostalek, 2007; Gobi, 2005). Nachweisgrenzen von bis zu 50 ng/L wurden für B[a]P in Phosphatpuffer erreicht, allerdings wurden bisher keine Realproben vermessen.

Weitere immunologische Methoden zur PAK- bzw. B[a]P-Analytik beinhalten unter anderem verschiedene Fluoreszenz-Immunoassays (Kupstat, 2010; Ius, 1992), faseroptische Sensoren (Vo-Dinh, 1998; Tromberg, 1988), Mikrowaagen (Liu, 1999), *polarization modulation reflection absorption infrared spectroscopy* (PM-RAIRS; Boujday, 2009) *reflectometric interference spectroscopy* (RIFS; Länge, 2002) und elektrochemische Immunosensoren (Wang, 2011).

### 3 Antikörper

#### 3.1 Aufbau und Struktur von Antikörpern

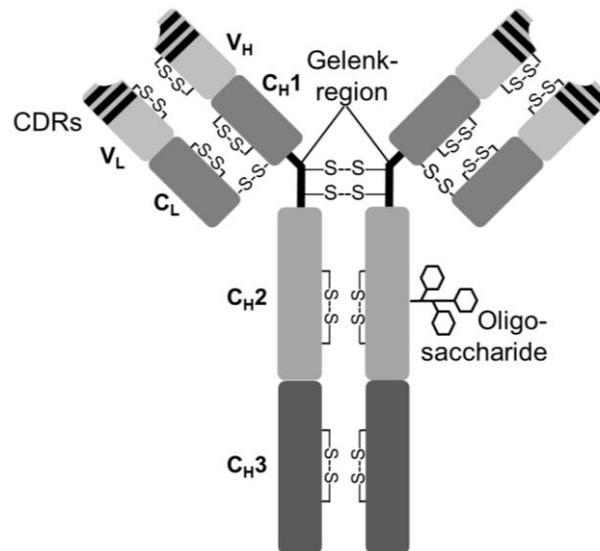
Als Antikörper werden Serumproteine der  $\gamma$ -Globulin-Fraktion bezeichnet, die spezifisch mit einem Antigen bzw. Epitop reagieren (Cruse, 2010). Sie werden zur Abgrenzung von anderen Globulinen auch als Immunglobuline bezeichnet und werden als Teil der humoralen Immunantwort von ausdifferenzierten B-Lymphozyten, sogenannten Plasmazellen gebildet (Kaufmann, 2014). Beim Eindringen eines als Antigen fungierenden Makromoleküls in einen Wirbeltierorganismus kann dieses an die Oberfläche eines B-Lymphozyten gebunden werden, wenn der jeweilige B-Zellrezeptor (*B cell receptor*, BCR) eine dem Antigen komplementäre Struktur aufweist (Harwood, 2010). Aktiviert durch die Ausschüttung verschiedener Interleukine durch T-Helferzellen finden nun eine Vermehrung der B-Zellen mit komplementären BCRs sowie ihre Ausdifferenzierung statt (Parker, 1993). Die dadurch erreichte gezielte Vermehrung der komplementären B-Lymphozyten wird als klonale Selektion bezeichnet und wurde erstmals in der Klonselektionstheorie formuliert (Burnet, 1957). Der Großteil der aktivierten B-Zellen differenziert zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen aus, ein kleinerer Teil aber auch zu Gedächtniszellen, die erst bei einer Sekundärinfektion wieder aktiv werden und so für einen langfristigen Schutz gegen das entsprechende Antigen sorgen (Reth, 1992).

Als Antigen kann dabei eine Vielzahl an chemischen Strukturen wirken, allerdings muss zur Auslösung einer Immunantwort ein gewisses Molekulargewicht überschritten sein. Die Bindung der Antikörper erfolgt hingegen lediglich an relativ kleinen Teilstrukturen, den sogenannten Epitopen (Kaufmann, 2014). Die hohe Vielfalt an Epitopen, mit denen Antikörper eine Bindung eingehen können, ist in der hohen Zahl von Antikörpern mit unterschiedlichen Bindungsstellen begründet. Diese liegt zum einen an den variablen Rekombinationsschritten der kodierenden (V-, (D-), J-)Gensegmente während der B-Zellreifung (zusammenfassend als *rearrangement* bezeichnet) und zum anderen an der hohen Mutationsrate (u. a. somatische Hypermutation) der B-Lymphozyten (Tonegawa, 1983; Kaufmann, 2014). Je nach Schätzung resultiert daraus eine theoretisch mögliche Anzahl unterschiedlicher Antikörper von  $10^8$  bis  $10^{12}$  (Di Noia, 2007; Cruse, 2010).

Eine Einteilung der Immunglobuline wird generell nach Unterschieden in den schweren Ketten getroffen, wobei die vorkommenden, fünf verschiedenen Ketten als  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  und  $\mu$  bezeichnet werden. Immunglobuline werden demzufolge in die Klassen IgA, IgG, IgD, IgE

und IgM eingeteilt. Geringere Unterschiede erlauben weiterhin die Unterteilung in sogenannte Subklassen, die im Fall von IgG für humane Antikörper mit IgG1 bis IgG4 und für murine Antikörper mit IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 bezeichnet werden (Kaufmann, 2014). Die leichten Ketten sind für alle Antikörperklassen und entweder vom  $\kappa$ - oder  $\lambda$ -Typ. Das Verhältnis von  $\kappa$ - zu  $\lambda$ -Ketten variiert speziesabhängig sehr stark (Cruse, 2010). IgM, die als Pentamere zu multivalenten Bindungen fähig sind und somit eine effektive Antigenbindung garantieren (Avidität), werden von aktivierten B-Lymphozyten zunächst gebildet (Harriman, 1993). Durch eine zweite Rekombination der entsprechenden DNA-Abschnitte wird im Verlauf einer Immunreaktion die  $\mu$ -Kette gegen  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - oder  $\epsilon$ -Ketten ausgetauscht, was einen Wechsel der Antikörperklasse zur Folge hat (Li, 2004). Dieser Prozess wird als *class switch recombination* bezeichnet (Chaudhuri, 2004). Die unterschiedlichen Antikörperklassen können dabei unterschiedliche Funktionen auslösen, die durch die jeweiligen schweren Ketten bedingt werden. Vor allem IgGs können neben der Neutralisation von Pathogenen durch Bindung und Agglutination darüberhinaus als Rezeptoren dienen und somit Phagozytose und die Aktivierung des Komplementsystems auslösen sowie die antikörperabhängige Zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) pathogener Zellen (Kaufmann, 2014; Reth, 1992).

Die Konzentrationen der unterschiedlichen Antikörperklassen variieren ebenfalls stark, wobei vor allem IgD und IgE nur in geringen Mengen vorkommen und zusammen weniger als 1% der Gesamtmenge an Immunglobulinen im Serum ausmachen. IgA kommt lokal begrenzt hauptsächlich in Schleimhäuten sowie Speichel vor und auch IgM macht maximal nur etwa 15% der gesamten Serumantikörper aus, wodurch IgGs die große Mehrheit an Antikörpern im Serum darstellen (Kaufmann, 2014). Mit etwa 13 mg/mL Serum machen sie 75 bis 85% der Gesamtmenge an Immunglobulinen aus (Luttmann, 2008). Aufgrund dieser Tatsache sowie gewisser weiterer Vorzüge gegenüber IgM (höhere Wasserlöslichkeit, größere Segmentflexibilität, bessere Diffusionseigenschaften) kommen in immunanalytischen Verfahren fast ausschließlich IgGs zum Einsatz. Abbildung 10 zeigt schematisch die Struktur eines IgG-Moleküls.



**Abbildung 10:** Molekülstruktur eines IgG-Antikörpers (C: konstante Domänen, V: variable Domänen, H: schwere Kette, L: leichte Kette).

IgGs sind Tetramere von etwa 150 kDa, die aus jeweils zwei identischen schweren Ketten (H; ca. 55 kDa) und zwei leichten Ketten (L; ca. 22 kDa) bestehen, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Kuby, 2007). Schwere und leichte Kette können in vier bzw. zwei Domänen unterteilt werden, die jeweils aus zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut sind und durch eine intramolekulare Disulfidbrücke stabilisiert werden. Die N-terminalen Domänen von schweren und leichten Ketten werden als variable Domänen bezeichnet ( $V_L$  bzw.  $V_H$ ) und die übrigen ( $C_L$ ,  $C_{H1}$  bis  $C_{H3}$ ) als konstante Domänen (Lottspeich, 2006). Zur Bildung der IgG-Struktur lagern sich die homologen Domänen von schweren und leichten Ketten zusammen, wobei leichte und schwere Ketten über eine Disulfidbrücke zwischen  $C_L$  und  $C_{H1}$  kovalent verknüpft sind und die beiden schweren Ketten durch mindestens zwei Disulfidbrücken in der *hinge*-Region (Zhang, 2009). Als *hinge*-Region wird der flexible Übergang zwischen  $C_{H1}$  und  $C_{H2}$  bezeichnet, der die beiden Fab-Arme mit dem Fc-Teil des Antikörpers verbindet und für eine Flexibilität der beiden variablen Domänen im Abstand zueinander sorgt.

Die variablen Domänen spielen die entscheidende Rolle für die Antigenbindung, da an ihrem N-terminalen Ende die Antigenbindestelle (Paratop) liegt. Daher ist hier auch die größte Variabilität in der Aminosäuresequenz zwischen verschiedenen Antikörpern zu finden, während die konstanten Domänen in ihrer Primärstruktur, vor allem aber in der Sekundärstruktur stark konserviert sind. Die Sequenzvariabilität konzentriert sich dabei vor allem auf jeweils drei Bereiche innerhalb der  $V_L$ - bzw.  $V_H$ -Domäne, die daher auch als hypervariable Bereiche bezeichnet werden. Diese sechs hypervariablen Schleifen bilden den

Großteil der Antigenbindestelle und werden daher auch als *complementarity determining regions* (CDRs) bezeichnet (Lottspeich, 2006; Killard, 1995). In Abhängigkeit von der Größe des Antigens tragen die sechs CDRs unterschiedlich stark zur Antigen-Bindung bei. Kleine Antigene (Haptene) werden meist von konkaven Paratopen gebunden, die zentral am Übergang zwischen leichter und schwerer Kette liegen. Hier befinden sich die als CDR3 bezeichneten Schleifen beider Ketten. Antigenbindung durch CDR1 und CDR2 spielt dagegen meist erst bei größeren Antigenen wie Proteinen eine Rolle (MacCallum, 1996). Zwischen den CDRs befinden sich Regionen, die meist stark konservierte Aminosäuresequenzen aufweisen und als *framework regions* (FR) bezeichnet werden (Kabat, 1992). Die FRs wechselwirken kaum direkt mit dem Antigen, tragen jedoch durch ihren Einfluss auf die Sekundärstruktur der CDRs indirekt zu deren Interaktion mit dem Antigen bei (David, 2007; Padlan, 1994). Die Bindung zwischen Antigen und Antikörper beruht auf nichtkovalenten Wechselwirkungen, wobei in Abhängigkeit von der Struktur des Antigens Wasserstoffbrücken, ionische Wechselwirkungen, van der Waals-Wechselwirkungen, hydrophobe Wechselwirkungen und sterische Abstoßung in unterschiedlichen Anteilen zur Bindungsstärke (Affinität) beitragen können (Cruse, 2010).

### **3.2 Herstellung polyklonaler und monoklonaler Antikörper**

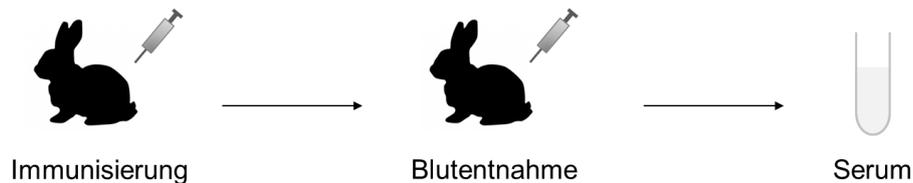
Die einfachste Art der Herstellung von Antikörpern mit definierter Spezifität ist die Immunisierung eines Wirbeltiers mit dem Antigen und die Gewinnung des Antikörper enthaltenden Serums. Dieses Antiserum beinhaltet dann Antikörper gegen verschiedene Epitope des Antigens mit unterschiedlichen Affinitäten und Selektivitäten, die aus einer Vielzahl von B-Zelllinien stammen und daher als polyklonal bezeichnet werden. Zur Herstellung polyklonaler Antikörper wird das Antigen in der Regel als Emulsion in sogenannten Adjuvantien zugegeben, die die Auslösung einer Immunreaktion und damit die Produktion von Antikörpern sicherstellen sollen (Lottspeich, 2006). Oftmals werden Mineralölemulsionen verwendet, da diese die Freisetzung des Antigens von der Injektionsstelle in den übrigen Organismus verlangsamen (Depotwirkung). Ihnen werden abgetötete Bakterien zugesetzt, die ein hohes immunogenes Potenzial aufweisen (Freund'sches komplettes/inkomplettes Adjuvans). Daneben können auch Aluminiumverbindungen verwendet werden, die allerdings eine schlechtere Depotwirkung zeigen (Luttmann, 2008). Auch die Art der Injektion (besser/schlechter durchblutetes Gewebe) beeinflusst die Verbreitung des Antigens im Organismus. Meist wird subcutan

injiziert (Rehm, 2010). Die Immunisierung des Wirbeltiers erfolgt mehrmals im Abstand von einigen Wochen, wobei der Primärinjektion mehrere *booster*-Immunisierungen folgen, die die Aktivierung der B-Gedächtniszellen sowie den vollständigen Klassenwechsel von IgM zu IgG garantieren.

Proteine, Zellen und Viren sowie deren Fragmente können bei ausreichender Reinheit in aller Regel direkt als Immunogene eingesetzt werden. Da diese mehrere verschiedene Epitope aufweisen, werden so Antikörper mit ganz unterschiedlichen Bindestellen gebildet. Zur Herstellung von Antikörpern gegen ein definiertes Epitop wird in solchen Fällen oftmals mit rekombinanten Antigenfragmenten gearbeitet (Kusano, 2014; Moriette, 2005). Problematisch können hierbei allerdings Unterschiede in der Sekundär- und Tertiärstruktur werden, die im Fragment unter Umständen nicht entsprechend dem nativen Antigen ausgebildet werden können, wodurch die gebildeten Antikörper das Epitop im kompletten Antigen nicht erkennen (Luttmann, 2008). Unterschreitet das Antigen eine gewisse Größe, die etwa im Bereich von 5 kDa liegt, so wird eine Kopplung des Antigens an größere Moleküle nötig, um eine ausreichende Immunogenität zu gewährleisten (Lottspeich, 2006). Das Antigen wird dann als Hapten bezeichnet. Als Trägermoleküle werden meist Proteine, wie Albumine verschiedener Spezies (z. B. BSA, HSA oder OVA), Thyreoglobulin oder Hämocyanin, eingesetzt (Märtlbauer, 1988; Maragos, 2006; Weigele, 1964).

Zur Gewinnung polyklonaler Seren (siehe Abb. 11) werden insbesondere für kleine Moleküle standardmäßig Kaninchen eingesetzt. Sollen in größerem Maßstab Seren gewonnen werden, werden auch große Wirbeltiere wie Ziegen oder Pferde immunisiert, allerdings müssen hier dementsprechend höhere Antigenmengen eingesetzt werden (Luttmann, 2008). Mäuse hingegen liefern mit nur wenigen hundert Mikrolitern Serum für die meisten Anwendungen zu geringe Serummengen (Rehm, 2010). Seltener durchgeführt werden Immunisierungen an Hühnern, aus deren Eiern zwar vergleichsweise große Antikörpermengen gewonnen werden (sog. IgY), was jedoch einer aufwendigeren Aufreinigung bedarf (Kovacs-Nolan, 2012). Auch Immunisierungen von Cameliden zur Gewinnung von *heavy chain* Antikörpern (hcIgG), die lediglich aus zwei schweren Ketten bestehen und nur von dieser Säugetierfamilie produziert werden (Hamers-Casterman, 1993), werden meist nur für Spezialanwendungen durchgeführt. Zur Gewinnung der Antikörper wird bei ausreichend hohem Antikörpertiter nach den Immunisierungen Blut entnommen und das Antikörper-haltige Serum abgetrennt. Polyklonale Seren können prinzipiell direkt in der Immunanalytik eingesetzt werden (Thirumala-Devi, 2000) oder erst nach Aufreinigung und Aufkonzentrierung (Luttmann,

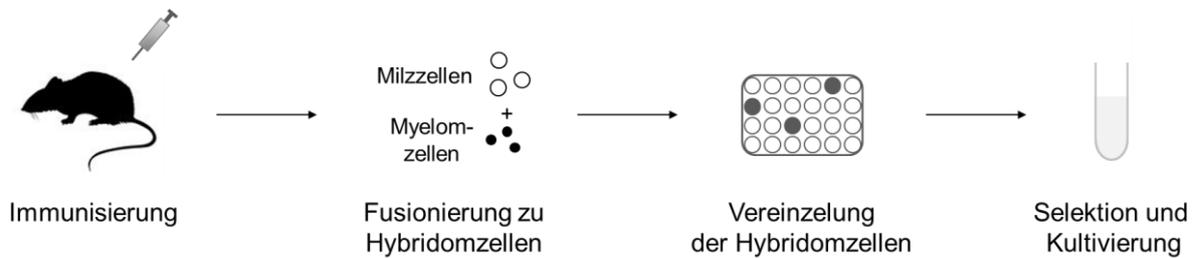
2008). Dies kann beispielsweise durch Fällung der Antikörper mit Ammoniumsulfat, Verwendung von Protein A/G-Affinitätsäulen mit einer Breitband-Affinität gegen unterschiedliche Antikörperklassen und Antikörpersubklassen oder durch eine Affinitätsreinigung mit immobilisiertem Antigen, die beispielsweise für die Herstellung von Enzymkonjugaten nötig ist, erfolgen (Rehm, 2010).



**Abbildung 11:** Herstellung polyklonaler Antikörper.

Im Unterschied zu polyklonalen Antikörpern werden Antikörper, die von Klonen einer einzigen B-Zelle produziert werden und damit identische Antigenbindestellen aufweisen, als monoklonale Antikörper bezeichnet. Zur Herstellung monoklonaler Antikörper (Abb. 12) müssen ebenfalls zunächst Versuchstiere mit dem Antigen immunisiert werden, denen aber nach vier bis acht Wochen und mehreren Folgeimmunisierungen die Antikörperproduzierenden Zellen direkt entnommen werden. Meist werden Milz oder Lymphknoten isoliert. Zur Herstellung kultivierbarer, Antikörper-produzierender Zellen werden die gewonnenen Lymphozyten mit neoplastischen Myelomzellen, also entarteten B-Zellen, die keine Antikörper produzieren können, verschmolzen (Köhler, 1975). Meist werden hierfür Mauszelllinien (SP2/0-AG14 und X63AG8.653) eingesetzt (Kawamura, 1989; Hack, 1988). Die so erhaltenen Hybridomzellen vereinigen die Fähigkeiten zur Antikörperproduktion mit der unbegrenzten Teilung der Tumorzellen (Immortalität) und lassen sich so als unsterbliche Zellklone theoretisch zeitlich und quantitativ unbegrenzt kultivieren. Zur Fusion werden beide Zelltypen vermischt und mit Polyethylenglykol (PEG) inkubiert (Kennett, 1979). Anschließend werden die fusionierten Zellen durch Kultivierung mit HAT(Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin)-Medium selektiert, das einerseits die Nukleotidsynthese blockiert, andererseits aber Edukte für einen alternativen Syntheseweg zur Verfügung stellt. Dieser kann von den Myelomzellen aufgrund eines induzierten Enzymmangels (HGPRT) nicht genutzt werden, so dass nach Absterben der nichtfusionierten B-Lymphozyten aufgrund ihrer begrenzten Lebensdauer in Kultur nur fusionierte Hybridomzellen überleben (Killard, 1995). Diese werden anschließend vereinzelt, um monoklonale Zellkulturen zu erhalten. Aus den

Zellkulturüberständen werden nach Aufreinigung monoklonale Antikörper erhalten (Luttmann, 2008; Bailon, 2000; Fitzpatrick, 2004). Da auch aus kleinen Wirbeltieren ausreichende Mengen an Splenocyten zur Herstellung monoklonaler Antikörper gewonnen werden können, hat sich der Einsatz von Mäusen bewährt, die bezüglich einer kosteneffektiven Anschaffung und Haltung sowie genetischer Uniformität (z. B. Balb/c) Vorteile bieten (Overkamp, 2006).



**Abbildung 12:** Schema zur Herstellung monoklonaler Antikörper.

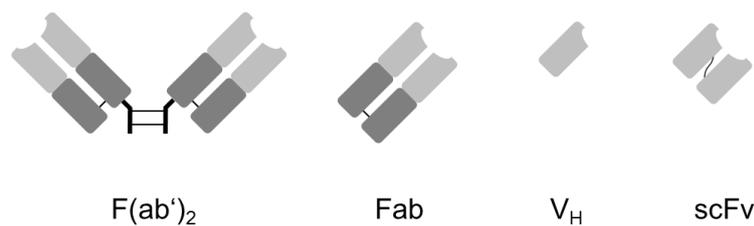
Trotz der im Vergleich zu polyklonalen Antikörpern ungleich aufwendigeren Herstellung stellen monoklonale Antikörper mittlerweile die Mehrheit der produzierten Antikörper dar (Borrebaeck, 2007). Ihr großer Vorzug ist die unbegrenzte Verfügbarkeit sowie eine gleichbleibende Qualität der Antikörper aufgrund der Unabhängigkeit vom Versuchstier (Luttmann, 2008; Winklmaier, 1997). Daneben bietet aber vor allem die chemische Einheitlichkeit der IgG-Moleküle Vorteile hinsichtlich einer Charakterisierung der Antigenbindung sowie der Auswahl von Klonen mit im Hinblick auf die jeweilige Anwendung möglichst optimalen Eigenschaften (Darwish, 2006; Bonwick, 2004). So kann beispielsweise eine geringe Bindungsselektivität, die bei polyklonalen Antikörpern oftmals Probleme bereitet, durch Auswahl eines monoklonalen Antikörpers mit hoher Selektivität vermieden werden. Allerdings sind dazu unter Umständen sehr zeitaufwendige Selektionsprozesse nötig, bis ein geeigneter monoklonaler Antikörper gefunden ist, was bei polyklonalen Antikörpern entfällt (Karsunke, 2011a; Rieger, 2009). Ein typisches Einsatzgebiet polyklonaler Antikörper ist beispielsweise die Anwendung antiisotypischer Antikörper, die gegen die konstanten Regionen von Antikörpern einer Spezies gerichtet sind (z. B. Pferd anti-Maus Antikörper). Im ELISA können mit markierten, als Sekundärantikörper bezeichneten Spezies-spezifischen Antikörpern Primärantikörper detektiert werden, die das Antigen gebunden haben (Cruse, 2010).

### 3.3 Herstellung von Antikörperfragmenten

Gerade bei einem therapeutischen Einsatz von Antikörpern bietet die Verwendung von Antikörperfragmenten, die die Antigenbindestelle beinhalten, aber denen verschiedene andere Domänen fehlen, gewisse Vorteile gegenüber vollständigen Antikörpern. Neben einer rein ökonomischen Optimierung des Verhältnisses von Proteinmasse zu Antigenbindestelle (Harris, 1999) weisen Antikörperfragmente veränderte physiologische oder pharmakologische Eigenschaften auf, die hauptsächlich mit dem Fehlen des Fc-Teils zusammenhängen. Dadurch fehlt die Möglichkeit zur Ausübung immunologischer Effektorfunktionen wie der Aktivierung des Komplementsystems oder der ADCC. Sind diese Effektorfunktionen unerwünscht und lediglich die Bindung und Blockierung eines Antigens (z. B. eines Rezeptors) benötigt, sind Fragmente den entsprechenden kompletten Antikörpern vorzuziehen. Durch die Verwendung monovalenter Fragmente kann darüber hinaus auch eine Agglutination der Antigene unterdrückt werden (Stuttle, 1991). Wegen ihres geringeren Molekulargewichts weisen Antikörperfragmente meist relativ kurze Halbwertszeiten im Körper auf, was beispielsweise in der Neutralisierung von Toxinen von Vorteil sein kann (Roskos, 2004). Schließlich ist wegen fehlender Glykosylierung eine rekombinante Herstellung von Antikörperfragmenten auch für einen therapeutischen Einsatz in prokaryotischen Expressoren möglich, was die Produktion gegenüber eukaryotischen Organismen deutlich vereinfacht.

Traditionell erfolgt die Herstellung von Fragmenten durch Spaltung von ganzen Immunglobulinen mit Proteasen wie Papain oder Pepsin, die IgG bevorzugt in der *hinge*-Region proteolytisch spalten. Mit Pepsin erfolgt die Spaltung C-terminal zur zentralen Disulfid-Brücke, die die schweren Ketten verbindet, so dass ein bivalentes, als  $F(ab')_2$  bezeichnetes Fragment entsteht (ca. 95 kDa), sowie deutlich kleinere Fragmente aus den  $C_H2$ - und  $C_H3$ -Domänen (Cruse, 2010). Da Pepsin nur im Sauren aktiv ist, müssen Pepsin-Spaltungen bei pH-Werten unter 5.0 durchgeführt werden, wobei mit niedrigeren pH-Werten die Ausbeute an  $F(ab')_2$  zunimmt (Parham, 1983). Nach Isolierung der  $F(ab')_2$ -Fragmente können diese entweder direkt eingesetzt werden oder durch milde Reduktionsmittel (meist Thiole) zu den monovalenten  $Fab'$ -Fragmenten reduziert werden (Love, 1993). Die nun freien Mercaptogruppen der Cysteine werden im Anschluss oftmals durch Alkylierung abgefangen, können aber auch für eine selektive Konjugation der Fragmente an andere Proteine (Enzyme) oder verschiedene Oberflächen genutzt werden (Wilson, 2002). Da hierbei die Antigenbindestelle maximal vom Konjugationspartner entfernt ist, wird die Antigenbindung nicht beeinflusst. Wird auf eine Weiterreaktion des Fragments sowie eine bivalente

Antigenbindung dagegen verzichtet, so wird die relativ aufwendige Herstellung des Fab<sup>'</sup> durch den Einsatz von Fab-Fragmenten umgangen. Diese werden in der Regel mit Papain, einer Thiol-Protease, gewonnen, die bevorzugt am N-terminalen Ende der *hinge*-Region spaltet (Cruse, 2010). Dadurch entstehen je IgG zwei monovalente Fab-Fragmente (ca. 47 kDa) sowie ein meist intaktes Fc-Fragment (ca. 50 kDa), das aus den über Disulfidbindungen verbundenen C<sub>H</sub>2- und C<sub>H</sub>3-Domänen besteht (Luttmann, 2008). Da Papain eine Mercaptogruppe im aktiven Zentrum enthält, muss diese vor der Reaktion durch Reduktion mit Cystein aktiviert werden und die gesamte Enzymreaktion unter reduzierenden Bedingungen, d. h. Anwesenheit von Cystein, durchgeführt werden. Wird das überschüssige Cystein vor der Reaktion entfernt, so entstehen auch mit Papain bevorzugt F(ab<sup>'</sup>)<sub>2</sub>-Fragmente (Parham, 1982). Da diese Reaktion aber meist schwer zu kontrollieren ist, wird zur F(ab<sup>'</sup>)<sub>2</sub>-Herstellung in aller Regel Pepsin verwendet. Um die in Abhängigkeit vom eingesetzten Antikörper mehr oder weniger starke Unspezifität der Spaltung mit Pepsin und Papain zu umgehen, wurden verschiedene weitere Proteasen wie Clostripain oder Lysyl-Endopeptidase zur Herstellung von Antikörperfragmenten getestet (Yamaguchi, 1995). Da die Effizienz der Spaltung hier aber meist noch stärker von Antikörperspezies bzw. -subklasse abhing als bei den Standardenzymen, konnten sich diese für Routineanwendungen bisher nicht durchsetzen.



**Abbildung 13:** Verschiedene Fragmente von IgG-Antikörpern.

Da mittlerweile fast ausschließlich immobilisierte Enzyme zur Anwendung kommen, die nach der Reaktion leicht durch Zentrifugation vom Produktgemisch abgetrennt werden können, kann die Isolierung von F(ab<sup>'</sup>)<sub>2</sub>- und Fab-Fragmenten analog zur Aufreinigung kompletter Antikörper affinitätschromatographisch erfolgen, wobei die spezifische Bindung ausschließlich entweder am Fab- oder dem Fc-Teil erfolgen sollte. Als Bindungspartner der Fab-Region kommt dabei immobilisiertes Antigen oder Protein L in Betracht, während der Fc-Teil von Protein A und G gebunden wird (Nilson, 1992; Aybay, 2003). Problematisch kann hierbei die aufwendige Herstellung von Antigen-Festphasen sowie eine ungenügende Affinität von Protein A oder L sein, die für Antikörper verschiedener Spezies und Subklassen

stark variieren kann (Luttmann, 2008; de Château, 1993). Protein G kann darüberhinaus bei einigen Antikörpern auch in der Fab-Region binden, was eine effektive Trennung der produzierten Fragmente verhindert (Erntell, 1988). Ist eine ausreichende Reinheit, die vor allem für röntgenkristallographische Strukturuntersuchungen möglichst hoch sein sollte, mittels Affinitätschromatographie nicht zu erreichen, so kann die Aufreinigung auch durch Ionen- oder Größenausschlusschromatographie, seltener mit präparativer Gelelektrophorese, erfolgen (Zhao, 2009; Coleman, 2003). Die Analyse der produzierten Fragmente erfolgt standardmäßig mittels SDS-PAGE und MALDI/TOF, sowie in jüngerer Zeit auch mit hochauflösender ESI-Massenspektrometrie (Luttmann, 2008; Adamczyk, 2000). Mit dieser konnte gezeigt werden, dass mit enzymatischer Spaltung ganzer Antikörper unter Umständen keine vollständig homogenen Fragmente geschaffen werden, sondern eine gewisse Inhomogenität durch Überverdau, asymmetrische Spaltung oder Thiol/Disulfidaustausch besteht. Diese Mikroheterogenität hat zwar in aller Regel keinen Einfluss auf die Antigenbindung, kann jedoch bei Anwendungen, die eine hohe Reinheit erfordern, wie dies beispielsweise in der Röntgenkristallographie der Fall ist, von Nachteil sein.

Vollständig einheitliche Fragmente können hingegen durch den Einsatz rekombinanter Techniken hergestellt werden. Diese beruhen auf der Verwendung der genetischen Information aus Antikörper-kodierenden Genen, mit deren Hilfe die codierten Antikörper *in vitro* produziert werden. Die Palette der so herstellbaren Antikörper reicht dabei vom kompletten IgG bis zum kleinsten Antigen-bindenden Fragment, der aus den beiden Fv-Domänen besteht (Smith, 2004). Da diese natürlicherweise nicht miteinander verknüpft sind, wird rekombinant eine Peptidbrücke eingeführt, um ein stabiles Fragment zu erhalten. Ganze Antikörper werden meist für therapeutische Anwendungen hergestellt und stellen oftmals chimäre oder humanisierte Varianten tierischer IgGs dar (Loisel, 2007). Für einen Einsatz in der Immunanalytik wird dagegen vor allem zum Nachweis von Haptenen auf Fab- oder scFv-Fragmente zurückgegriffen, die keinen posttranslationalen Modifizierungen (Glykosylierungen) unterworfen werden müssen, um korrekt gefaltete und damit effektiv bindende Immunglobuline zu bilden (Kramer, 2003). Dadurch können beide Fragmente auch in prokaryotischen Expressionssystemen (z. B. *E. coli*) produziert werden, was die wesentlich aufwendigeren eukaryotischen Zellkulturen überflüssig macht (Plückthun, 1989). Dies wurde erst durch die Einführung bestimmter Leitsequenzen ermöglicht, die für einen Transport der Fragmente aus dem reduzierenden bakteriellen Zytoplasma in den periplasmatischen Raum

sorgen, wo vor allem durch die Ausbildung von Disulfidbrücken die korrekt gefalteten Tertiär- und Quartärstrukturen angenommen werden (Skerra, 1988).

Die Gewinnung der DNA-Sequenzen mit der benötigten genetischen Information kann entweder aus monoklonalen Hybridomzellkulturen erfolgen, um so ein rekombinantes Antikörperfragment mit definierter Antigenbindung zu erhalten, oder aus mehr oder weniger komplexen DNA-Bibliotheken, aus denen dann ein Fragment mit den gewünschten Eigenschaften ausgewählt werden kann. Die Komplexität der jeweiligen Bibliothek hängt dabei von der Wahl der Ausgangsmaterialien ab. Wird die genetische Information aus definierten Zelllinien natürlicher Spender beispielsweise in Form der B-Zellen gewonnen, so ist die Komplexität eher gering, die Aussicht auf Herstellung affiner Antikörperfragmente aber hoch. Wird die Bibliothek dagegen auf Basis zufälliger Oligonukleotide rein synthetisch hergestellt, ist zur Gewinnung hochbindender Fragmente eine deutlich größere Bibliothek nötig (Breitling, 1999). Gerade in der Immunanalytik werden rekombinante Antikörperfragmente (rAk) meist auf Basis natürlicher Spender synthetisiert (Luttmann, 2008). Hierbei muss zunächst die mRNA aus den eingesetzten Zelllinien isoliert und mittels *reverse transcriptase* Polymerasekettenreaktion (PCR) in die entsprechende cDNA umgewandelt werden. Mit Hilfe spezifischer Primer, die die Amplifikation der V<sub>L</sub>- und V<sub>H</sub>-Genabschnitte erlauben (Kabat, 1991), werden diese mittels PCR in ausreichenden Mengen hergestellt (Larrick, 1989) und in geeignete Expressionsvektoren kloniert. Diese werden in das entsprechende Expressionssystem transferiert, wo nun die rAk-Produktion abläuft (Orlandi, 1989; Sastry, 1989). Hierfür hat sich die Nutzung von *E. coli* etabliert (Better, 1988; Skerra, 1988).

Die Selektion affiner Antikörperfragmente erfolgt gerade bei sehr großen Antikörperbibliotheken (bis zu 10<sup>9</sup> verschiedene Klone) meist über Phagendisplay (Filpula, 2007). Dieser basiert auf der Kombination der genetischen Information eines Antikörperfragments mit der eines Phagen-Hüllproteins im Expressionsvektor (McCafferty, 1990; Clackson, 1991). Im Zuge der Expression dieser genetischen Information wird das produzierte Antikörperfragment teilweise mit dem Hüllprotein gekoppelt, wodurch die entsprechenden Phagen dann sowohl die genetische Information eines Antikörperfragments besitzen als auch das Fragment selbst an ihrer Oberfläche tragen. Die physikalische Kombination von Genotyp und Phänotyp erlaubt dann die Selektion bindender rAks durch immobilisiertes Antigen (*biopanning*; Pande, 2010). Alternativ können auch Ribosomen- oder Hefe-Display eingesetzt werden, um Antikörper zu selektieren (Filpula, 2007).

Neben der Möglichkeit, vollständig homologe Antikörperfragmente herzustellen, ist vor allem die einfache Fusion der Fragmente mit Proteinen, Peptiden oder Rezeptoren ein großer Vorteil von rAks. So erfolgt die Aufreinigung der hergestellten Fragmente meist über gekoppelte Peptide (*Strep-tag*, *His-tag*), die an bestimmte Affinitätsliganden binden (Skerra, 1994), aber auch eine einfache Kopplung von Enzymen als Marker ist möglich (Benito, 1993; Kaplan, 1997).

### **3.4 Charakterisierung der Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen**

Die Charakterisierung von Antikörpern kann mit einer Vielzahl an Methoden erfolgen. In der Immunanalytik sind vor allem Affinität und Selektivität des Antikörpers entscheidend, aber auch Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen sind gerade bei einer weiteren Umsetzung des Antikörpers von Bedeutung. Für eine fundierte Charakterisierung des Antikörpers werden meist Aminosäuresequenzen, posttranslationale Modifikationen (Glykosylierungen) sowie dreidimensionale Strukturen untersucht.

Eine grobe Abschätzung der Antikörperkonzentration wird meist photometrisch bei 280 nm durchgeführt. Für eine genauere Konzentrationsbestimmung können die in der Proteinanalytik weit verbreiteten Tests nach Lowry oder Bradford durchgeführt werden (Luttmann, 2008). Die Reinheitskontrolle kann massenspektrometrisch mittels MALDI/TOF-MS erfolgen, deren Massenbereich groß genug ist, um auch die mit etwa 150 kDa relativ schweren Antikörper ohne Dekonvolution zu detektieren (Karas, 1988). Allerdings gestalten sich aufgrund der Masse Ionisierung und Transfer durch den Flugzeitanalysator bei Antikörpern schwierig, so dass mit geringen Ionenausbeuten und schlechten Signal/Rausch-Verhältnissen gearbeitet werden muss. Auch gelelektrophoretisch kann eine Reinheitskontrolle mittels SDS-PAGE erfolgen (Lottspeich, 2006). Wird dieser standardgemäß unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt, so werden die Disulfidbrücken zwischen den einzelnen Ketten gespalten, so dass die erhaltenen Banden die Massen von leichten und schweren Ketten repräsentieren. Wird unter nativen Bedingungen gearbeitet, so kann dagegen eine Bande für den Antikörper erhalten werden. Aufgrund der Masseungenauigkeit von SDS-PAGE können hierbei aber verschiedene IgG nicht unterschieden werden (Adamczyk, 2000).

Die Analyse von Aminosäuresequenzen und chemischen Modifikationen kann ebenfalls massenspektrometrisch erfolgen. Hierbei werden meist mehr oder weniger große Fragmente analysiert, die aus einer unspezifischen Fragmentierung durch Reduktion (Yang, 2007) oder enzymatischen Abbau resultieren (Yan, 2007a; Sun, 2001). Typischerweise erfolgt vor der

MS-Analyse eine chromatographische Auftrennung der Fragmente mit RP-HPLC. Je nach Methode kann eine Fragmentierung auch innerhalb der Massenspektrometers erfolgen (Siuti, 2007; Zhang, 2009).

Die dreidimensionale Struktur von Antikörpern kann mittels NMR-Spektroskopie oder Röntgenkristallographie bestimmt werden. Da sich die Herstellung regulärer Proteinkristalle von ganzen Antikörpern aufgrund ihrer hohen Flexibilität schwierig gestaltet und da meist lediglich Informationen über die Antigenbindestelle benötigt werden, werden in aller Regel enzymatisch oder rekombinant hergestellte Fragmente verwendet. Die Kristallisation erfolgt durch die Zugabe von Fällungsmitteln wie Salze, organische Lösemittel und Polymere (Cudney, 1994; Carter 1979), die der Proteinlösung nach und nach Wasser entziehen und so Keimbildung und Kristallwachstum begünstigen. Regelmäßige Einkristalle werden durch die Bildung weniger Kristallisationskeime und langsames Wachstum erzielt. Da die idealen Kristallisationsbedingungen stark schwanken und schlecht vorhersagbar sind, werden meist breit angelegte Screenings durchgeführt und Parameter wie pH-Wert, Art und Konzentration des Fällmittels sowie die Zugabe zusätzlicher Salze variiert (Jancarik, 1991). Meist werden Kristallisationsverfahren eingesetzt, die auf Dampfdiffusion beruhen und im sog. *sitting drop*- oder *hanging drop*-Modus ausgeführt werden können (Abb. 14).



**Abbildung 14:** Prinzip von *sitting drop*- (links) und *hanging drop*-Kristallisationsverfahren.

Röntgenbeugung an Proteinkristallen kann entweder an Labor-Röntgenquellen (meist Cu-Anoden) oder mit Hilfe von Synchrotronstrahlung durchgeführt werden. Dabei wird die eingehende Strahlung von den Atomen im Kristall bzw. deren Elektronen in alle Richtungen gestreut, wobei vor allem kohärente Streuung (gleichbleibende Wellenlänge, Thompson-Streuung) zur Gesamtstreuung beiträgt (Rupp, 2009). Da die Atomabstände im Kristall in etwa der Wellenlänge der eingehenden Röntgenstrahlung entsprechen, kommt es nun zu Interferenzen der gestreuten Wellen, wobei nur in bestimmte Richtungen konstruktive Interferenz vorliegt, die so ein bestimmtes Streumuster ergibt, das detektiert wird. Aus der Symmetrie der gestreuten Strahlung kann dann auf die Anordnung der streuenden Atome geschlossen werden. So kann beispielsweise die dreidimensionale Struktur der

Antigenbindestelle oder bei Kokristallisation mit dem Antigen die Anordnung des Epitops im Paratop ermittelt werden.

Die Affinität von Antikörpern kann mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) oder ELISA bestimmt werden. Die Affinität wird über die Gleichgewichtskonstante der Antigen-Antikörper-Reaktion beschrieben und definiert die Bindungsstärke des Antikörpers zum Antigen. Dabei wird unter Affinität die Bindung eines Epitops an ein Paratop verstanden, während eine Bindung mehrerer Paratope der mindestens bivalenten Antikörper (Avidität) zu einer zusätzlichen Bindungsverstärkung führt (Luttmann, 2008). Die für die Affinitätsbestimmung zu betrachtende Gleichung beinhaltet demnach nur die Bindung eines Antigens an den Antikörper.



Die Affinitätskonstante  $K_a$  ist als Gleichgewichtskonstante der Hinreaktion über das Massenwirkungsgesetz definiert (Gl. 2) (Marquette, 2006).

$$K_a = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[AgAk]}{[Ag][Ak]} \quad (2)$$

Ebenso kann die Gleichgewichtskonstante über die Änderung der freien Standardreaktionsenthalpie definiert werden (Gl. 3).

$$\Delta G^\theta = -RT \ln K_a \quad (3)$$

Die Gleichungen zeigen die prinzipiellen Ansätze zur experimentellen Bestimmung der Affinitätskonstanten. So ist zum einen aus kalorimetrischen Messungen die Differenz der freien Standardreaktionsenthalpie zugänglich, aus der dann wiederum  $K_a$  berechnet werden kann (Pierce, 1999). Eine weitere Möglichkeit ergibt sich über die Bestimmung der kinetischen Assoziations- und Dissoziationskonstanten, aus deren Verhältnis die Affinitätskonstante berechnet werden kann. Mit SPR kann der zeitliche Verlauf der Antigen-Bindung bzw. -Dissoziation sichtbar gemacht werden (Yuan, 2009; Katsamba, 2006; Mani, 1994; Mychtych, 2009; Pol, 2007). Um Aviditätseffekte auszuschließen, ist hierbei ein direkter Assay mit Immobilisierung von Fänger-Antikörpern von Vorteil (Canziani, 2004).

Eine Messung der absoluten Konzentrationen von Antikörper, Antigen und Antigen-Antikörper-Komplex ist generell schwierig und meist nur durch eine physikalische Trennung von gebundenem und ungebundenem Antikörper mit Methoden wie Chromatographie oder Bindung an magnetische Partikel möglich (Neri, 1996). Eine Abschätzung der Affinität kann jedoch durch Verdünnungsexperimente mittels verschiedener Immunoassays erfolgen, bei denen ein Gleichgewicht zwischen ungebundenem und gebundenem Antikörper vorliegt. Dies ist beispielsweise mit kompetitiven ELISAs möglich (Cervino, 2008; Neri, 1996). Durch schrittweises Verdünnen der Konzentrationen von immobilisiertem Antigen und Antikörper unabhängig voneinander wird eine Annäherung des Testmittelpunkts der sigmoidalen Kalibrierfunktion an einen minimalen Wert erreicht, der zur Abschätzung der Antikörperaffinität dienen kann. Problematisch hierbei ist die relativ langsame Diffusion der Antikörper an die Oberfläche bei Verwendung des indirekt kompetitiven Formats, die lange Zeiten bis zur Einstellung des Gleichgewichts nötig macht (Cammann, 2001). Bei Verwendung des direkt kompetitiven Formats wiederum kann ein homogenes Analyt-Antikörper-Gleichgewicht aufgrund der Antikörperimmobilisierung nicht sichergestellt werden, weshalb der so erhaltene minimale  $IC_{50}$  nicht unbedingt die tatsächliche Affinität des Antikörpers wiedergeben muss (Cervino, 2008). Typische Werte für die Affinitätskonstanten monoklonaler Antikörper liegen bei Antikörpern geringerer Affinität im Bereich von  $10^6 - 10^7 \text{ M}^{-1}$ , hochaffine Antikörper zeigen typischerweise Affinitätskonstanten von etwa  $10^9 - 10^{12} \text{ M}^{-1}$  (van Heyningen, 1986).

Neben der Affinität eines Antikörpers ist auch dessen Selektivität bezüglich des jeweiligen Analyten, das heißt das Vorliegen eventuell kreuzreaktiver Substanzen in der Immunanalytik von Interesse. Die Kreuzreaktivität (CR) eines Moleküls bezüglich des eigentlichen Analyten ist definiert als das Verhältnis der Affinitätskonstanten des Analyts relativ zu der des Kreuzreaktanden (Johnston, 1976). Zur einfacheren experimentellen Bestimmung wird meist das Verhältnis der  $IC_{50}$ -Werte verwendet (Gl. 4).

$$CR [\%] = \frac{IC_{50}(\text{Analyt})}{IC_{50}(\text{Kreuzreaktand})} \cdot 100 \% \quad (4)$$

## **III Ergebnisse und Diskussion**

# 1 Herstellung und Charakterisierung von Antikörperfragmenten gegen B[a]P

## 1.1 Synthese von Hapten-Protein-Konjugaten

Die Durchführung von ELISA-Messungen mit Haptenen im hierbei oftmals verwendeten indirekten Format erfordert in aller Regel die Herstellung von Derivaten, die an der Oberfläche einer Mikrotiterplatte (MTP) immobilisiert werden können. Aufgrund der einfachen adsorptiven Bindung von Proteinen an hochbindenden MTP-Oberflächen werden meist Hapten-Protein-Konjugate hergestellt, wie sie auch zur Antikörperherstellung eingesetzt werden. Hierbei finden gut verfügbare Proteine wie Rinderserumalbumin (BSA) oder Ovalbumin (OVA) breite Anwendung. Eine einfache Methode zur Kopplung des Haptens stellt die Aktivierung von Hapten-Carboxylgruppen mit anschließender Ausbildung von Säureamiden mit freien Aminogruppen des Proteins dar. Da B[a]P selbst eine solche Carboxylgruppe sowie andere zur Aktivierung geeignete funktionelle Gruppe nicht aufweist, wurde zur Herstellung der Konjugate ein Buttersäurederivat eingesetzt. Durch den Buttersäurelinker (*spacer*) wird ein ausreichender Abstand des Haptens vom Protein gewährleistet, was die Bindung des Antikörpers erleichtert. Als B[a]P-Derivat hat sich dabei 4-(10-B[a]P)-Buttersäure bewährt (siehe Abb. 15).

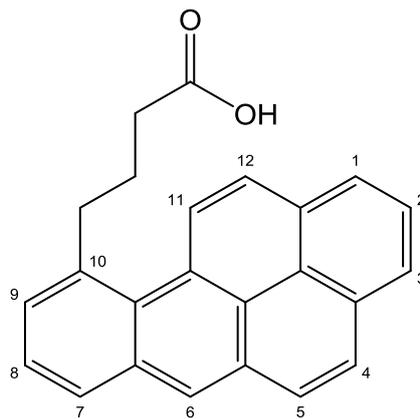
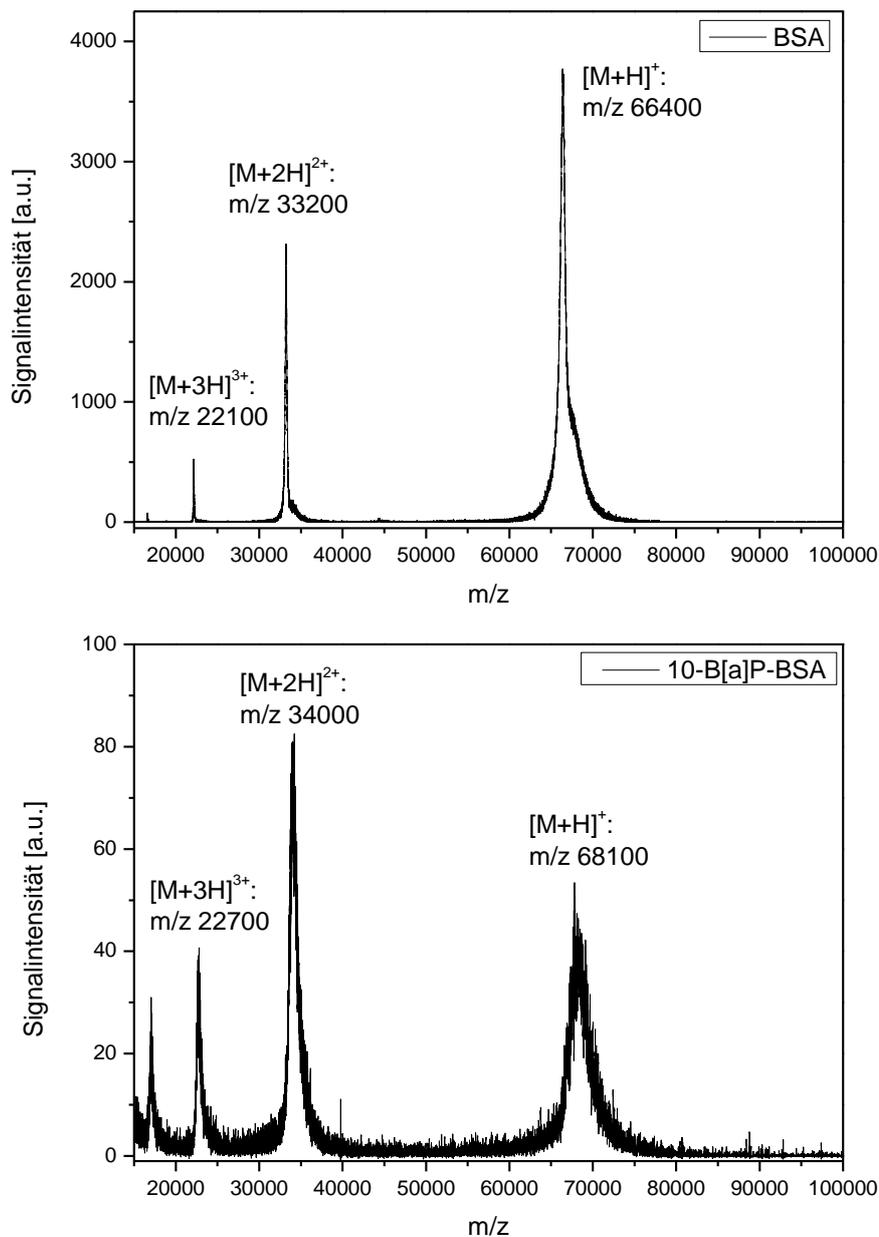


Abbildung 15: Strukturformel von 4-(10-B[a]P)-Buttersäure.

Zur Kopplung des B[a]P-Derivats an BSA wurde die Carbonsäure mittels *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) in Dioxan aktiviert. Die Dioxanlösung des NHS-Esters wurde dann zu einer Lösung von BSA in Carbonatpuffer

gegeben. Es wurde ein 1:1-Verhältnis von Dioxan zu Puffer gewählt, um einerseits eine ausreichende Löslichkeit des Haptens zu gewährleisten und andererseits eine Denaturierung des Proteins im organischen Lösemittel zu verhindern. Die Konjugate wurden schließlich mittels Dialyse gereinigt und zur Lagerung lyophilisiert. Die Bestimmung der Kopplungsdichte erfolgte mittels Matrix-unterstützter Laserdesorptions-Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS). Dabei wurde aus der Differenz der Massen von Konjugat und BSA die Anzahl an gekoppeltem Hapten berechnet. Die zugrundeliegenden Massenspektren sind in Abbildung 16 dargestellt.



**Abbildung 16:** MALDI-MS-Spektren von BSA (oben) und 10-B[a]P-BSA (unten).

Aus der Massendifferenz von etwa 1700 m/z ergibt sich eine mittlere Kopplungsdichte von 5 Molekülen B[a]P je BSA-Molekül. Auf dieselbe Weise wurden auch mit anderen PAK-Buttersäurederivaten Protein-Konjugate synthetisiert. Dabei wurden als PAK-Derivate 4-(1-Cry)-Buttersäure, 4-(1-B[a]A)-Buttersäure, 4-(1-Pyr)-Buttersäure sowie 4-(1-Fla)-Buttersäure verwendet. Die resultierenden mittleren Kopplungsdichten sind in Tabelle 3 angegeben.

**Tabelle 3:** Mittlere Kopplungsdichte der synthetisierten Hapten-Protein-Konjugate.

<b>Konjugat</b>	<b>Mittlere Kopplungsdichte</b>
B[a]P-BSA	5
Chrysenyl-BSA	8
Benzo[a]anthracenyl-BSA	9
Pyrenyl-BSA	12
Fluoranthenyl-BSA	12

Insgesamt waren die mittleren Kopplungsdichten bei allen hergestellten Konjugaten eher niedrig. Dabei wurden für B[a]P-BSA die niedrigsten Kopplungsdichten beobachtet, während bei den übrigen Konjugaten mit acht bis zwölf Haptenen je BSA höhere Werte ermittelt wurden. Dies ist wohl hauptsächlich in ihrer höheren Wasserlöslichkeit begründet (Lu, 2008). Für ELISA-Messungen erwiesen sich aber alle Konjugate als geeignet.

## 1.2 Herstellung von Fab-Fragmenten durch enzymatische Spaltung

### 1.2.1 Spaltung von IgG mit Papain

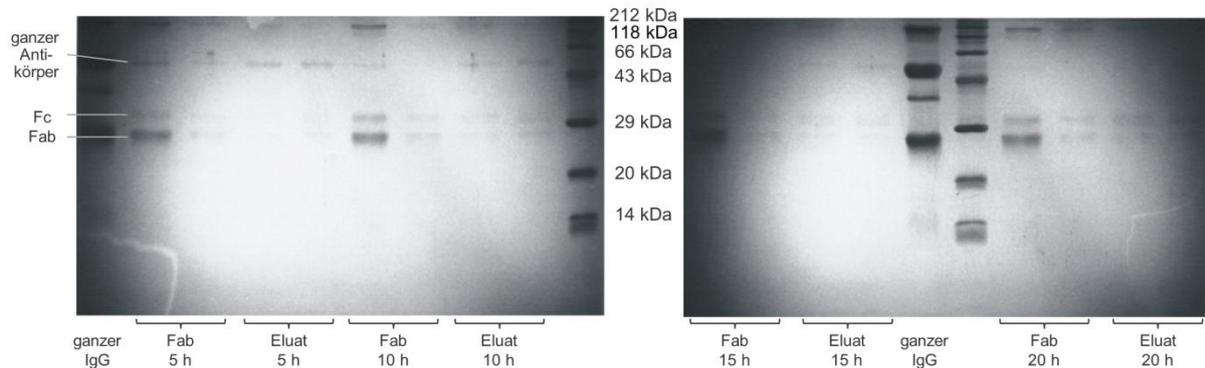
Die Effizienz von Papain bei der Spaltung von IgG schwankt stark in Abhängigkeit von der zugrundeliegenden Säugetierspezies. So zeigen beispielsweise Kaninchenantikörper generell niedrige Spaltungsraten, während Mäuse- oder Ratten-IgG deutlich besser umgesetzt werden (Utsumi, 1969). Innerhalb einer Spezies können darüberhinaus aufgrund variierender Glykosylierungsmuster sowie Länge und Zusammensetzung der *hing*-Region deutliche Unterschiede bei der Spaltung verschiedener IgG-Subklassen auftreten (Parham, 1983; Yamaguchi, 1995). Für Mäuseantikörper, wo diese Unterschiede eingehend untersucht wurden, lässt sich allgemein eine schlechte Spaltbarkeit für IgG<sub>1</sub> feststellen, während vor allem IgG<sub>2a</sub> und IgG<sub>3</sub> deutlich höhere Umsatzraten liefern. Zur Vermeidung einer sekundären

Spaltung der primären Reaktionsprodukte Fab- bzw. Fc-Fragment („Überverdau“) erfordern IgG<sub>2</sub> und IgG<sub>3</sub> in aller Regel kürzere Reaktionszeiten sowie oftmals eine geringere Menge an Enzym. Eine sorgfältige Optimierung dieser Parameter in Abhängigkeit vom zu spaltenden Antikörper ist daher unerlässlich zur Sicherstellung maximaler Fab-Ausbeuten.

Sollen die hergestellten Fab-Fragmente zur Herstellung von hochgeordneten Einkristallen für die Röntgenstrukturanalyse verwendet werden, ist ihre Aufreinigung ein zweiter kritischer Schritt, da für Proteinkristallisationen hohe Reinheiten entscheidend sind. Musste nach Beendigung der Enzymreaktion traditionell die Enzymaktivität durch Blockieren der aktiven Mercaptogruppen (Bildung von Thioethern z. B. mit Michael-Akzeptoren) gestoppt werden und die Fabs durch größenspezifische Aufreinigung aus einem komplexen Gemisch aus Enzym, Antikörper und verschiedenen Fragmenten abgetrennt werden (Aybay, 2003), so wird die Reinigung heute durch Verwendung von auf Agarosepartikeln immobilisiertem Enzym sowie spezifisch wechselwirkenden Proteinen deutlich erleichtert. Das Enzym kann so durch Zentrifugation oder Filtration einfach und schnell aus dem Produktgemisch entfernt werden, während die Ausnutzung der spezifischen Wechselwirkungen von immobilisiertem Protein A oder G mit dem Fc-Teil von IgG eine Abtrennung der Fc-Fragmente sowie der unverdauten Antikörper vom Fab erlaubt. Entscheidend hierbei ist meist die Affinität der verwendeten Proteine zum Fc-Teil, die von zugrunde liegender Spezies bzw. IgG-Subklasse abhängt und für die Vollständigkeit der Abtrennung entscheidend ist. So sind Maus-IgG<sub>1</sub> und -IgG<sub>3</sub> bekannt für eine oftmals schwache Bindung an Protein A und werden typischerweise stärker von Protein G gebunden, während die übrigen Subklassen an beide Proteine gut binden (Luttmann, 2008). Problematisch bei der Verwendung von Protein G können jedoch eventuell auftretende Bindestellen am Fab sein, die eine spezifische Trennung von Fab und Fc unmöglich machen (Enokizono, 1997). Bei Protein A wurde eine Bindung an den Fab-Teil bisher nicht beobachtet.

Um möglichst optimale Ergebnisse bezüglich der Ausbeute und Reinheit der Fab-Fragmente zu erzielen, sollte eine sorgfältige Optimierung der Reaktionsdauer des enzymatischen Verdaus sowie der Parameter für die Aufreinigung vorab in kleinerem Maßstab vorgenommen werden. Zunächst wurde die Reaktionszeit des Antikörpers mit Papain im Bereich von 5 bis 20 h variiert, die Produktgemische anschließend mit Protein A-Säulen aufgereinigt und die erhaltenen Fraktionen mittels reduzierender SDS-PAGE auf ihre Zusammensetzung analysiert. Es wurden je zwei Fraktionen für den Durchlauf (enthält Fab) sowie das durch

Behandlung der Säule mit Glycinpuffer (pH 2-3) erhaltene Eluat (enthält Fc und unverdaute IgG) gesammelt. Die Ergebnisse der Gelelektrophoresen sind in Abb. 17 dargestellt.

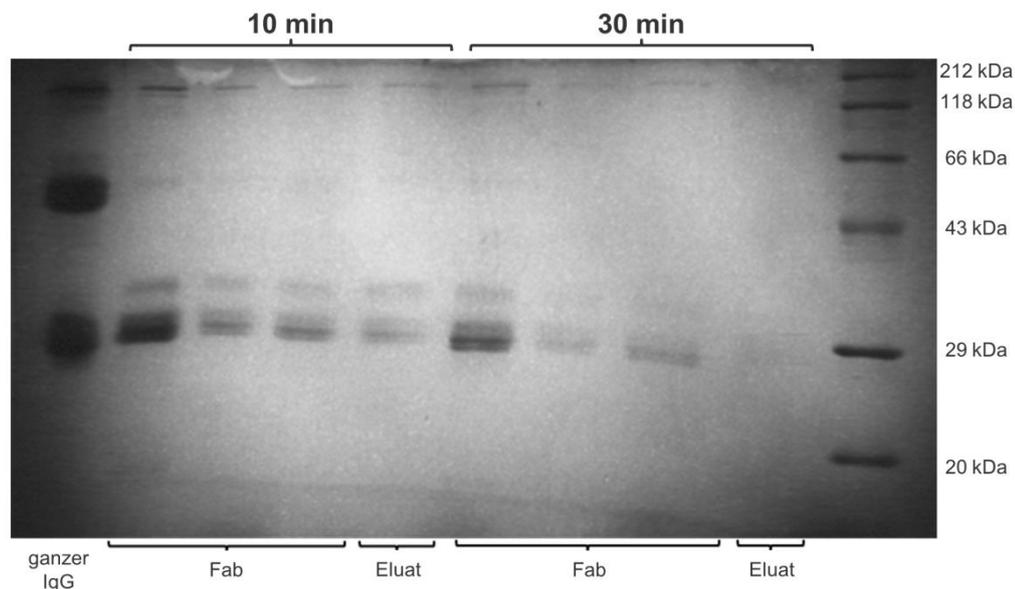


**Abbildung 17:** Gelelektrophoretische Analyse der Optimierung der Spaltungsdauer mittels reduzierender SDS-PAGE. Analysiert wurden für jeden Ansatz zwei Fraktionen für Produkt und Eluat.

In den vier durchgeführten Ansätzen unterschiedlicher Reaktionsdauer konnten die Banden für Fab, Fc und den ganzen Antikörper eindeutig zugeordnet werden. Dabei überlagern sich in den Fab-Banden leichte und schwere Kette des Fab, die sich in ihrer Molekülmasse nur geringfügig unterscheiden. Leichte Ketten aus Fab-Fragmenten oder ganzen IgG können hier allerdings nicht unterschieden werden. Eine erfolgte Spaltung der Antikörper kann eindeutig nur anhand der Fc-Bande erkannt werden, die in allen Ansätzen beobachtet werden konnte. Die Vollständigkeit der Umsetzung kann schließlich aus der Intensität der IgG-Bande abgeleitet werden, die mit zunehmender Reaktionsdauer deutlich abnimmt. Zwischen 15 und 20 h Reaktionszeit nimmt diese in den Produkt- wie Eluatfraktionen nur noch geringfügig ab und ist nach 20 h kaum noch erkennbar, so dass hier ein maximaler Umsatz erreicht scheint. Gleichzeitig konnten neben diesen drei Banden sowie wahrscheinlich während der Reduktion entstandenen höhermolekularen Verunreinigungen keine Nebenprodukte in der SDS-PAGE nachgewiesen werden, womit auch bei längeren Reaktionszeiten die Bildung niedermolekularer Abbauprodukte durch Überverdau ausgeschlossen werden konnte. Eine Reaktionsdauer von 20 h war damit geeignet, um maximale Fab-Ausbeuten zu erreichen.

Gleichzeitig konnte aber bei allen Ansätzen sowohl in den Produkt- als auch in den Eluatfraktionen immer Fab- und Fc-Fragmente sowie ganze IgG beobachtet werden, wenn auch in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen. So waren zwar in den Fab-Fraktionen die Intensitäten für Fc und IgG im Verhältnis zum Fab niedriger als in den Eluatfraktionen, eine vollständige Trennung des Fab von Fc und IgG konnte allerdings nach dem angewandten Protokoll nicht erreicht werden. Gemäß Hersteller war eine zehnminütige Inkubation des

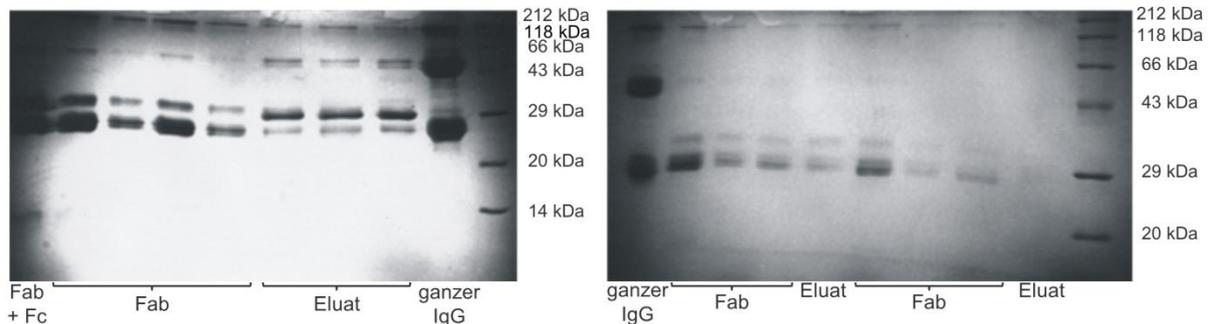
Produktgemischs mit immobilisiertem Protein A durchgeführt worden, anschließend war durch Zentrifugation der Säule die Produktfraktion aus Durchfluss sowie einer Waschfraktion gewonnen worden. Durch wiederholte Elution der auf der Säule gebundenen Nebenprodukte mit Glycinpuffer wurde die Säule schließlich regeneriert. Um einen Einfluss der Regeneration auf die Bindekapazität der Säule auszuschließen, wurde bei der Optimierung der Aufreinigung ausschließlich mit frischen Protein A-Säulen gearbeitet. Damit kamen zur Verbesserung der Aufreinigung nur eine längere Inkubationszeit des Produktgemischs mit Protein A oder eine mehrmalige Aufreinigung in Frage. Beide Möglichkeiten wurden durch Verlängerung der Inkubationszeit auf 30 min sowie eine Wiederholung der Aufreinigung mit der Produktfraktion einer ersten Reinigung getestet. Die erhaltenen Fraktionen wurden wiederum mittels reduzierender SDS-PAGE analysiert.



**Abbildung 18:** Verlängerung der Inkubationszeit mit Protein A, analysiert mit reduzierender SDS-PAGE. Es wurden je drei Produktfraktionen aufgetragen sowie die erste Eluatfraktion.

Durch eine Verlängerung der Inkubationszeit von 10 auf 30 min konnte nur eine unwesentliche Verbesserung der Fab-Reinheit erzielt werden (Abb. 18). Nach 30 min Inkubation konnten zwar praktisch keine IgGs mehr in den Produktfraktionen beobachtet werden, jedoch waren hier die Intensitäten in Produkt- wie Eluatfraktionen niedriger als nach einer Inkubation von 10 min, was eher für einen generellen Verlust von Protein durch unspezifische Bindungen spricht als für eine Verbesserung der Trennung der Fragmente. Auch konnten in allen Produktfraktionen Fc-Fragmente gefunden werden, wobei das Intensitätsverhältnis von Fc zu Fab zwischen 10 und 30 min Inkubation nicht signifikant

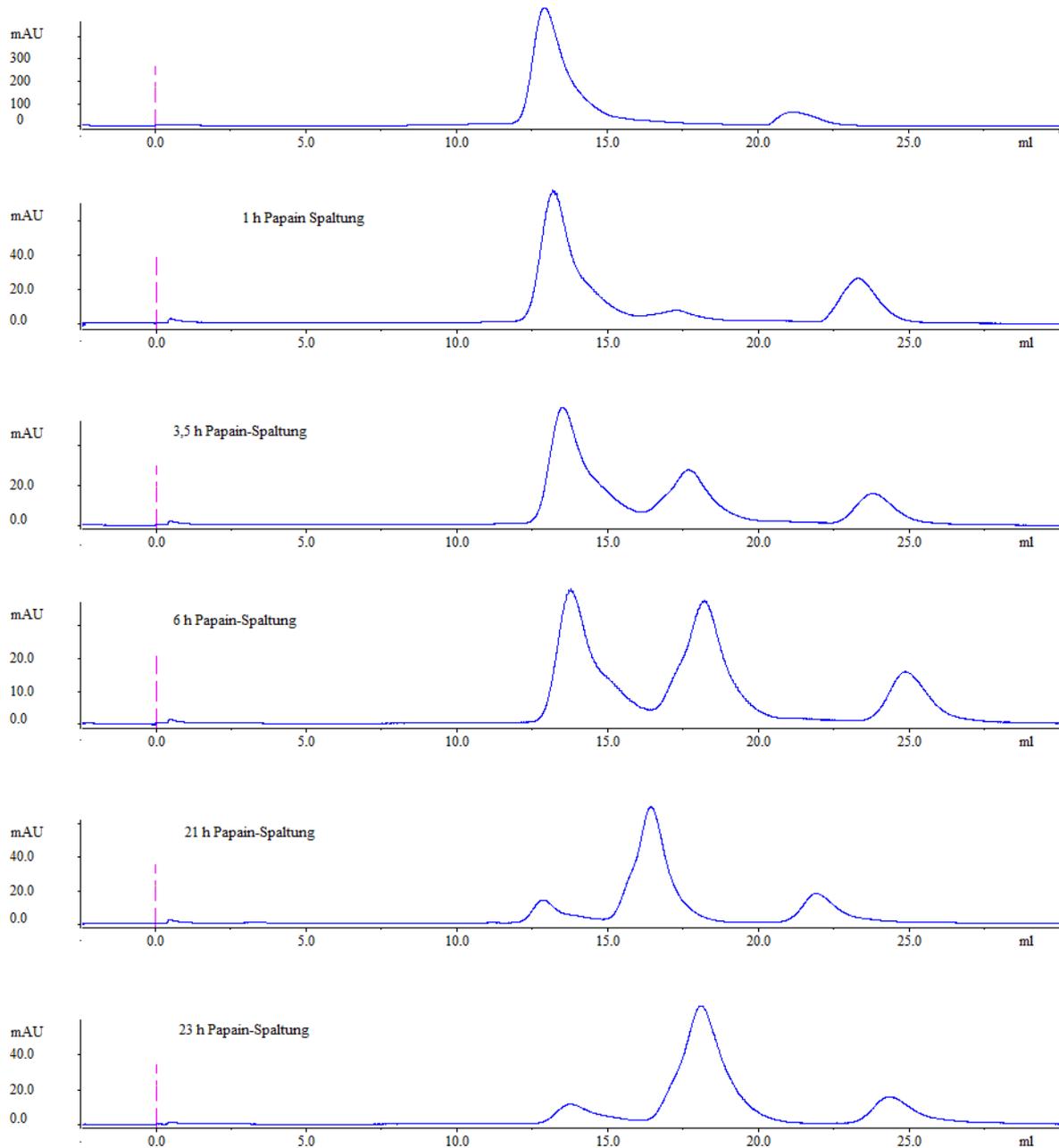
unterschiedlich war. Damit konnte eine Erhöhung der Spezifität der Trennung auf diese Weise nicht erreicht werden.



**Abbildung 19:** Vergleich von einmaliger (links) mit zweimaliger (rechts) Aufreinigung mit Protein A (reduzierend).

Durch eine Wiederholung des Reinigungsschritts konnten ebenfalls nur unbefriedigende Reinheiten erreicht werden (Abb. 19). Im Vergleich zur einmaligen Aufreinigung kann zwar eine deutliche Reduktion der Intensität der IgG- und Fc-Banden in der SDS-PAGE beobachtet werden, die zur Kristallisation der Fab-Fragmente nötige hohe Reinheit konnte auf diese Weise allerdings nicht erzielt werden. Aufgrund der deutlichen Abnahme der mittels UV/Vis-Absorption ermittelten Proteinkonzentration im Produktgemisch der Durchlaufaktionen nach der zweiten Aufreinigung (Abnahme um 38 %) sowie den schwachen Banden der Eluatfraktionen im Gel wurden auch hier unspezifische Bindungen der Fragmente an das Säulenmaterial als problematisch betrachtet. Eine Minimierung unspezifischer Bindung sollte daher durch die Verwendung eines automatisierten FPLC-Systems erreicht werden, das im Unterschied zu den bis dahin verwendeten Kartuschen nicht bis zur vollständigen Gleichgewichtseinstellung der gesamten Säule, sondern im konstanten Durchfluss arbeitet. Da ein solches System am Institut für Wasserchemie nicht zur Verfügung stand, wurde die affinitätschromatographische Aufreinigung in Kombination mit dem vorangehenden enzymatischen Verdau von der Squarix GmbH (Marl, Deutschland) durchgeführt. Hier wurden aus den entsprechenden Hybridomzellkulturen 18 mg des anti-B[a]P-mAk 22F12 hergestellt und nach Abtrennung Spezies-fremder IgG (Rinder-IgG aus dem Kulturmedium), die die spätere Kristallisation negativ beeinflussen würden, mittels immobilisierter anti-Maus Antikörper einer Papain-Spaltung unterzogen. Der Fortgang der Papain-Spaltung konnte mittels analytischer Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC)

direkt verfolgt werden. Die nach verschiedenen Spaltungsdauern gemessenen Chromatogramme sind in Abbildung 20 dargestellt.

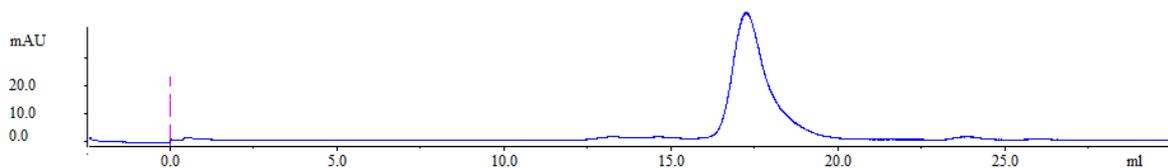


**Abbildung 20:** Analyse der Papain-Spaltung des anti-B[a]P-Antikörpers zu verschiedenen Zeiten der Reaktion. Gut zu erkennen ist die Abnahme des Signals des ganzen Antikörpers (links) und die Zunahme des Peaks für Fab und Fc (rechts).

In den Chromatogrammen können die beiden Signale für unverdauten Antikörper (ca. 14 min) sowie Fab (ca. 18 min) eindeutig zugeordnet werden. Eine Verbreiterung des Fab-peaks entsteht durch die Überlappung mit dem Signal des Fc-Fragments, dessen Molekulargewicht etwas über dem des Fab liegt. Deutlich zu erkennen ist die Zunahme der Signalintensität von

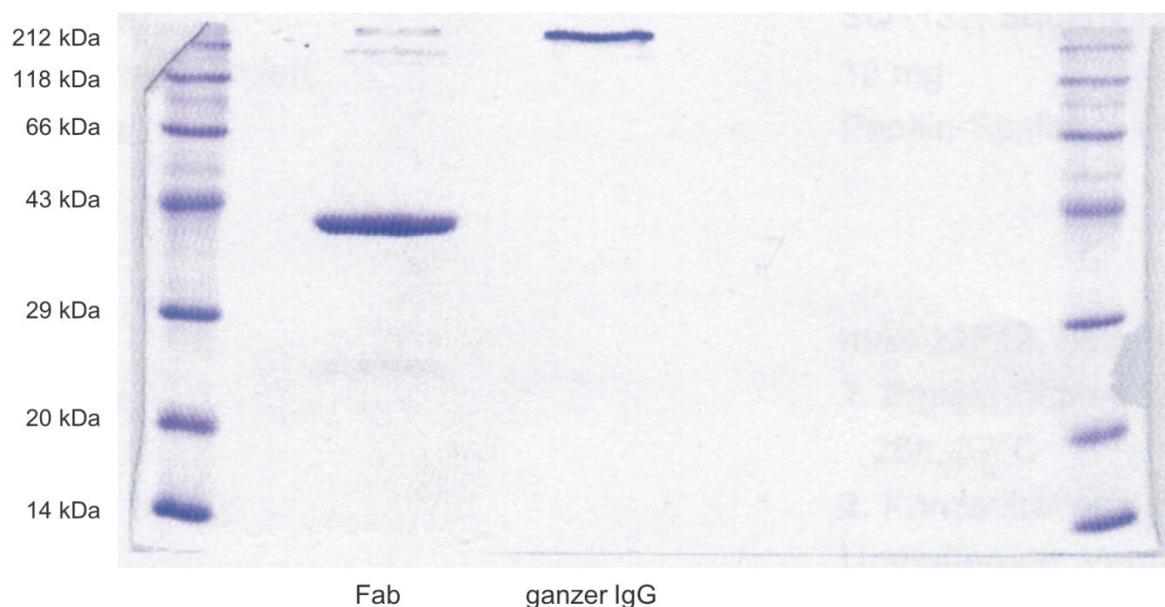
Fab und Fc mit zunehmender Inkubationszeit mit Papain, sowie die Abnahme des Signals für den kompletten Antikörper. Ab etwa 20 Stunden Inkubation ist eine weitere signifikante Reduktion des Antikörpersignals und eine damit einhergehende Erhöhung des Fab-/Fc-Signals nicht mehr zu beobachten, so dass hier ein maximaler Umsatz erreicht scheint. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Voroptimierung überein (Abb. 17), die eine abnehmende Reaktionsgeschwindigkeit ab etwa 15 h zeigten. Über die Identität des kleineren Signals bei höheren Retentionszeiten (20 bis 25 min), das eine mehr oder weniger konstante Höhe aufweist, konnte außer eines geringeren Molekulargewichts der zugrunde liegenden Substanz keine Aussage getroffen werden.

Nach einer Reaktionszeit von 26 h wurde die Enzymreaktion durch Abtrennung des immobilisierten Enzyms beendet. Die anschließende Aufreinigung des Produktgemischs mittels präparativer FPLC erfolgte zweimal, wonach die Reinheit des resultierenden Fab ebenfalls zunächst mit analytischer SEC überprüft wurde (Abb. 21).



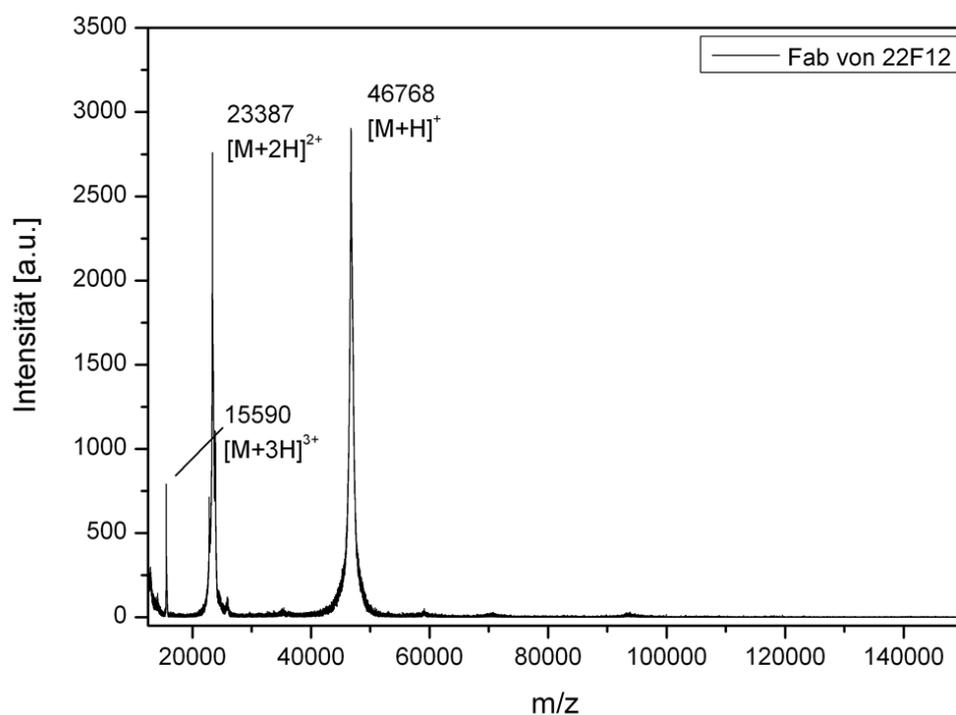
**Abbildung 21:** SEC-Chromatogramm nach zweimaliger Aufreinigung mit FPLC über Protein A-Säulen.

Das Chromatogramm zeigte lediglich den Peak des Fab-Fragments, Signale für ganze Antikörper oder eine Peak-Verbreiterung des Fab-Signals waren nicht zu erkennen. Eine weitergehende Reinheitsprüfung erfolgte mit nichtreduzierender SDS-PAGE (Abb. 22). Hier zeigten sich neben der intensiven Fab-Bande zwei sehr viel schwächere Banden von relativ hohen Molekulargewichten. Ein Vergleich mit dem Signal des unverdauten Antikörpers ließ jedoch keine eindeutige Zuordnung einer der beiden Banden als komplette IgG zu. Weiterhin konnten sehr schwache Banden zwischen 20 und 29 kDa erkannt werden, bei denen es sich wohl um Verunreinigungen mit reduziertem, also in schwere und leichte Kette gespaltenem Fab aus der Fab-Herstellung handelt. Die niedrigen Signalintensitäten der Verunreinigungen deuteten aber insgesamt auf eine hohe Reinheit des erhaltenen Produkts.



**Abbildung 22:** Reinheitskontrolle des Fab mittels nicht-reduzierender SDS-PAGE.

Die hohe Reinheit konnte schließlich mit MALDI-TOF massenspektrometrisch bestätigt werden (Abb. 23). Weder zeigten sich hier Signale des unverdauten Antikörpers, dessen Molekulargewicht bei etwa 146 kDa liegt (Karsunke, 2011b), noch des Fc-Fragments, dessen Masse bei etwa 50 bis 55 kDa liegen sollte. Alle drei Signale konnten eindeutig dem Fab-Fragment zugeordnet werden, das demnach eine Molekülmasse von etwa 46.8 kDa aufweist.



**Abbildung 23:** MALDI-MS-Spektrum des hergestellten Fab-Fragments.

Über die UV-Absorption bei 280 nm wurde unter Verwendung der für Antikörper näherungsweise geltenden Beziehung, nach der eine optische Dichte von 1.4 etwa einer Konzentration von 1 mg/mL entspricht, eine Fab-Konzentration von 17.038 mg/mL ermittelt. Bei einem Produktvolumen von 500 µL ergibt sich somit eine Ausbeute von 8.519 mg des Fab-Fragments.

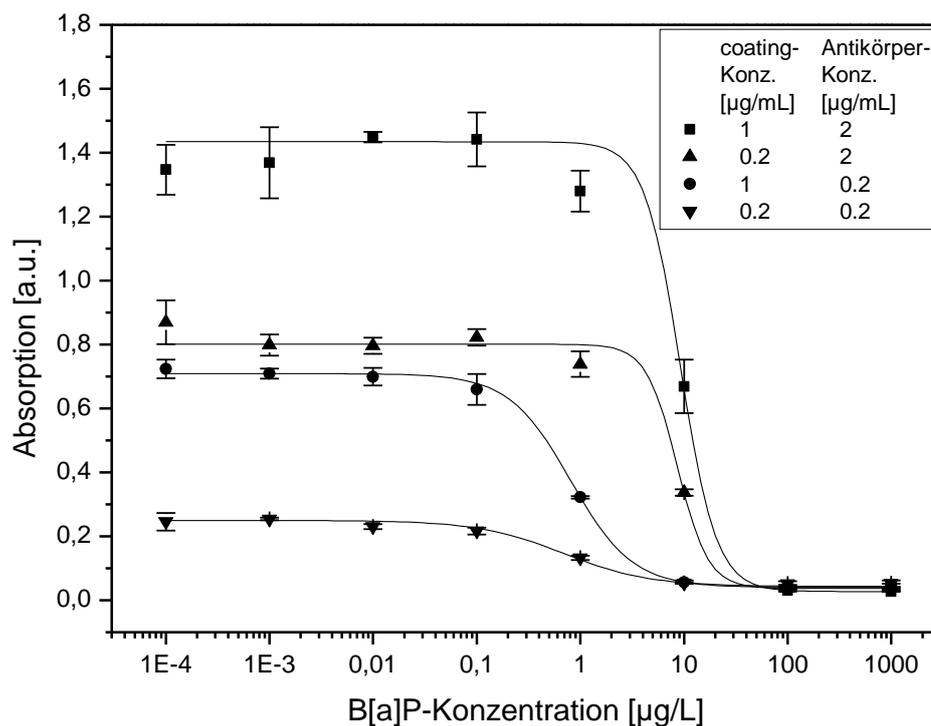
#### **1.2.2 Affinitätsbestimmung mittels ELISA**

Vor einem Einsatz des Fab in Kristallisationsversuchen wurde sein Bindungsverhalten für B[a]P charakterisiert, wobei zunächst mittels indirekt kompetitivem ELISA im konventionellen MTP-Format die Affinität des Fragments ermittelt werden sollte. Entscheidend hierbei war vor allem eine gute Übereinstimmung der B[a]P-Bindung mit der des kompletten Antikörpers, um durch spätere Strukturanalysen die Ursachen für dessen hohe Nachweisstärke ermitteln zu können. Eine eventuell durch die enzymatische Spaltung verursachte Verschlechterung der Bindeparameter musste daher im Vorfeld ausgeschlossen werden.

Die Affinität eines Antikörpers kann anhand des minimalen Testmittelpunkts ( $IC_{50}$ ) der sigmoidalen Kalibrierkurve abgeschätzt werden. Zur Bestimmung des minimalen  $IC_{50}$ -Werts werden die Konzentrationen des an der MTP-Oberfläche immobilisierten Analytderivats sowie die des Antikörpers gegeneinander variiert und sukzessive verringert, bis eine weitere Verringerung des Testmittelpunkts nicht mehr erreicht werden kann oder die maximale Signalintensität zu gering zur Erstellung reproduzierbarer Kurven wird (wegen zu geringer Differenz zwischen oberer und unterer Asymptote). Der ELISA wurde nach einem bewährten Standardprotokoll durchgeführt (Karsunke, 2001a; Matschulat, 2005), wobei als B[a]P-Derivat zur Immobilisierung 4-(10-B[a]P)-Buttersäure-BSA gewählt wurde. Dieses kann durch Adsorption an der Oberfläche hochbindender MTPs immobilisiert werden. Die Beschichtung mit dem Hapten-Protein-Konjugat erfolgte über Nacht bei 4 °C. Zum anschließenden Blocken der freien Bindestellen an der Oberfläche hat sich eine 1 %ige Caseinlösung bewährt. Nach dem Blocken erfolgte die eigentliche Konkurrenz durch Zugabe von B[a]P-Standards in einem Konzentrationsbereich von 0.0001 bis 1000 µg/L. Die Standards wurden in 10 % Methanol in Reinstwasser gelöst, um die Löslichkeit von B[a]P gegenüber reinem Wasser zu erhöhen. Zu den Standards wurde der anti-B[a]P-Antikörper bzw. dessen Fragment gegeben und 1 h inkubiert. Die kompletten Antikörper wie auch die Fab-Fragmente können über einen HRP-markierten anti-Maus-IgG Sekundärintikörper

detektiert werden, der sowohl an die konstanten Domänen der schweren Ketten ( $C_{H1}$  bis  $C_{H3}$ ) als auch die der leichten Ketten ( $C_L$ ) bindet und im letzten Schritt die Farbreaktion von TMB mit Wasserstoffperoxid auslöst. Die TMB-Farbreaktion wurde mit Schwefelsäure gestoppt, was einen Farbumschlag von blau zu gelb bewirkt. Die Absorption kann dann im sichtbaren Wellenlängenbereich bei 450 nm erfolgen.

Die Konzentrationen an Hapten-Protein-Konjugat wurden in einem Bereich von 0.2 bis 2  $\mu\text{g/mL}$  getestet, für den Fab wurden Konzentrationen von 0.1 bis 10  $\mu\text{g/mL}$  verwendet. Dabei konnten für alle getesteten Konzentrationen Kalibrierkurven erhalten werden, die eine Signalabnahme mit zunehmender B[a]P-Konzentration zeigten. Die Bindung des Fab an B[a]P konnte also hiermit bereits gezeigt werden. Darüber hinaus konnte die beschriebene Abnahme von maximaler Signalintensität und Testmittelpunkt bestätigt werden (Abb. 24). Gleichzeitig konnte festgestellt werden, dass eine Verringerung des  $\text{IC}_{50}$  vor allem durch eine Erhöhung der Antikörperverdünnung erreicht wird. Auf die maximale Signalthöhe schienen sich hingegen beide Parameter auszuwirken.



**Abbildung 24:** Verringerung von Testmittelpunkt und maximaler Absorption in Abhängigkeit der Konzentrationen von coating-Konjugat und anti-B[a]P-Antikörper ( $n = 8$ ,  $m = 3$ ).

Nach sorgfältiger Optimierung von Fab- und Konjugatkonzentration in den beschriebenen Konzentrationsbereichen konnte diese Erkenntnis bestätigt werden. Aus Tabelle 4 wird

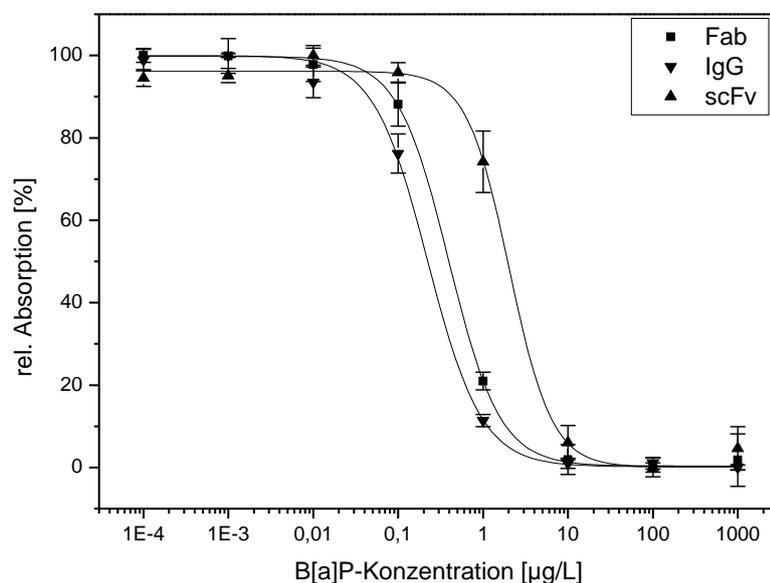
deutlich, dass sich durch Verringerung der Konjugatkonzentration die Testmittelpunkte lediglich bei hohen Antikörperkonzentrationen (10 µg/mL) deutlich ändern, mit abnehmender Fab-Konzentration (< 1 µg/mL) jedoch nur noch minimale Unterschiede aufweisen. Betrachtet man hingegen die Änderungen des IC<sub>50</sub>-Werts mit abnehmender Antikörperkonzentration, so zeigt sich, dass mit einer Halbierung der Fab-Konzentration in etwa eine Erniedrigung des Testmittelpunkts um einen Faktor zwei bis drei einhergeht, wobei diese Erniedrigung mit abnehmender Fab-Konzentration schwächer wird.

**Tabelle 4:** IC<sub>50</sub>-Wert in Abhängigkeit der Fab- und Konjugatkonzentration.

Fab-Konzentration [µg/mL]	Konjugat-Konzentration [µg/mL]	IC <sub>50</sub> [µg/L]
10	1	32.55 ± 1.97
10	0.2	19.76 ± 3.73
2	1	9.24 ± 1.29
2	0.2	8.61 ± 0.84
1	1	2.87 ± 0.88
1	0.2	2.31 ± 0.42
0.5	0.5	1.57 ± 0.15
0.5	0.2	1.54 ± 0.10
0.2	1	0.81 ± 0.01
0.2	0.5	0.83 ± 0.04
0.2	0.2	0.69 ± 0.16
0.125	2	0.72 ± 0.10
0.1	10	2.35 ± 0.54
0.1	4	1.09 ± 0.31
0.1	2	0.43 ± 0.07
0.1	1	0.39 ± 0.02

Um den Verlust an Maximalsignal bei niedrigen Fab-Konzentrationen auszugleichen und eine möglichst hohe Differenz zwischen unterer und oberer Asymptote innerhalb der Fitfunktion zu erhalten, musste mit relativ hohen Konjugatkonzentrationen gearbeitet werden. Da sich bei einer Fab-Konzentration von 0.1 µg/mL die Testmittelpunkte für die Konjugatkonzentrationen von 2 µg/mL und 1 µg/mL nicht mehr signifikant unterschieden, insgesamt aber innerhalb des getesteten Konzentrationsbereichs minimal waren, wurde aufgrund des höheren Maximalsignals eine Konjugatverdünnung von 2 µg/mL als optimal gewählt.

Neben dem korrespondierenden kompletten IgG-Antikörper stand aus einem vorherigen Projekt ein rekombinant hergestelltes scFv-Fragment mit identischer Aminosäurezusammensetzung der variablen Domänen zur Verfügung (Karsunke, 2012). Theoretisch sollten sowohl IgG, wie auch Fab und scFv aufgrund des identischen Aufbaus des Paratops gleiche Bindeeigenschaften für B[a]P und damit eine ähnliche Nachweisstärke im ELISA aufweisen. Dass dies praktisch nicht zwingend zutreffen muss, konnte anhand des scFv-Fragments, dessen minimale Testmittelpunkte um einen Faktor 50 über denen des kompletten Antikörpers lagen, bereits gezeigt werden (Karsunke, 2012). Um den hergestellten Fab nun bezüglich seiner B[a]P-Bindung zwischen komplettem IgG und rekombinantem Fragment einordnen zu können, wurden die Kalibrierkurven der drei Antikörper verglichen.



**Abbildung 25:** Vergleich der minimalen Testmittelpunkte für ganzen IgG, enzymatisch hergestelltes Fab-Fragment und rekombinantes scFv-Fragment mit identischer Antigenbindestelle (n = 8, m = 3).

Aus Abbildung 25 wird deutlich, dass die Kurve des Fab zwar zwischen denen des kompletten IgG und des scFv-Fragments liegt, jedoch wesentlich näher an der des IgG. Dies wird auch an den Werten der Kurvenparameter ersichtlich, die in Tabelle 5 wiedergegeben sind. So liegt der Testmittelpunkt des Fab mit etwa 400 ng/L um weniger als einen Faktor zwei über dem des IgG und scheint diesem in seinem Bindeverhalten damit wesentlich näher als der scFv. Für dessen  $IC_{50}$  konnten etwa 2000 ng/L ermittelt werden, was zwar gegenüber den bereits publizierten Ergebnissen eine Verringerung auf ein Fünftel bedeutet, aber immer noch dem Zehnfachen des kompletten Antikörpers entspricht. Die Verbesserung des Testmittelpunkts gegenüber früheren Messungen ist wohl auf eine Optimierung der

Herstellungs- und Aufreinigungsverfahren zurückzuführen, die bei der Produktion an der University of Guelph (Kanada) zum Einsatz kamen. Bezüglich der Arbeitsbereiche der Kurven zeigen sich ähnliche Zusammenhänge, während bei den Nachweisgrenzen (LOD) der Abstand zwischen IgG und Fab sogar noch deutlich geringer ist. Insgesamt zeigt sich damit im ELISA eine recht gute Übereinstimmung von komplettem Antikörper und dem daraus hergestellten Fab-Fragment hinsichtlich des Bindeverhaltens für B[a]P. Die leichte Verschlechterung der Nachweisstärke des Fab ist möglicherweise im deutlich kleineren Molekulargewicht der Fragmente zu suchen und der damit gegenüber ganzen Antikörpern leichteren Diffusion an freie Bindestellen an der MTP-Oberfläche. Von einer signifikanten Beeinflussung der Wechselwirkungen des Paratops mit B[a]P, wie sie im scFv durch die Einführung eines künstlichen Linkers plausibel erscheint, ist jedoch nicht auszugehen.

**Tabelle 5:** Zusammenfassung der analytisch relevanten Parameter der Kalibrierungen für kompletten anti-B[a]P-Antikörper sowie die korrespondierenden Fab- und scFv-Fragmente.

	<b>kompletter IgG</b>	<b>Fab</b>	<b>scFv</b>
<b>IC<sub>50</sub> [ng/L]</b>	223	390	2035
<b>Arbeitsbereich [ng/L]</b>	81 – 614	150 – 1032	915 – 4527
<b>LOD [ng/L]</b>	37	54	421

### 1.2.3 Bestimmung der Kreuzreaktivitäten

Neben der Nachweisstärke stellt auch die Selektivität von Antikörpern einen wichtigen Aspekt ihrer Bindungscharakteristik dar, der mit konventionellen ELISA-Tests leicht zugänglich ist. In Abhängigkeit der Beschaffenheit der Antigenbindestelle binden Antikörper neben dem Antigen auch chemische Strukturen, die ähnlich dem Epitop des Antigens aufgebaut sind. Im Fall der PAKs gibt es aufgrund der Vielzahl ihrer Vertreter eine ganze Reihe von Substanzen, die auf molekularer Ebene gemeinsame Strukturelemente mit B[a]P aufweisen. Um einen Überblick über die Selektivität des hergestellten Fab zu bekommen und sein Kreuzreaktivitätsprofil mit denen des kompletten IgG und des scFv vergleichen zu können, wurden die von der EPA als prioritäre Umweltschadstoffe ausgewählten 16 PAKs als Kreuzreaktanden getestet. Da hierin PAKs mit ganz unterschiedlicher chemischer Struktur beinhaltet sind, stellen diese einen guten Querschnitt zur Abschätzung der

Antikörperselektivität dar. In Tabelle 6 sind die berechneten Kreuzreaktivitäten dargestellt und denen von komplettem Antikörper und scFv gegenübergestellt.

**Tabelle 6:** Kreuzreaktivitäten für die 16 EPA PAKs. Die Kreuzreaktivität für B[a]P wurde auf 100 % festgelegt und die Kreuzreaktivitäten für die anderen PAKs wurden relativ zu der für B[a]P in % ausgedrückt.

<b>Substanz</b>	<b>Fab</b>	<b>kompletter IgG<sup>1</sup></b>	<b>scFv</b>
Benzo[a]pyren	100	100	100
Naphthalin	<0.05	0	<0.05
Acenaphthylen	<0.05	0	0.14
Acenaphthen	<0.05	0	0.55
Fluoren	0.19	0	1,3
Phenanthren	1.1	1	12
Anthracen	1.4	1	14
Fluoranthren	10	15	48
Pyren	20	18	66
Benzo[a]anthracen	16	13	88
Chrysen	77	77	78
Benzo[b]fluoranthren	18	24	69
Benzo[k]fluoranthren	4.6	5	27
Dibenzo[ah]anthracen	0.23	0	<0.05
Benzo[ghi]perylen	2.4	1	4,3
Indeno[1,2,3-cd]pyren	18	45	77

<sup>1</sup>Matschulat, 2005

Die Durchführung des indirekt kompetitiven ELISA erfolgte analog zu Kapitel 1.2.2, wobei anstatt der B[a]P-Standardlösung während der Competition eine Lösung des kreuzreagierenden PAK mit gleicher molarer Konzentration wie B[a]P zugegeben wurde. Die Kreuzreaktivität wurde aus den Testmittelpunkten berechnet, wobei sie für B[a]P auf 100 %

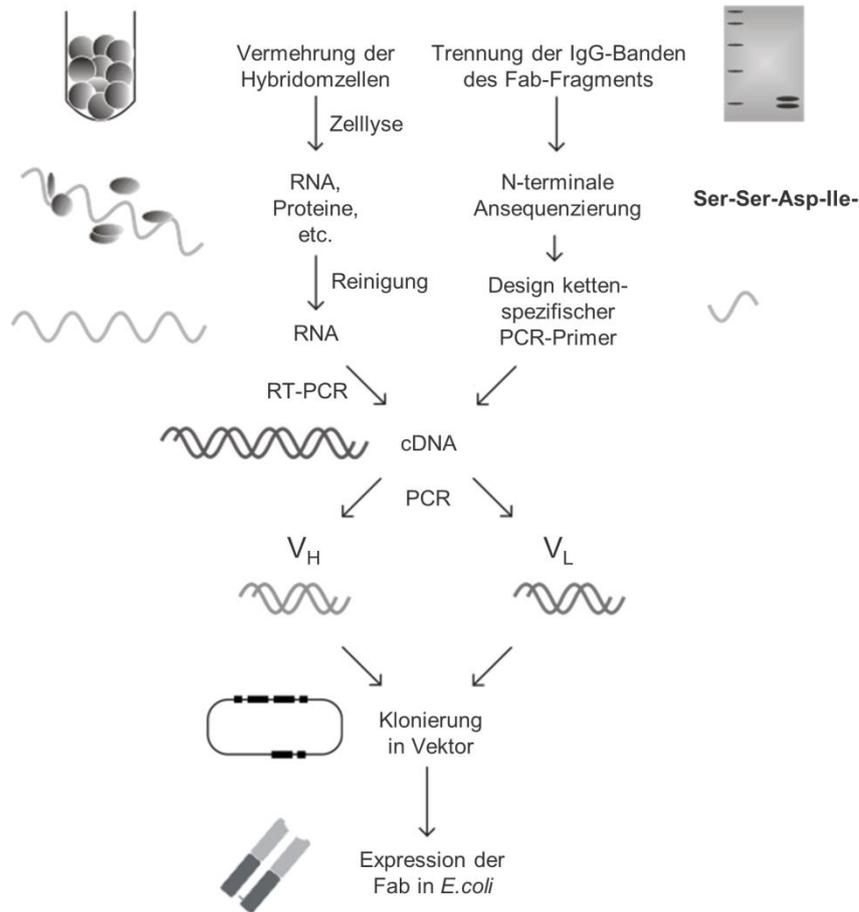
festgelegt wurde und die der übrigen PAKs relativ dazu angegeben ist. Das Fab-Fragment zeigt, wie auch der komplette Antikörper, für die PAKs mit zwei und drei Ringen (Naphthalin, Acenaphthylen, Acenaphthen, Fluoren, Phenanthren, Anthracen) mit Werten von maximal 1 % praktisch keine Kreuzreaktivität. Mit 77 % wurde für Chrysen die höchste Kreuzreaktivität gemessen, während die restlichen Werte mit maximal 20 % auf geringere Kreuzreaktivitäten schließen ließen. Insgesamt sind alle für den Fab ermittelten Kreuzreaktivitäten in guter Übereinstimmung mit denen des kompletten Antikörpers. Die größten Abweichungen wurden bei Fluoranthen, Benzo[b]fluoranthen und Indeno[1,2,3-cd]pyren festgestellt, wo die Kreuzreaktivität des Fab niedriger war als die des kompletten IgG, sowie für Benzo[ghi]perylen, wo der Wert des Fab über dem des ganzen Antikörpers lag. Deutlich höhere Abweichungen zeigten hingegen die ermittelten Werte für das scFv-Fragment, das insgesamt deutlich höhere Kreuzreaktivitäten für die gemessenen PAKs zeigte. Lediglich vier der kleineren PAKs wiesen Werte von 1 % und darunter auf. Bei allen 4-Ring-PAKs wurden Kreuzreaktivitäten über 45 % gemessen und auch bei zwei der schwereren PAKs (Benzo[b]fluoranthen, Indeno[1,2,3-cd]pyren) wurden mit 69 bzw. 77 % hohe Kreuzreaktivitäten festgestellt. Insgesamt zeigte der scFv damit zwar ähnliche Tendenzen wie der komplette Antikörper, die Selektivität war jedoch für alle gemessenen PAK deutlich schlechter. Damit sind auch die Selektivitätsmessungen ein deutliches Indiz für eine starke Ähnlichkeit zwischen dem Fab-Fragment und dem kompletten Antikörper bezüglich der Wechselwirkungen mit B[a]P.

## 1.3 Rekombinante Herstellung von Fab-Fragmenten

### 1.3.1 Herstellung und Reinheitskontrolle

Neben den klassisch durch enzymatische Spaltung hergestellten Fab-Fragmenten sollten für die Gewinnung struktureller Informationen über den B[a]P-Antikörper-Komplex auch rekombinant hergestellte Fabs eingesetzt werden. Die Vorteile rekombinanter Fab-Fragmente liegen vor allem in der strukturellen Einheitlichkeit der erhaltenen Fragmente, die die Bildung hochgeordneter Einkristalle, wie sie für die Proteinkristallographie benötigt werden, begünstigt (Zhao, 2009). Die zur enzymatischen Spaltung von Antikörpern genutzten Proteasen hingegen weisen in aller Regel je Antikörper mehrere Schnittstellen im Bereich der *hinge*-Region auf, was meist zur Bildung heterogener Fragmente führt (Yamaguchi, 1995; Adamczyk, 2000). Darüber hinaus kann eine ungünstige Lage der Enzym-Schnittstelle zum Verbleib eines großen Teils der flexiblen *hinge*-Region beim Fab führen (Skerra, 1990), was sich aufgrund ihrer Flexibilität ebenfalls ungünstig auf die Kristallbildung auswirken kann. Bei der rekombinanten Fab-Herstellung dagegen kann für die konstanten Domänen die Aminosäuresequenz für eine optimale Kristallbildung genau eingestellt werden. Tatsächlich werden hierbei oftmals die variablen Domänen des gewünschten Antikörpers mit C<sub>H1</sub>- bzw. C<sub>L</sub>-Domänen kombiniert, die sich in Kristallisationsexperimenten bereits bewährt haben (Schiweck, 1995). Da bei gentechnischer Herstellung die Aminosäuresequenz der Fragmente bekannt ist, wird schließlich auch der Austausch einzelner Aminosäuren, die zur Destabilisierung der räumlichen Struktur oder Bildung von Proteinaggregaten führen können, möglich.

Die im Folgenden beschriebene bakterielle Produktion, Reinigung und Kristallisation der rekombinanten Fab-Fragmente erfolgte am Lehrstuhl für Biologische Chemie der TU München. Die dazu nötigen Arbeiten wurden dort von Prof. Dr. Arne Skerra, Irmgard Neumaier und Dr. Andreas Eichinger durchgeführt. Ein Überblick über die Strategie zur Herstellung funktioneller rekombinanter Fabs in *Escherichia coli* ausgehend von einer Hybridomzelllinie ist in Abb. 26 gegeben. Diese folgte im Wesentlichen den am Lehrstuhl etablierten Verfahren (Loers, 2014).



**Abbildung 26:** Überblick über die allgemeine Strategie zur rekombinanten Herstellung von Fab-Fragmenten basierend auf Hybridomzellen.

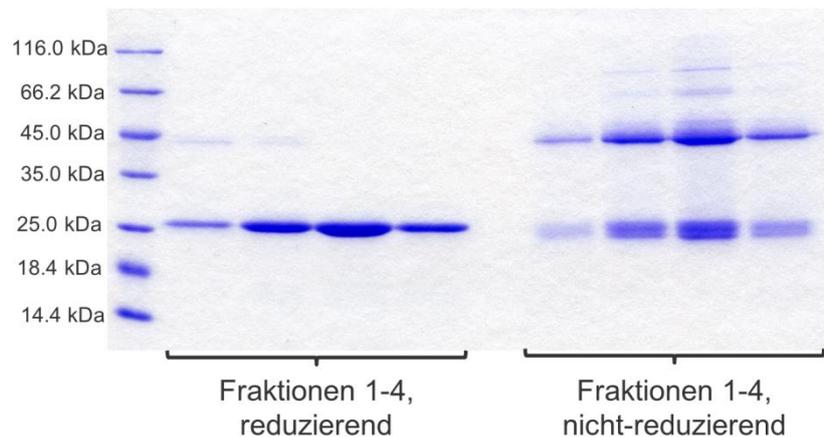
Aus einem Hybridomzellklon, der den monoklonalen anti-B[a]P-Antikörper 22F12 produziert, wurde nach Zellyse die Gesamzell-RNA gewonnen, aus der wiederum durch RT-PCR die entsprechende cDNA synthetisiert wurde. Mit Hilfe spezifischer Primer für die V-Genregionen von leichter und schwerer Kette wurden daraus mittels PCR die DNA-Sequenzen der V<sub>L</sub>- und V<sub>H</sub>-Domänen spezifisch amplifiziert. Diese ketten-spezifischen Primer wurden auf der Grundlage der N-terminalen Peptid-Sequenzen entworfen, die aus dem mAk nach gelelektrophoretischer Trennung von leichter und schwerer Kette und N-terminalem Ansequenzieren (Gasphasensequenzierung nach Edman) erhalten wurden. Nach Isolierung der PCR-Produkte ergaben sich neben einer DNA-Sequenz für die leichte Kette drei mögliche Sequenzen für die schwere Kette, von denen eine als funktionelle V-Genregion der schweren Kette identifiziert werden konnte. Die Genabschnitte für V<sub>L</sub> und V<sub>H</sub> (Abb. 27) wurden anschließend auf dem Fab-Sekretionsvektor pASK85 (Skerra, 1994a) subkloniert, was schließlich die bakterielle Expression der Fab-Fragmente in *E. coli* im Schüttelkolbenmaßstab ermöglichte.

VH:	
	PstI/NsiI
1	GAAGTTAAACTGCAtCAGTCTGgAGCTGAGCTGGTGAACCCTGGGGCCTCAGTGAAGATA 60 GluValLysLeuHisGlnSerGlyAlaGluLeuValAsnProGlyAlaSerValLysIle
61	TCCTGCAAGGCTCCTGGCTACACATTCAATAACTACTGGATAGAGTGGGTAAAGCAGAGG 120 SerCysLysAlaProGlyTyrThrPheAsnAsnTyrTrpIleGluTrpValLysGlnArg ==== CDR-H1 =====
121	CCAGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAAGTGGTCGTATTAAGTGC 180 ProGlyHisGlyLeuGluTrpIleGlyGluIleLeuProGlySerGlyArgIleAsnCys ===== CDR-H2 ===
	PstI
181	AATGAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTCAGTGCAGATACATCCTCCAACACCGCCTAC 240 AsnGluLysPheLysAspLysAlaThrPheThrAlaAspThrSerSerAsnThrAlaTyr =====
241	ATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGACGACTCTGCCGTCTACTACTGTGCAAAAAAGTAT 300 MetGlnLeuSerSerLeuThrSerAspAspSerAlaValTyrTyrCysAlaLysLysTyr =====
	BstEII
301	GGTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACgGTCACCGTCTCCTCA 342 GlyAspTyrTrpGlyGlnGlyThrThrValThrValSerSer CDR-H3 =
VL:	
	SstI
1	GACATCGAGCTcACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCACT 60 AspIleGluLeuThrGlnSerProSerSerMetTyrAlaSerLeuGlyGluArgValThr
61	ATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAAACTGGTTCAGCAGAAAACCA 120 IleThrCysLysAlaSerGlnAspIleAsnSerTyrLeuAsnTrpPheGlnGlnLysPro ===== CDR-L1 =====
121	GGGAAATCTCCTAAGACCCTGATCTATCATACAAACAGACTGGTAGATGGGGTCCCATCA 180 GlyLysSerProLysThrLeuIleTyrHisThrAsnArgLeuValAspGlyValProSer ===== CDR-L2 =====
181	AGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATTCTCTCATCATCAGCAGCCTGGAGTTT 240 ArgPheSerGlySerGlySerGlyGlnAspTyrSerLeuIleIleSerSerLeuGluPhe
241	GAAGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTATGATGAGTTTCCGTACACGTTCCGAGGG 300 GluAspMetGlyIleTyrTyrCysLeuGlnTyrAspGluPheProTyrThrPheGlyGly ===== CDR-L3 =====
	XhoI
301	GGGACCAAGCTCGAGCTGAAG 321 GlyThrLysLeuGluLeuLys

**Abbildung 27:** DNA-Sequenzen der  $V_H$ - und  $V_L$ -Genabschnitte des anti-B[a]P-Antikörpers 22F12. Schnittstellen für wichtige Restriktionsenzyme sind darüber angegeben. Die zugehörigen Aminosäuresequenzen sind unterhalb der Basen angeordnet. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. A. Skerra.

Nach Extraktion der periplasmatischen Zellfraktion wurde das rekombinante Fab-Fragment mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie (*immobilized metal-ion-affinity*)

*chromatography*, IMAC) isoliert (Skerra, 1994) und abschließend durch SEC gereinigt. Anhand des auf der Grundlage der Aminosäuresequenz berechneten molaren Extinktionskoeffizienten (Gill, 1989) von  $79700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  wurde aus der Absorption bei 280 nm eine Ausbeute von 250  $\mu\text{g}$  Fab aus 4 L Kultur ermittelt. Die Reinheit des Fab-Fragments wurde mittels ESI-qTOF-MS kontrolliert, wo neben der Masse des Fab von 47916.01 g/mol keine weiteren Signale erkennbar waren. Zudem wurde das Fragment mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 28). Hier zeigten sich in allen vier Produktfraktionen unter reduzierenden Bedingungen lediglich die überlappenden Banden von leichter und schwerer Kette (leicht oberhalb von 25 kDa) sowie vor allem in den ersten beiden Fraktionen eine schwache Kontamination von Wirtspotein, das wegen ähnlicher Größe vom intakten Fab nicht trennbar war. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurde hauptsächlich die Bande des durch eine Disulfidbindung verbrückten kompletten Fab nachgewiesen, sowie etwas schwächer die Banden von separater leichter und schwerer Kette und höhermolekulare Banden. Da letztere unter reduzierenden Bedingungen nicht auftraten, waren diese auf unphysiologische Disulfidverknüpfungen zurückzuführen. Als Ursache hierfür kam der atypische ungepaarte Cys-Rest an Position 60 im CDR-H2 der  $V_{\text{H}}$ -Domäne in Frage. Die damit verbundene Heterogenität der Proteinpräparation machte diese für Kristallisationsversuche ungeeignet.



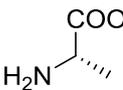
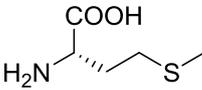
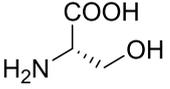
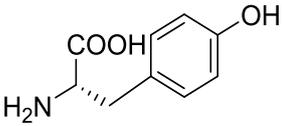
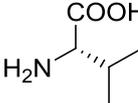
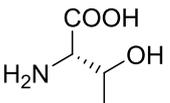
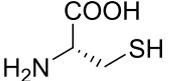
**Abbildung 28:** Gelelektrophoretische Reinheitskontrolle des rekombinanten WildtypFab-Fragments mittels reduzierender (links) und nicht-reduzierender (rechts) SDS-PAGE. Dargestellt sind jeweils die ersten vier Fraktionen aus der SEC. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. A. Skerra.

Um die Faltungseffizienz und Stabilität des Fab zu erhöhen, wurde der Austausch des Cysteins gegen andere Aminosäuren in Betracht gezogen. Aufgrund der Lage innerhalb einer

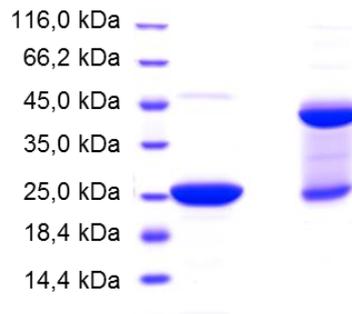
CDR ergab sich jedoch die Schwierigkeit, dass im Fall einer direkten Beteiligung dieser oder benachbarter Aminosäuren an der Haptenbindung ein Affinitätsverlust möglich war. Deshalb wurden mehrere Mutanten mit unterschiedlichen Aminosäuren an Position 60 hergestellt: Alanin, Methionin, Serin, Tyrosin, Valin bzw. Threonin. Die Wahl der an Stelle des Cysteins eingeführten Aminosäuren wurde aufgrund ähnlicher chemischer Eigenschaften oder ihrer Häufigkeit an dieser Position in anderen bekannten V<sub>H</sub>-Sequenzen getroffen.

Die sechs gewünschten Mutanten konnten in ausreichender Menge im Schüttelkolbenmaßstab gewonnen und wie zuvor mittels IMAC und SEC gereinigt werden (Tab. 7). Alle hergestellten Fabs wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 31), wobei sich generell bessere Homogenität im Vergleich zum Wildtyp-Fab zeigte.

**Tabelle 7:** Produzierte Fab-Mutanten mit ausgetauschtem Cystein. Die Ausbeuten beziehen sich jeweils auf 4 L Kulturvolumen.

Mutante	Aminosäure	M [g/mol]	Ausbeute [µg]	
C60A	Alanin		47883.94	340
C60M	Methionin		47944.06	380
C60S	Serin		47899.94	390
C60Y	Tyrosin		47976.04	630
C60V	Valin		47912.00	500
C60T	Threonin		47913.97	720
Wildtyp	Cystein		47916.01	250

Exemplarisch zeigt Abb. 29 die Reinheitsanalyse der Fab-Mutanten mittels SDS-PAGE für die Mutante C60Y. Neben den Banden des reduzierten bzw. intakten Fab waren keine signifikanten Verunreinigungen erkennbar. In Bindungsanalysen mittels ELISA sowie SPR wurden anschließend etwaige Einflüsse der Mutation auf die Antigenbindung untersucht (Kapitel III, 1.3.2 und 1.3.3). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde die Mutante C60Y für Kristallisationsexperimente ausgewählt.



**Abbildung 29:** Reinheitsanalytik der Fab-Mutante C60Y mittels reduzierender (links) und nichtreduzierender (rechts) SDS-PAGE. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Prof. A. Skerra.

#### 1.3.2 Bestimmung der Affinität mittels ELISA

Neben dem Vergleich des B[a]P-Bindevhaltens mit dem des kompletten Antikörpers sollten mittels indirekt kompetitivem ELISA auch die rekombinanten Fab-Fragmente untereinander verglichen werden, um so Einflüsse der eingeführten Mutation auf die Antigenbindung feststellen zu können. Die Durchführung der ELISA-Messungen erfolgte dabei analog zu den Messungen mit dem enzymatischen Fab-Fragment, wobei hier jedoch aufgrund der veränderten konstanten Domänen, die in der Regel die hauptsächliche Binderegion des Sekundärantikörpers darstellen, zunächst ein geeigneter Sekundärantikörper ausgewählt sowie dessen Konzentration optimal eingestellt werden musste. Zur Auswahl standen hierfür der beim ELISA mit kompletten Antikörpern bereits eingesetzte polyklonale anti-Maus-Antikörper (Karsunke, 2011a), ein polyklonaler anti-(Maus-Fab)-Antikörper (Loers, 2014) und aufgrund des rekombinant eingeführten His-tag ein monoklonaler anti-(hexa-His)-Antikörper (Karsunke, 2012), die jeweils mit HRP konjugiert waren. Da mit dem anti-(Maus-Fab)-Antikörper bisher keine B[a]P-Messungen durchgeführt worden waren, wurde hierfür zunächst seine Konzentration mit Hilfe des nichtmutierten rekombinanten Fab optimiert. Entscheidend dabei war einerseits ein möglichst niedriger  $IC_{50}$ , andererseits aber auch eine

ausreichend hohe maximale Signalintensität. Ausgehend von 0.2 µg/mL wurde die Sekundärantikörperkonzentration schrittweise verringert, während alle übrigen Parameter konstant gehalten wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

**Tabelle 8:** Optimierung der Konzentration des anti-(Maus-Fab)-Sekundärantikörpers für möglichst niedrige Testmittelpunkte bei gleichzeitig hoher oberer Asymptote.

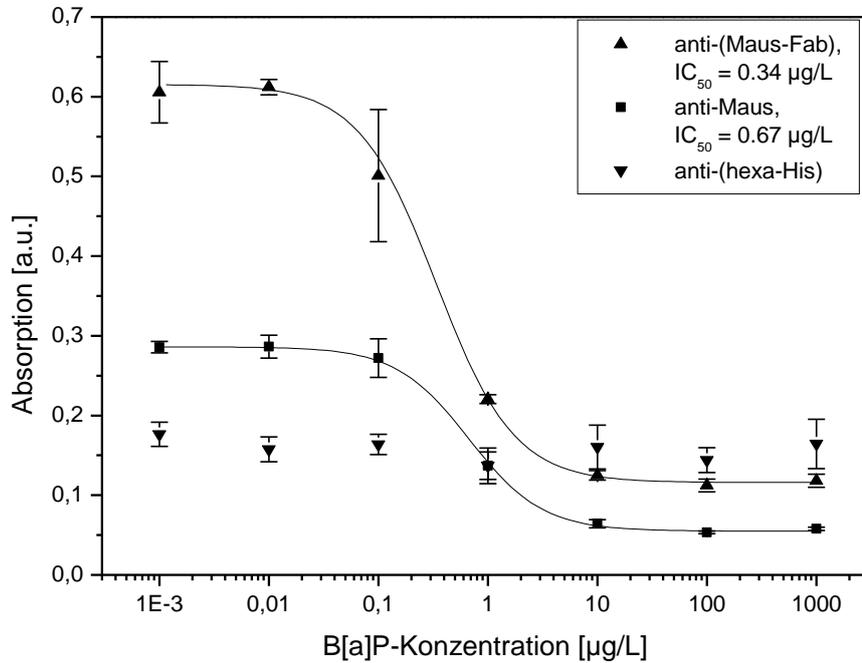
<b>Konzentration [µg/mL]</b>	<b>IC<sub>50</sub> [µg/L]</b>	<b>obere Asymptote [a.u.]</b>
0.2	0.62 ± 0.07	0.64
0.1	0.61 ± 0.26	0.43
0.05	0.84 ± 0.21	0.28

Nachdem bereits bei einer Konzentration von 0.05 µg/mL die Signalintensität gerade noch ausreichend zur Erstellung einer Kalibrierkurve war, wurden niedrigere Konzentrationen nicht mehr getestet. Wie erwartet wurde mit abnehmender Sekundärantikörperkonzentration eine Abnahme der maximalen Signalintensität und damit der oberen Asymptote der Kalibrierkurve beobachtet. Damit einher ging jedoch keine Verringerung des Testmittelpunkts, es wurde lediglich eine Zunahme seiner Unsicherheit festgestellt, die wohl aus dem kleiner werdenden Abstand zwischen oberer und unterer Asymptote resultierte. Für die folgenden Experimente wurde daher eine Sekundärantikörperkonzentration von 0.2 µg/mL gewählt.

Anschließend sollten die drei Sekundärantikörper auf ihre Nachweisstärke hin verglichen werden. Dazu wurden für jeden Sekundärantikörper in seiner optimalen Konzentration (anti-Maus und anti-(Maus-Fab): 0.2 µg/mL, anti-(hexa-His): 0.1 µg/mL) die Konzentrationen des B[a]P-BSA-Konjugats sowie des Wildtyp-Fab bis zum Erreichen des minimalen Testmittelpunkts schrittweise verringert. Die dabei erhaltenen Kalibrierkurven sind in Abbildung 30 gezeigt.

Bei der Betrachtung der Kurven ergab sich zunächst, dass für den anti-(hexa-His)-Antikörper keine Bindung an den Fab beobachtet werden konnte. Weshalb der Sekundärantikörper den His-tag des Fab-Fragments nicht erkannte, konnte nicht geklärt werden. Ein Vergleich der beiden polyklonalen Sekundärantikörper zeigte, dass für den anti-(Maus-Fab)-Antikörper ein niedrigerer Testmittelpunkt bei höherem Maximalsignal erreicht werden kann. Eine höhere Affinität des anti-Fab-Antikörpers scheint insofern logisch, da dieser spezifisch an die konstanten Domänen der Fab-Teile von Maus-Antikörpern bindet. Im anti-Maus-Sekundärantikörper ist hingegen nur ein Teil der polyklonalen Antikörper gegen das Fab-

Fragment gerichtet, während die Epitope der übrigen Antikörper auf dem Fc-Teil liegen. Dass aufgrund der geringeren Anzahl der anti-Fab-Antikörper im anti-Maus-Serum weniger mit hoher Affinität vorliegen, erscheint zwar nicht zwangsläufig, aber plausibel.



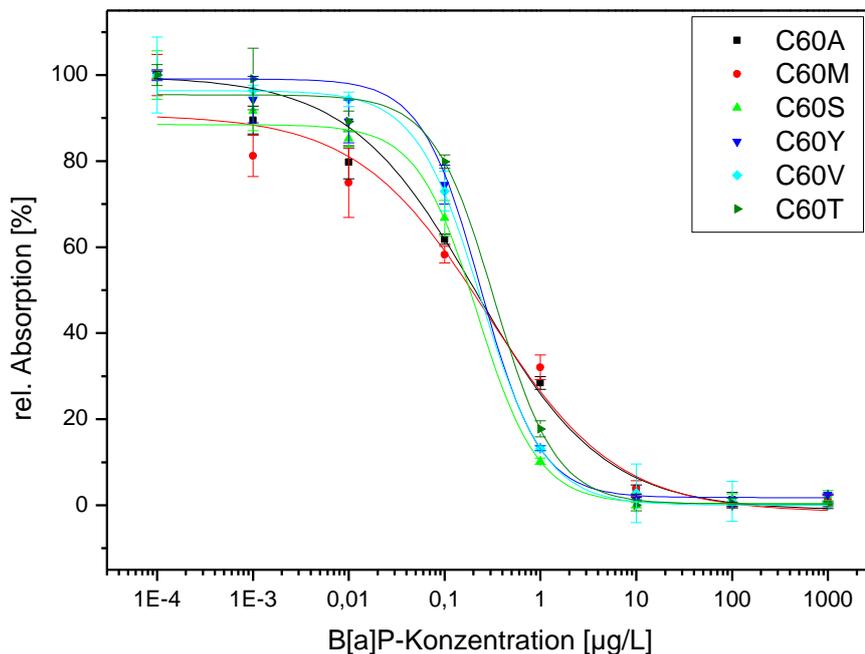
**Abbildung 30:** Vergleich der Kalibrierkurven für drei verschiedene Sekundärantikörper (n = 7, m = 3).

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden mit dem anti-(Maus-Fab)-Sekundärantikörper Vergleichsmessungen der minimalen Testmittelpunkte aller rekombinant hergestellten Fab-Fragmente durchgeführt. Nach Optimierung von Konjugat- und Fab-Konzentration wurden die in Tabelle 9 dargestellten minimalen IC<sub>50</sub>-Werte erhalten.

**Tabelle 9:** Zusammenfassung der minimalen IC<sub>50</sub>-Werte aller rekombinant hergestellten Fab-Fragmente und der zugehörigen Fab- und Konjugatverdünnungen.

<b>Fab</b>	<b>minim. IC<sub>50</sub> [µg/L]</b>	<b>Fab- Verdünnung</b>	<b>B[a]P-BSA- Verdünnung</b>
C60A	0.22 ± 0.04	1:5000	1:1000
C60M	0.28 ± 0.11	1:5000	1:500
C60S	0.22 ± 0.05	1:5000	1:1000
C60Y	0.24 ± 0.10	1:5000	1:500
C60V	0.24 ± 0.01	1:5000	1:500
C60T	0.33 ± 0.04	1:5000	1:1000
<i>Wildtyp</i>	<i>0.34 ± 0.06</i>	<i>1:1500</i>	<i>1:500</i>

Der Vergleich der erhaltenen minimalen Testmittelpunkte zeigt keinen signifikanten Unterschied der untersuchten Fabs hinsichtlich ihrer Nachweisstärke im ELISA und damit ihrer Affinität zu B[a]P. Ein Einfluss der mutierten Aminosäure in der CDR-H2 kann somit ausgeschlossen werden. Dies legt weiterhin nahe, dass diese CDR keinen signifikanten Beitrag zur Antigenbindung leistet, was unter Berücksichtigung bereits bekannter Fab-Antigen-Strukturen für Haptene, in denen vor allem die zentral gelegenen CDR3 beider Ketten mit dem Hapten wechselwirken, plausibel scheint (MacCallum, 1996). Auch ein Vergleich der Kalibrierkurven der Fabs, die in ihrem Verlauf untereinander eine große Ähnlichkeit zeigen, scheint größere Unterschiede der B[a]P-Bindung auszuschließen (Abb. 31). Lediglich die Kurven für C60A und C60M weisen eine flachere Steigung auf, in der sie sich von den übrigen Fabs unterscheiden, untereinander aber wieder recht ähnlich verlaufen. Dies kann anhand ihrer Herstellung erklärt werden, da die beiden Fragmente in einem separaten Durchlauf einige Wochen nach den anderen Fragmenten produziert wurden. Leicht veränderte Parameter während der Herstellung sowie die unterschiedliche Lagerungsdauer der Fragmente sind demnach wohl für die unterschiedlichen Kurvenverläufe verantwortlich.



**Abbildung 31:** Vergleich der Kalibrierkurven der Fab-Mutanten ( $n = 8$ ,  $m = 3$ ).

Vergleicht man weiterhin die erhaltenen Testmittelpunkte mit dem des kompletten Antikörpers, der bei etwa  $0.2 \mu\text{g/L}$  liegt, so kann ein Einfluss der rekombinanten Herstellung der Fragmente auf die Antigenbindung insgesamt ebenfalls nicht festgestellt werden. Die

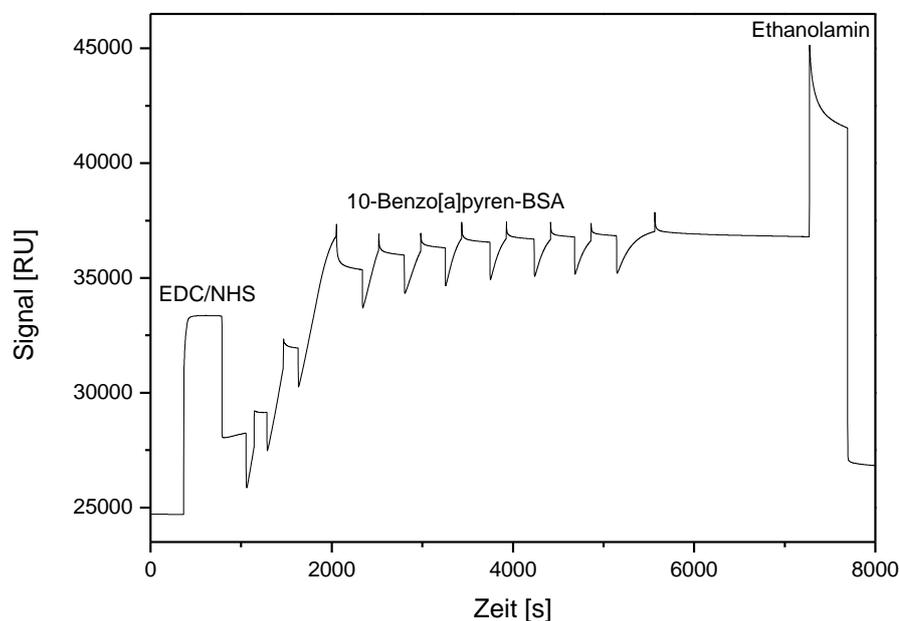
hohe Affinität des monoklonalen Antikörpers zu B[a]P scheint in den rekombinanten Fabs erhalten zu bleiben und die Antigenbindung gut übereinzustimmen.

#### **1.3.3 Messung von Affinitätskonstanten mittels Oberflächenplasmonenresonanz**

Neben den ELISA-Tests sollten zur Charakterisierung der rekombinant hergestellten Fab-Fragmente SPR-Messungen mit dem Biacore X100 durchgeführt werden, anhand derer die Affinitätskonstanten der Antikörper bestimmt werden sollten. Das kommerzielle System beinhaltet zwei Flusszellen, die durch Anpressen der Mikrofluidik an die dünne Goldoberfläche der Chips, die deren Unterseite darstellt, gebildet werden. Von den beiden Flusszellen wird eine typischerweise für die Messungen verwendet, während die andere als Referenzzelle dient. Auf der Goldoberfläche wird durch entsprechende Funktionalisierung einer der beiden Bindungspartner, deren Wechselwirkungen untersucht werden sollen, immobilisiert. Die Oberseite der Chips ist die Glasoberfläche, auf die die Goldschicht auf einer Seite aufgedampft ist. Die Einstrahlung monochromatischen Lichts (unter Totalreflexion) erfolgt von oben auf die Glasoberfläche und der Winkel mit maximaler Lichtabsorption (sog. SPR-Winkel) wird detektiert. Wie bereits beschrieben, ändert sich dieser SPR-Winkel mit der Belegungsdichte der Goldoberfläche, was die Detektion einer Assoziation bzw. Dissoziation von Molekülen aus der Flusszelle an die Chip-Oberfläche erlaubt. Vom System wird dabei die Änderung des SPR-Winkels in *refractive units* (RU) angegeben und kann in Echtzeit verfolgt werden.

Wie bereits in vorangegangenen Versuchen (Karsunke, 2011a) wurde aufgrund des geringen Molekulargewichts von B[a]P und der damit verbundenen geringen Signaländerungen bei seiner Assoziation an die Oberfläche statt des sonst üblichen direkten Formats das indirekte verwendet. Dieses beinhaltet im Zuge der Chip-Herstellung die Immobilisierung eines geeigneten B[a]P-Derivats auf der Chip-Oberfläche, wobei hierfür meist die mit einer Carboxydextranschicht funktionalisierten, kommerziell erhältlichen CM5-Chips verwendet werden. An deren freie Carboxygruppen werden vor allem primäre Amine unter Ausbildung von Säureamiden gebunden. Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit der SPR-Messungen mit den Ergebnissen der ELISA-Tests sicherzustellen und eine aufwendige B[a]P-Funktionalisierung zu vermeiden, wurde zur Immobilisierung das bereits im ELISA eingesetzte B[a]P-BSA-Konjugat verwendet. Prinzipiell können Hapten-Protein-Konjugate auf der Oberfläche der Biacore-Chips adsorptiv oder kovalent immobilisiert werden. Aufgrund der höheren Stabilität der Oberfläche und der damit verbundenen besseren

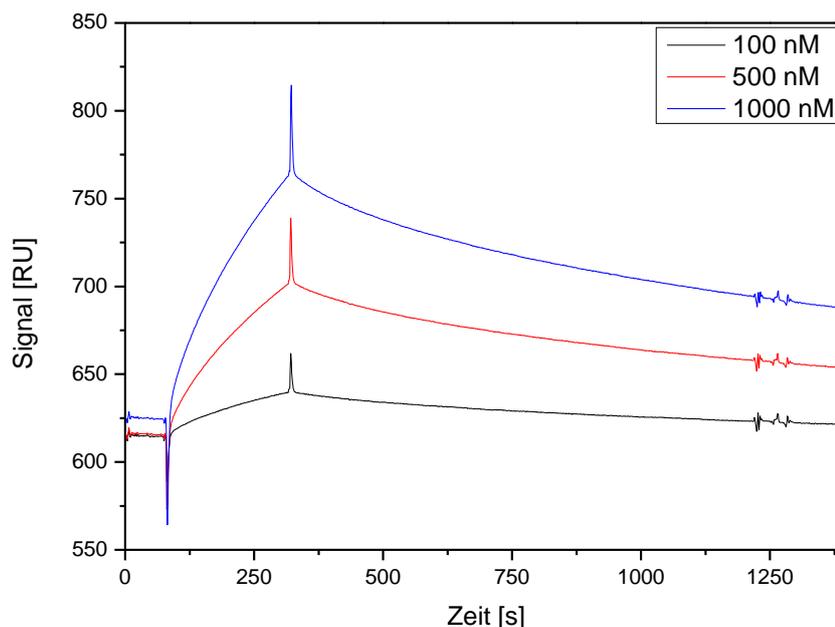
Regenerierbarkeit wurde hier eine kovalente Immobilisierung gewählt. Dazu wurde die Chip-Oberfläche zunächst mit einem Gemisch aus Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert, anschließend das B[a]P-BSA-Konjugat in Natriumacetatpuffer (pH 5) zur Immobilisierung über den Chip geleitet, der schließlich mit Ethanolamin deaktiviert wurde (siehe Abb. 32). Um die geringe Kopplungsdichte des Konjugats von durchschnittlich fünf Molekülen B[a]P pro BSA zu kompensieren, sollte die Belegungsdichte an der Oberfläche möglichst hoch sein. Da jedoch festgestellt werden musste, dass bei längerem Darüberleiten des Konjugats über den Chip immer mehr Konjugat adsorptiv gebunden wurde und beim anschließenden Spülen mit Laufpuffer wieder desorbierte, erfolgte die Immobilisierung in mehreren kürzeren Intervallen, nach denen jeweils ein Spülschritt stattfand. Nachdem nach zehn Immobilisierungsschritten die Belegungsdichte nicht mehr signifikant erhöht werden konnte, erfolgte die Deaktivierung mit Ethanolamin. Die währenddessen abnehmende Signalintensität zeigt, dass hier nochmals unspezifisch gebundenes Konjugat entfernt wurde. Auf diese Weise wurde eine Belegung von etwa 2250 RU erreicht. Die Referenzflusszelle wurde ebenso mit BSA bis zur maximalen Belegung beschichtet.



**Abbildung 32:** Verlauf der Biacore-Chipherstellung: Aktivierung mit EDC/NHS, Immobilisierung von 10-B[a]P-BSA (in mehreren Schritten) und Deaktivierung mit Ethanolamin.

Mit dem funktionalisierten Chip wurden anschließend für die sechs mutierten sowie den nichtmutierten Fab die Affinitäten ermittelt. Dazu wurden die Antikörperfragmente in drei

Konzentrationen für 4 min über den Chip geleitet. Während dieser Zeit ist die Bindung der Fragmente anhand der Signalzunahme zu erkennen (siehe Abb. 33). Anschließend wurde für 15 min Laufpuffer über den Chip gespült, währenddessen eine teilweise Dissoziation der Fabs erfolgte. Unter der Annahme eines 1:1-Bindungsmodells wurde aus der Assoziationskurve die Assoziationsratenkonstante  $k_a$  und aus der Dissoziationskurve die Dissoziationsratenkonstante  $k_d$  berechnet. Der Quotient von  $k_a$  und  $k_d$  ergibt die Affinitätskonstante  $K_A$ . Während der Messungen zeigte sich, dass für eine signifikante Signalzunahme durch die Fab-Bindung an die Oberfläche relativ hohe Konzentrationen der Fabs verwendet werden müssen. Typischerweise wurden Konzentrationen zwischen 100 und 1000 nM verwendet, um auch bei der niedrigsten Konzentration noch eine Signaländerung im Bereich von einigen zehn RU erreichen zu können. Dies legt nahe, dass mit der gewählten Immobilisierungsmethode lediglich eine limitierte maximale B[a]P-Dichte an der Oberfläche möglich ist, was wohl wiederum der relativ niedrigen Kopplungsdichte des Konjugats geschuldet ist.



**Abbildung 33:** Assoziation (100 - 300 s) und Dissoziationsverhalten (300 - 1400 s) der Fab-Mutante C60V. Als Fittingmodell zur Berechnung der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten wurde das 1:1 Bindungsmodell verwendet.

Alle getesteten Fabs zeigten ein sehr ähnliches Assoziations- bzw. Dissoziationsverhalten, was in beinahe übereinstimmenden Kurvenverläufen resultierte. Dadurch ergaben sich sehr ähnliche Werte für die errechneten Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten, sowie die daraus resultierenden Affinitätskonstanten, die in Tabelle 10 dargestellt sind.

**Tabelle 10:** Zusammenfassung der bestimmten Assoziations- ( $k_a$ ) und Dissoziationsratenkonstanten ( $k_d$ ) sowie der daraus berechneten Affinitätskonstanten ( $K_A$ ) der rekombinant hergestellten Fab-Fragmente.

Fab	$k_a$ [1/Ms]	$k_d$ [1/s]	$K_A$ [1/M]
C60A	4023	$7.44 \cdot 10^{-4}$	$5.41 \cdot 10^6$
C60M	5325	$8.55 \cdot 10^{-4}$	$6.23 \cdot 10^6$
C60S	2067	$8.58 \cdot 10^{-4}$	$2.41 \cdot 10^6$
C60Y	4077	$8.55 \cdot 10^{-4}$	$4.77 \cdot 10^6$
C60V	4400	$8.02 \cdot 10^{-4}$	$5.49 \cdot 10^6$
C60T	4796	$6.87 \cdot 10^{-4}$	$6.98 \cdot 10^6$
<i>Wildtyp</i>	<i>4506</i>	<i><math>8.37 \cdot 10^{-4}</math></i>	<i><math>5.39 \cdot 10^6</math></i>

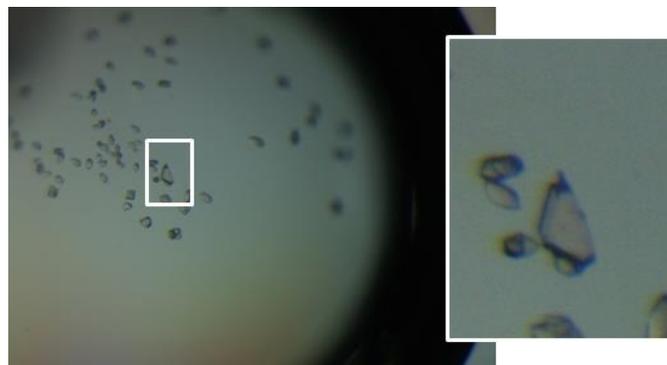
Die Werte für  $k_a$  lagen dabei in einem Bereich von etwa 4000 bis 5300 1/Ms. Lediglich der für Fab C60S ermittelte Wert von etwa 2100 war um einen Faktor zwei niedriger. Für  $k_d$  wurden Werte zwischen  $6.9 \cdot 10^{-4}$  und  $8.6 \cdot 10^{-4}$  1/s erhalten, wobei hier nur die Werte der Fabs C60A und C60T unterhalb von  $8 \cdot 10^{-4}$  1/s lagen. Die Affinitätskonstanten lagen damit in einem Bereich von etwa  $4.8 \cdot 10^6$  bis  $7.0 \cdot 10^6$  1/M, was im Rahmen der Messungengenauigkeit des Biacore-Systems als nicht signifikant unterschiedlich betrachtet werden kann. Aufgrund eines deutlich niedrigeren  $k_a$ -Werts ergab sich auch hier für C60S ein nur etwa halb so hoher Wert. Die dem Wildtyp-Fab ähnlichsten Werte wurden insgesamt für die Mutanten C60Y und C60V erhalten, ein signifikanter Einfluss der Mutation an Position 60 der Aminosäureabfolge der schweren Kette auf das Antigenbindeverhalten konnte jedoch auch mittels SPR nicht festgestellt werden.

Nachdem sowohl mit indirekt kompetitivem ELISA als auch mit SPR für keine der Mutanten deutliche Unterschiede bezüglich ihrer Wechselwirkung mit B[a]P festgestellt werden konnten, erfolgte die Auswahl einer Mutante für Kristallisationsversuche auf der Grundlage ihrer Ausbeute bei der rekombinanten Herstellung sowie eines Abgleichs der Häufigkeit der ausgetauschten Aminosäure in bekannten Fab-Sequenzen. Hier stellte C60Y einen guten Kompromiss dar, da der Fab gute Affinitäten zeigte, in ausreichend hoher Menge herstellbar war sowie mit Tyrosin eine typische Aminosäure an Position 60 aufwies. Der Fab wurde daher am Lehrstuhl für Biologische Chemie im Laborfermentermaßstab in größerer Menge für die Kristallisation produziert.

### 1.4 Herstellung von Einkristallen für den Fab/Hapten-Komplex

Zur Kristallisation des Fab/Hapten-Komplexes mit dem durch enzymatische Spaltung hergestellten Fab-Fragment wurden 110  $\mu\text{L}$  Fab-Lösung mit der 1.25-fachen molaren Menge an B[a]P in je 25  $\mu\text{L}$  Methanol bzw. Ethanol für 1 h inkubiert. Die Kristallisationsversuche wurden mit der *sitting drop*-Methode durchgeführt, wobei 0.2  $\mu\text{L}$  der komplexierten Fab-Lösung mit 0.2  $\mu\text{L}$  der jeweiligen Reservoir-Lösung gemischt und gegen 40  $\mu\text{L}$  der zu testenden Pufferlösung im Reservoir äquilibriert wurden. Die Befüllung der 96-well-Kristallisationsplatten erfolgte mittels eines speziellen Pipettierroboters, was eine hohe Reproduzierbarkeit der pipettierten Volumina sicherstellen sollte. Nach dem luftdichten Verschließen der Platten mit einer Folie wurden diese bei 20 °C über mehrere Wochen inkubiert. So konnten für den enzymatisch hergestellten Fab insgesamt etwa 400 verschiedene Kristallisationsbedingungen getestet werden. Die erhaltenen Kristalle wurden in der jeweiligen Reservoir-Lösung, nachdem diese mit 15 % Glycerin versetzt worden war, getränkt und konnten so in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Bis zur Messung am Diffraktometer wurden die Kristalle in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Die ersten Kristalle wurden bereits nach wenigen Tagen Inkubation mit 0.2 M Magnesiumacetat und 10 % (w/v) PEG 8000 erhalten. Nach etwa zehn Wochen Inkubation wurden bei 0.2 M Calciumchlorid, 0.1 M Tris (pH 8.5; siehe Abb. 34) und 25 % (w/v) PEG 4000 weitere Kristalle gefunden. Ein letzter Kristall wurde etwa drei Monate nach Beginn der Inkubation bei 1 M Lithiumchlorid, 0.1 M Zitronensäure (pH 4) und 20 % (w/v) PEG 4000 erhalten. Alle Kristalle entstanden mit der Fab-Ba[a]P-Mischung in 18.5 % Methanol. Für die Lösung des Komplexes in 18.5 % Ethanol wurden dagegen keine geeigneten Kristalle gefunden.



**Abbildung 34:** Nach ca. zehn Wochen Inkubation gebildete Proteinkristalle des enzymatisch hergestellten Fab-Fragments bei 0.2 M Calciumchlorid, 0.1 M Tris (pH 8.5) und 25 % (w/v) PEG 4000. Der vergrößerte Kristall ist etwa 80  $\mu\text{m}$  lang.

Erste Messungen am Diffraktometer zeigten für die drei Kristalle jedoch zu niedrig aufgelöste Beugungsmuster für eine Strukturbestimmung ( $> 4 \text{ \AA}$ ). Damit war die Bestimmung einer Kristallstruktur des Fab-B[a]P-Komplexes nicht möglich. Nachdem auch in weiteren Kristallisationsansätzen unter optimierten Bedingungen (mit weniger Lösemittel) keine geeigneten Kristalle gefunden wurden, mussten die Versuche mit dem enzymatisch hergestellten Fab schließlich abgebrochen werden. Somit konnte auf diesem Weg keine Kristallstruktur ermittelt werden.

Die Kristallisationsversuche mit den rekombinanten Fabs wurden am Lehrstuhl für Biologische Chemie durchgeführt. Die Zucht der Kristalle folgte im Prinzip der gleichen Vorgehensweise wie oben beschrieben. Zur Verbesserung der Löslichkeit von B[a]P wurden hier weitere Lösungsmittel getestet. Die Verwendung von Tetrahydrofuran erlaubte schließlich eine Komplexbildung zwischen B[a]P und dem Fab (Mutante C60Y). Von einem in Gegenwart von 2.2 M Natriummalonat bei pH 5.0 und einer Proteinkonzentration von 29 mg/mL erhaltenen Kristall (Abb. 35) wurde am Synchrotron BESSY II (Helmholtz-Zentrum Berlin) ein Röntgen-Beugungsdatensatz aufgenommen, mit dem die Strukturbestimmung möglich war. Zur Zeit wird am Lehrstuhl für Biologische Chemie an der Verfeinerung des Strukturmodells gearbeitet.



**Abbildung 35:** Verschiedene Kristalle der rekombinanten Fab-Mutante C60Y. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. A. Skerra. Die abgebildeten Kristalle sind etwa 0.5 mm lang.

## 2 ELISA-Verfahren zur Bestimmung von Benzo[a]pyren in Speiseölen

### 2.1 Extraktion basierend auf molekular geprägten Polymeren (MIPs)

Da eine Extraktion von unpolaren Analyten wie PAKs nicht ohne den Einsatz organischer Lösemittel auskommt, eignen sich MIPs dank ihrer hohen Robustheit gut für eine selektive Extraktion von B[a]P auch aus komplexen Matrices. In vorangegangenen Arbeiten wurden verschiedene Monomer/*cross-linker*-Kombinationen getestet, wobei mit 4-Vinylpyridin (4-VP) als Monomer und Divinylbenzol (DVB) als *cross-linker* hohe Bindekapazitäten für B[a]P erreicht werden konnten (Lai, 2004). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine MIP-basierte Extraktionsmethode zur immunologischen Bestimmung von B[a]P in Speiseölen entwickelt.

#### 2.1.1 Optimierung der MIP-Synthese

Da zur Herstellung molekular geprägter Polymere typischerweise hohe Templatmengen nötig sind, um eine möglichst hohe Bindekapazität zu erreichen, sollte die Verwendung des stark toxischen B[a]P als Templat vermieden werden. Durch den Einsatz strukturell ähnlicher, aber geringer toxischer PAKs kann dieses Risiko minimiert werden, ebenso wie die Gefahr einer fehlerhaften Überbestimmung der Analytkonzentration durch Templatspuren im Polymer. Darüber hinaus erlauben vor allem kleinere PAKs mit guter Verfügbarkeit eine kostensparendere Herstellung der MIPs. Besonders Pyren, das einen Kohlenstoffring weniger als B[a]P besitzt, repräsentiert einen Großteil der Molekülstruktur von B[a]P, wird nach der IARC bezüglich seiner Kanzerogenität in die unbedenkliche Klasse 3 eingruppiert (siehe Tab. 1) und ist eine gut verfügbare Standardchemikalie. Bei Pyren fehlt jedoch die für B[a]P charakteristische sogenannte *bay region* zwischen C<sub>10</sub> und C<sub>11</sub>, die im einfachsten Fall in Phenanthren vorliegt. Dieses ist gemäß IARC ebenfalls unbedenklich und leicht verfügbar. Beide PAKs wurden einzeln sowie kombiniert in verschiedenen Verhältnissen als Ersatztemplate getestet (siehe Abb. 36).

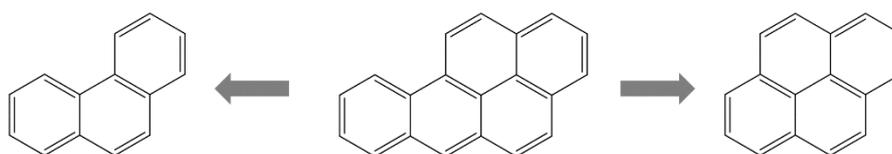
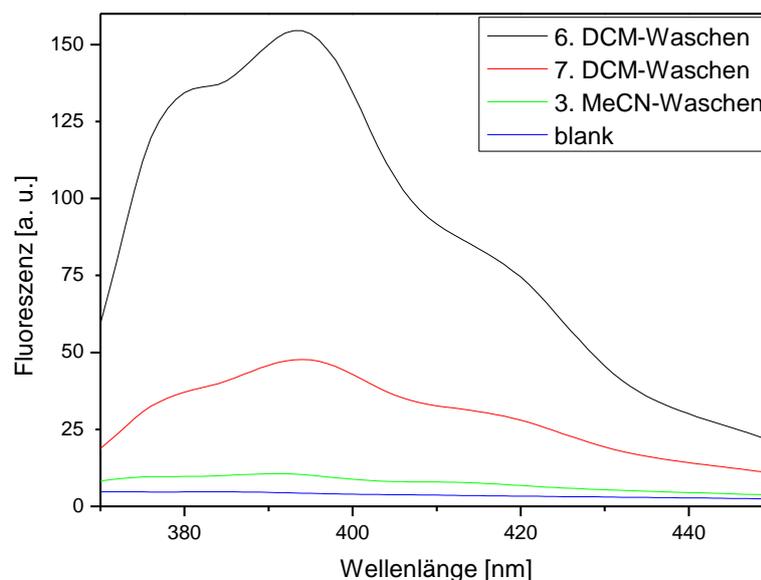


Abbildung 36: Imitation struktureller Charakteristika von B[a]P durch Mischung von Phenanthren und Pyren.

Für eine effektive Bindung des Analyten an die geprägten Bindestellen ist ein möglichst vollständiges Entfernen des Templats essentiell. Das Polymer, das zunächst als Monolith erhalten wurde und durch Mahlen in Mikropartikel zerkleinert wurde, wurde dazu zunächst mit Dichlormethan (DCM) und anschließend im Ultraschallbad mit Acetonitril (MeCN) gewaschen. Der Fortgang der Templatentfernung wurde anhand der Messung der Templatkonzentration im Überstand mittels Fluoreszenzspektroskopie überwacht. Dabei stellte sich heraus, dass Phenanthren bereits nach wenigen Waschschritten mit DCM vollständig entfernt werden konnte, während Pyren auch noch nach mehreren Waschschritten nachgewiesen werden konnte. Erst nach siebenmaligem Waschen mit DCM sowie dreimaligem Waschen mit MeCN war eine weitere Reduktion der Pyrenkonzentration nicht mehr möglich (siehe Abb. 37). Für die folgenden Synthesen wurde daher dieses Waschprotokoll angewandt.



**Abbildung 37:** Fluorimetrische Kontrolle der Templatgehalte (Pyren) nach verschiedenen Waschschritten.

Um möglichst hohe Bindekapazitäten für B[a]P zu erzielen, wurde die Templatzusammensetzung variiert und die maximale Bindekapazität  $Q$  für B[a]P durch fluorimetrische Bestimmung der B[a]P-Konzentration im Überstand berechnet. Derselben Prozedur wurde auch ein nichtgeprägtes Polymer (NIP) unterzogen, um den Anteil spezifischer Bindung abschätzen zu können. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt.

**Tabelle 11:** Vergleich der maximalen Bindekapazitäten  $Q$  für B[a]P von MIPs mit unterschiedlicher Templatzusammensetzung und einem nichtgeprägten Polymer (NIP).

Templat-Konzentration [mmol]		$Q$ [ $\mu\text{g/g}$ ]	$\frac{Q(\text{MIP})}{Q(\text{NIP})}$
Pyren	Phenanthren		
0	0	15.9	--
0	0.20	29.9	1.88
0.05	0.15	30.6	1.93
0.10	0.10	32.1	2.02
0.15	0.05	31.9	2.01
0.20	0	31.2	1.97

Die berechneten Bindekapazitäten für B[a]P unterscheiden sich unabhängig vom eingesetzten Templat nur wenig, sind jedoch in allen Fällen etwa doppelt so hoch wie die Bindung an ein nicht-geprägtes Polymer. Damit entsprechen sie im Wesentlichen der relativen Kapazität  $Q(\text{MIP})/Q(\text{NIP})$  eines mit B[a]P geprägten Polymers mit ansonsten gleichen Syntheseparametern, die bei 2.09 lag (Lai, 2004). Die höchsten Werte konnten dabei für Templatmischungen mit 50 bzw. 75 % Pyren erhalten werden, mit denen etwa 97 % der relativen Kapazität des B[a]P-geprägten Polymers erreicht werden konnte. Als optimale Templatzusammensetzung wurde daher für die folgenden Versuche 0.125 mmol Pyren und 0.075 mmol Phenanthren gewählt.

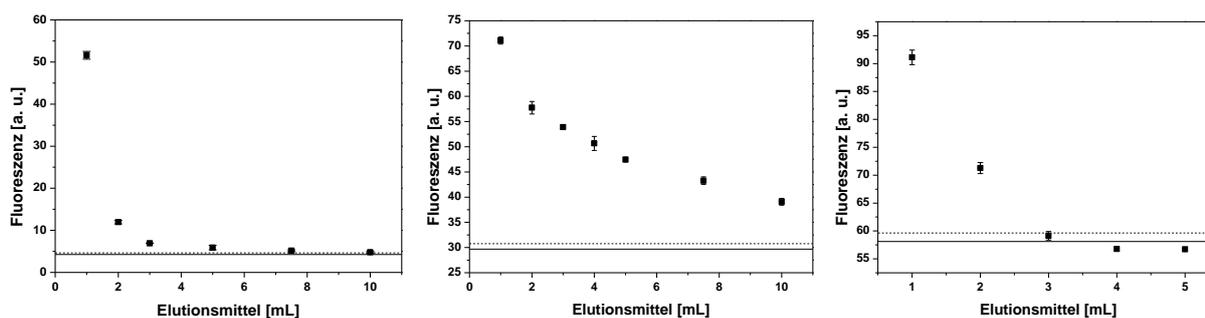
### 2.1.2 Entwicklung einer Extraktionsmethode

Um eine vollständige Bindung von B[a]P an das Polymer während der MISPE sicherzustellen, wurde B[a]P in Lösemitteln unterschiedlicher Polarität auf Polymersäulen mit 50 mg Polymer gegeben und der Anteil des gebundenen B[a]P durch fluorimetrische Messung der B[a]P-Konzentration im Durchlauf berechnet. Zur Ermittlung des optimalen Probenvolumens wurden B[a]P-Lösungen in Konzentrationen jeweils von 5  $\mu\text{g/L}$  in n-Hexan, DMSO und MeCN in Aliquots zu je 1 mL auf die MISPE-Säulen gegeben.

Für das unpolare n-Hexan sowie das polare MeCN konnte bei einem Probenvolumen von 1 mL eine fast quantitative B[a]P-Bindung festgestellt werden. In beiden Fällen war ein B[a]P-Signal unterhalb der Bestimmungsgrenze (*limit of quantification*, LOQ) im Fluoreszenzspektrum erkennbar, der Anteil an gebundenem B[a]P lag jedoch bei über 95 %. Für das mäßig polare DMSO konnte deutlich mehr B[a]P im Durchlauf gemessen werden,

hier waren bei 1 mL Probe etwa 63 % der aufgegebenen Menge nicht gebunden worden. Daher wurde DMSO als Lösemittel zur Probenaufgabe nicht weiter in Betracht gezogen. Bei höheren Probenvolumina stiegen bei allen Lösemitteln die B[a]P-Konzentrationen im Durchlauf mit zunehmendem Probenvolumen an, so dass 1 mL als maximales Probenvolumen für 50 mg MIP gewählt wurde. Wegen seiner guten Löslichkeit für Speiseölbestandteile sowie zufriedenstellender Bindung für B[a]P an das MIP wurde für die folgenden Versuche n-Hexan als Lösemittel zur Probenaufgabe verwendet.

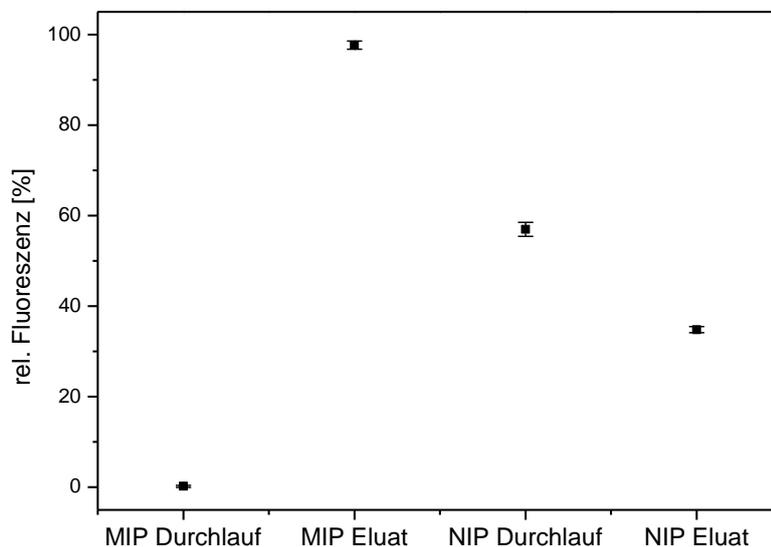
Zur Elution von B[a]P von der MIP-Säule wurden mit DCM, THF und MeCN Lösemittel getestet, die für ihre starke Elutionswirkung für B[a]P bei MISPE bzw. SPE bekannt sind (Lai, 2004; Barranco, 2004). Nach Aufgabe von 1 mL einer Lösung von 10 µg/L B[a]P in n-Hexan auf eine Säule mit 50 mL Polymer wurde jeweils fraktioniert mit bis zu 10 mL Lösemittel eluiert und die B[a]P-Konzentration am Fluorimeter gemessen. Die erhaltenen Signalintensitäten für die drei Lösemittel sind in Abbildung 38 dargestellt.



**Abbildung 38:** Messung der B[a]P-Konzentration in verschiedenen Eluatfraktionen bei Elution mit unterschiedlichen Lösemitteln mittels Fluoreszenzspektroskopie: Elution mit Dichlormethan (links), Elution mit Acetonitril (Mitte) und Elution mit Tetrahydrofuran (rechts). Die durchgezogene Linie stellt den Blindwert dar, die gepunktete Linie dessen dreifache Standardabweichung ( $m = 3$ ).

Sowohl mit DCM als auch mit THF kann bei 5 mL Lösemittel praktisch kein B[a]P mehr nachgewiesen werden. Bei MeCN zeigte sich eine schlechtere Elutionswirkung, da hier nach 10 mL Lösemittel offensichtlich immer noch keine komplette Elution vorlag. Da für eine immunanalytische Quantifizierung die nicht mit Wasser mischbaren Lösemittel DCM wie auch THF entfernt werden müssen und der Rückstand in einem deutlich polaren Lösemittel gelöst werden muss, wurde als Elutionsmittel aufgrund seiner leichteren Flüchtigkeit DCM gewählt. Darüber hinaus wird so die Gefahr von Analytverlusten durch in THF oftmals in Spuren gebildete Peroxide verhindert (Ligocki, 1984).

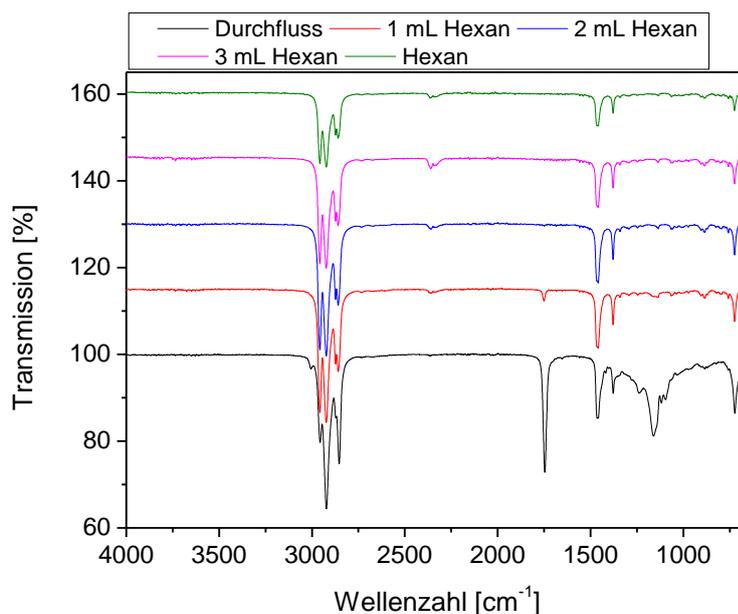
Um zu überprüfen, ob mit 5 mL DCM eine vollständige Elution von B[a]P von der MIP-Säule erreicht wird, wurde abermals B[a]P in n-Hexan auf eine MISPE-Säule gegeben und die B[a]P-Konzentration sowohl im Durchfluss als auch im Eluat gemessen. Zum Vergleich wurde dieselbe Prozedur mit einer NIP-Säule durchgeführt. Abbildung 39 zeigt, dass für das MIP von einer quantitativen Bindung von B[a]P ausgegangen werden kann, da praktisch kein Analyt im Durchfluss nachgewiesen werden konnte. Die Intensität des B[a]P-Signals im Eluat beträgt deutlich über 95 % des auf 100 % normierten Signals der Ausgangslösung. Damit kann von einer vollständigen Elution von B[a]P durch 5 mL DCM ausgegangen werden. An die NIP-Säule banden nur etwa 40 % des aufgegebenen B[a]P durch unspezifische Wechselwirkungen mit dem Polymer, etwa 60 % konnten im Durchfluss nachgewiesen werden. Auch hier wurden mit 5 mL DCM der gebundene Anteil vollständig eluiert.



**Abbildung 39:** Vergleich des B[a]P-Bindeverhaltens an das geprägte (MIP) sowie das ungeprägte Polymer (NIP). Dargestellt sind die B[a]P-Konzentrationen im Durchlauf sowie dem mit 5 mL DCM erhaltenen Eluat.

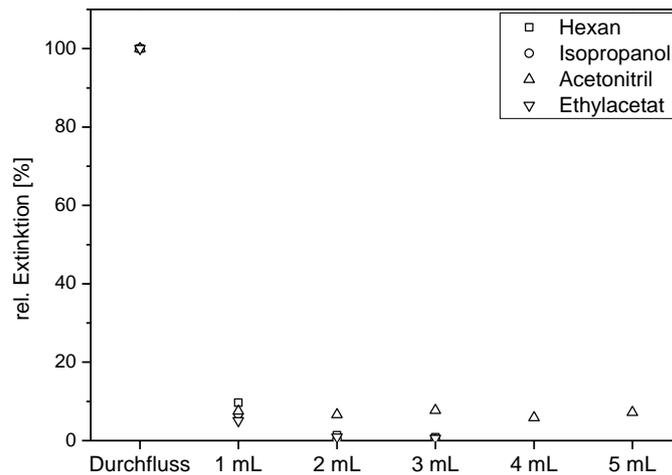
Um eine möglichst effektive Abtrennung lipidischer Matrixbestandteile zu erreichen, die in einem folgenden Immunoassay starke Störungen verursachen können, muss nach Aufgabe der Ölprobe ein wirkungsvoller Waschschritt eingeführt werden, der Matrixbestandteile möglichst vollständig entfernt, gleichzeitig aber die Bindung von B[a]P an das MIP nicht beeinflusst. Verschiedene Lösemittel wurden zunächst auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Komponenten von Speiseölen von der MISPE-Säule zu lösen. Dazu wurde je 1 mL einer unbelasteten Olivenölprobe, die zuvor mit n-Hexan 1:1 verdünnt worden war, auf eine MISPE-Säule gegeben. Nach dem Durchlauf durch die Säule wurde mit Lösemittel in 1 mL-Schritten

gewaschen. Mittels IR-Spektroskopie konnte dann der Gehalt an Fettsäureestern über die C=O-Doppelbindungsschwingung bei etwa  $1750\text{ cm}^{-1}$  abgeschätzt werden (Adhikari, 1994; Parkash, 1974). Die Aufnahme von UV/Vis-Spektren der Waschfraktionen gibt anhand charakteristischer Absorptionsbanden bei etwa 400 bis 500 nm sowie 600 bis 700 nm Auskunft über Pigmente wie Chlorophylle und Carotinoide (Lipke, 2013). Als Lösemittel wurden n-Hexan, Isopropanol, Ethylacetat und MeCN getestet.



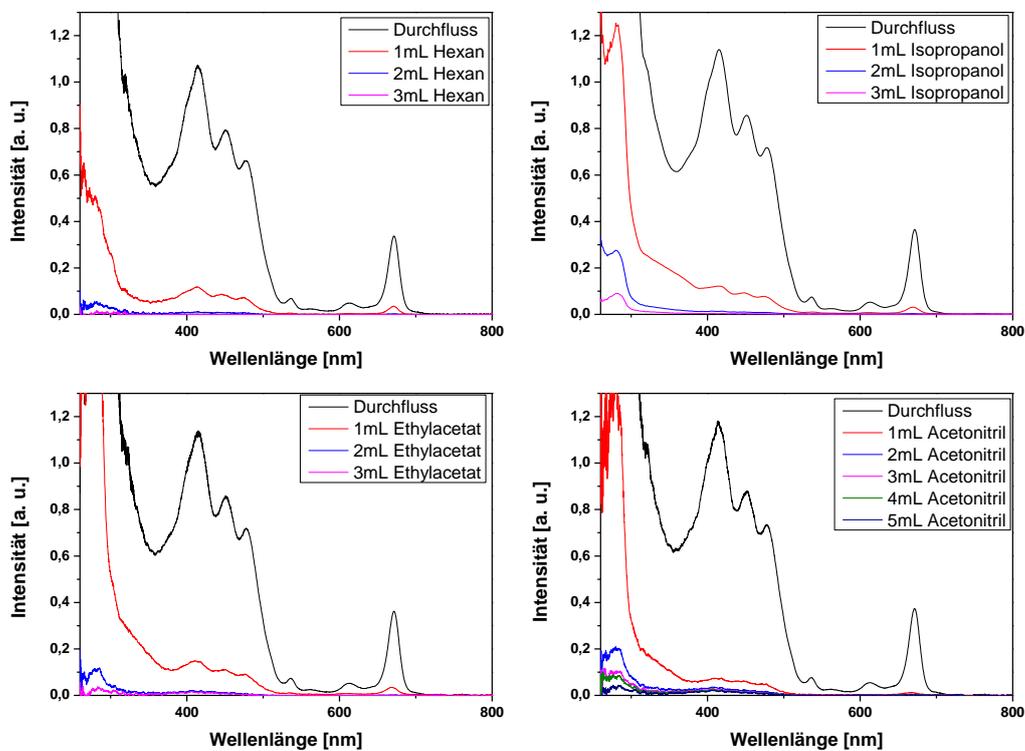
**Abbildung 40:** IR-spektroskopische Messung des Matrixgehalts in den Hexan-Waschfraktionen.

In Abbildung 40 sind exemplarisch die IR-Spektren dargestellt, die mit 3 mL n-Hexan gemessen werden konnten. Die Intensitäten der Bande bei etwa  $1750\text{ cm}^{-1}$  für die vier getesteten Lösemittel sind in Abbildung 41 aufgetragen. Hieraus kann deutlich erkannt werden, dass MeCN das einzige Lösemittel mit ungenügender Löslichkeit für lipidische Matrixbestandteile ist, mit dem auch nach 5 mL Lösemittel immer noch Fettsäureester detektiert werden konnten. Die übrigen Lösemittel zeigen ein ähnliches Verhalten, so dass nach 2 und 3 mL keine weitere Verringerung der Signalintensität mehr festgestellt werden konnte und die C=O-Bande nicht mehr detektiert werden konnte.



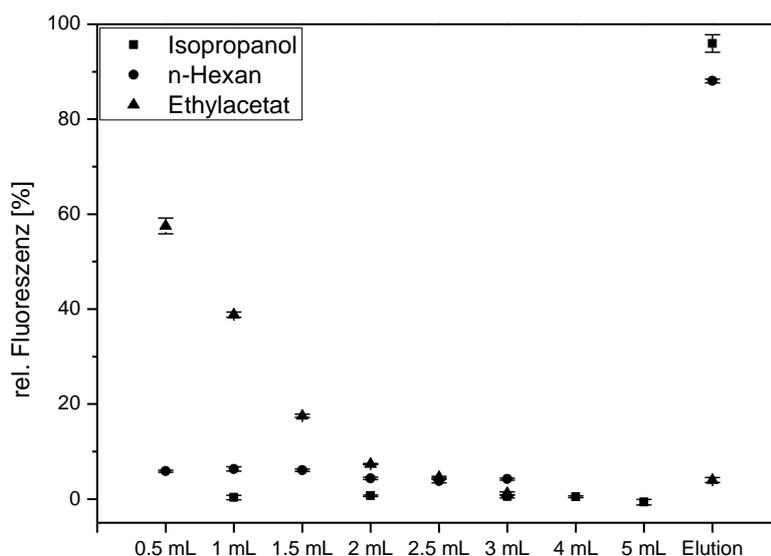
**Abbildung 41:** Signalintensität im IR-Spektrum bei etwa  $1750\text{ cm}^{-1}$  nach Waschen der beladenen MIP-Säule mit verschiedenen Lösemitteln.

Damit übereinstimmende Ergebnisse konnten auch mittels UV/Vis-Spektroskopie erzielt werden. Auch hier konnten für MeCN auch nach 5 mL Lösemittel noch Matrixkomponenten gemessen werden, während bei den übrigen drei Lösemitteln die Banden zwischen 400 und 500 nm bzw. zwischen 600 und 700 nm nach 3 mL praktisch nicht mehr vorhanden waren (siehe Abb. 42). MeCN wurde damit nicht weiter für einen Waschschrift in Betracht gezogen.



**Abbildung 42:** UV/Vis-spektroskopische Messung des Matrixgehalts in den Waschfraktionen verschiedener Lösemittel.

Schließlich wurde für Isopropanol, n-Hexan und Ethylacetat überprüft, ob die Lösemittel auf der Säule gebundenes B[a]P ebenfalls lösen oder auf der Säule zurückhalten würden. Dazu wurde B[a]P in n-Hexan auf Säulen gegeben, anschließend wurden Isopropanol, n-Hexan oder Ethylacetat fraktioniert zugegeben und die Säule schließlich mit 5 mL DCM eluiert. Die B[a]P-Konzentrationen in den Waschfraktionen sowie dem Eluat wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie bestimmt (Abb. 43).



**Abbildung 43:** Test der frühzeitigen B[a]P-Elution während dem Waschen der MIP-Säule mit Isopropanol, n-Hexan und Ethylacetat ( $m = 3$ ).

Mit Ethylacetat wurde B[a]P nach 3 mL beinahe komplett von der Säule gelöst, so dass im Eluat nur ein minimaler B[a]P-Gehalt gemessen werden konnte. Ethylacetat war damit unbrauchbar zum Waschen der MISPE-Säulen. In den Isopropanolfractionen konnte kein B[a]P nachgewiesen werden, so dass im Eluat etwa 95 % des aufgegebenen B[a]P wiedergefunden wurden. Bei n-Hexan zeigten sich leichte B[a]P-Verluste während des Waschens, der B[a]P-Gehalt im Eluat betrug nach insgesamt 3 mL n-Hexan dennoch über 90 % verglichen mit der Ausgangslösung, was als ausreichend betrachtet wurde. Um eine optimale Entfernung von Matrixkomponenten von der Säule zu erreichen, wurde im Folgenden ein kombinierter Waschschrift mit 3 mL n-Hexan gefolgt von 5 mL Isopropanol angewandt.

#### 2.1.3 B[a]P-Extraktion für eine Quantifizierung mittels ELISA

Nach der Elution muss der mit DCM eluierte Extrakt für eine immunanalytische B[a]P-Quantifizierung in ein polareres, wasserlösliches Lösemittel überführt werden, das dann mit Wasser bzw. Wasser/Alkohol-Mischungen verdünnt werden kann. Da die Löslichkeit von B[a]P in Wasser bei etwa 4 µg/L liegt (de Maagd, 1998), haben sich zur Herstellung höher konzentrierter B[a]P-Lösungen, wie sie zur Kalibrierung benötigt werden, Mischungen von Wasser mit 10 % (v/v) Methanol bewährt (Matschulat, 2005; Karsunke, 2011a). Das Elutionsmittel wurde also vollständig eingedampft und zur Wiederaufnahme des Rückstands wurden MeCN und DMSO in unterschiedlichen Volumina getestet, die anschließend mit Wasser/MeOH (9:1) verdünnt wurden. Mit dem so präparierten Extrakt wurden B[a]P-Verdünnungsreihen hergestellt und der ELISA mit diesen kalibriert. Zur Steigerung der Nachweisstärke wurde der MISPE eine LLE vorgeschaltet, die im Wesentlichen gemäß der Testmethode PAH\_001 des Bundesamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) durchgeführt wurde.

Es zeigte sich, dass für die Extrakte, die mit MeCN gelöst worden waren, keine reproduzierbaren Kalibrierkurven mit zufriedenstellender Sensitivität erhalten werden konnten. Mit DMSO dagegen konnten vielversprechende Kalibrierungen erhalten werden, so dass hier das Lösemittelvolumen sowie der Verdünnungsfaktor in Wasser/MeOH auf eine möglichst hohe Nachweisstärke hin optimiert wurden. Die Nachweisstärke der Kurven wurde anhand des Testmittelpunkts verglichen. Dabei ergaben ein DMSO-Volumen von 1.5 mL sowie dessen Verdünnung um einen Faktor 50 die niedrigsten IC<sub>50</sub>-Werte, die aber mit relativ hohen Unsicherheiten behaftet waren (Tab. 12). Kleinere Fehler wurden mit höheren Verdünnungen erhalten, gleichzeitig aber auch eine Verschlechterung der Nachweisstärke. Als optimale Werte wurden daher ein Lösemittelvolumen von 750 µL sowie ein Verdünnungsfaktor von 1:100 in Wasser/MeOH gewählt.

**Tabelle 12:** Optimierung des DMSO-Volumens und der Verdünnung in Wasser/Methanol (10 %) für möglichst hohe Nachweisstärken der Kalibrierungen.

DMSO-Volumen [µL]	Verdünnung in Wasser/MeOH (10:90, v/v)	gesamter Verdünnungsfaktor	Kalibrierung möglich?	IC <sub>50</sub> -Wert [µg/kg]
375	1:100	1:25	nein	
750	1:50	1:25	nein	
1500	1:25	1:25	nein	
500	1:100	1:33.3	ja	43.0 ± 19.4
750	1:75	1:37.5	ja	48.9 ± 26.1
375	1:200	1:50	ja	36.9 ± 0.6
750	1:100	1:50	ja	36.5 ± 6.2
1500	1:50	1:50	ja	24.4 ± 10.6
375	1:400	1:100	ja	50.3 ± 10.2
750	1:200	1:100	ja	46.5 ± 11.0
1500	1:100	1:100	ja	59.1 ± 4.1

Eine Verbesserung der Nachweisstärke konnte durch die Immobilisierung eines 3-Fluoranthenyl-BSA-Konjugats statt dem B[a]P-BSA-Konjugat erzielt werden, das auch in vorangegangenen Versuchen erfolgreich eingesetzt worden war (Karsunke, 2011b). Durch eine Optimierung der Konzentrationen von Primärantikörper und *coating*-Antigen konnte eine Verringerung der Nachweisgrenze (*limit of detection*, LOD) unterhalb des gesetzlich festgelegten Grenzwerts von 2 µg/kg erreicht werden (Tab. 13). Die höchste Nachweisstärke wurde dabei für eine Antikörperverdünnung von 1:20000 und eine Konjugatverdünnung von 1:15000 beobachtet.

**Tabelle 13:** Parameter der Kalibrierungen in Abhängigkeit von Antikörper- und Konjugatverdünnung für 3-Fluoranthenyl-BSA.

Antikörperverdünnung	Konjugatverdünnung	IC <sub>50</sub> [µg/kg]	Arbeitsbereich [µg/kg]	LOD [µg/kg]
1:20000	1:5000	8.10	2.56 - 25.66	1.27
1:20000	1:10000	8.25	2.35 - 29.15	2.34
1:20000	1:15000	5.45	2.06 - 14.45	1.79
1:40000	1:5000	52.05	4.78 - 567.38	4.24

Um die Präzision der ELISA-Kalibrierung abschätzen zu können, wurden aus einem Extrakt drei separate Verdünnungsreihen hergestellt und mit diesen jeweils Kalibrierkurven aufgenommen. Aus den erhaltenen Testmittelpunkten wurde der Mittelwert gebildet, womit sich ein Wert von 7.58 ± 0.79 µg/kg ergab. Darüber hinaus wurden zur Abschätzung der

Wiederholbarkeit der Extraktion mit einer Ölprobe drei Extraktionen durchgeführt, um anschließend mit jedem Extrakt eine Kalibrierkurve zu erstellen. Aus den erhaltenen drei Testmittelpunkten wurde ein Mittelwert von  $8.95 \pm 0.96 \mu\text{g/kg}$  berechnet. Bei beiden Mittelwerten liegen die Standardabweichungen damit grob in einem Bereich von 10 %, was bei Immunoassays bezüglich der Wiederholbarkeit einen typischen Wert darstellt. Der ELISA wie auch die Extraktion wurden daher als reproduzierbar eingestuft.

Als Matrix für die Optimierung der Kalibrierung wurde wegen seiner weiten Verbreitung Olivenöl gewählt. Auch bezüglich seiner Fettsäurezusammensetzung sollte Olivenöl mit einem Anteil von etwa 75 Gew.-% an einfach ungesättigter Ölsäure die Matrixzusammensetzungen anderer Öle mit höheren Anteilen an gesättigten oder zweifach ungesättigten Fettsäuren ebenfalls gut repräsentieren (Gunstone, 2004). Da verschiedene Öle darüber hinaus aber auch unterschiedlich hohe Anteile an Begleitstoffen wie Phospholipiden, Wachsen, Steroiden, Terpenen, Farbstoffen oder fettlöslichen Vitaminen enthalten können (Ebermann, 2011), deren Einfluss auf den Immunoassay schwer abgeschätzt werden kann, wurde der ELISA mit einer Reihe von Pflanzenölextrakten aus unterschiedlichen Quellen kalibriert. Die resultierenden Kalibrierparameter in Zusammenhang mit der Fettsäurezusammensetzung sind in Tabelle 14 dargestellt.

**Tabelle 14:** Testmittelpunkte, Nachweisgrenzen und Arbeitsbereiche der Kalibrierkurven für verschiedene Speiseöle unterschiedlicher Fettsäurezusammensetzung.

Öl	IC <sub>50</sub> [µg/kg]	LOD [µg/kg]	Arbeitsbereich [µg/kg]	gesättigte FS [wt%]	einfach ungesättigte FS [wt%]	mehrfach ungesättigte FS [wt%]
Kokosöl	7.87	0.61	2.44 - 25.43	90	7	2
Palmöl	10.50	1.35	2.95 - 37.38	46	39	11
Olivenöl 1	10.66	0.65	3.45 - 32.88	12	78	8
Olivenöl 2	10.18	1.39	2.68 - 38.68			
Erdnussöl	9.33	1.51	2.74 - 31.69	7-15	46-71	14-35
Sonnenblumenöl	7.68	1.59	2.01 - 29.36	11	20	60
Traubenkernöl	7.32	1.37	2.11 - 25.44	11	18	71
Leinöl*	9.30	0.73	2.06 - 41.95	9	17	74

\* Beinhaltet bis zu 60 % dreifach ungesättigter Fettsäuren.

Unabhängig von der zugrunde liegenden Ölpflanze bzw. der Zusammensetzung waren die Parameter für alle untersuchten Öle sehr ähnlich, so dass der Einfluss der im Extrakt verbliebenen Lipidbestandteile auf den Immunoassay offensichtlich vernachlässigbar ist. Die beobachteten LODs lagen bei allen Ölen unterhalb von 2 µg/kg, so dass eine Messung der gesetzlich relevanten Konzentrationen unabhängig vom eingesetzten Öl möglich ist.

Um Extraktionsverluste abschätzen zu können, wurden unbelastete Ölproben mit B[a]P in unterschiedlichen Konzentrationen aufgestockt, mit der entwickelten Methode extrahiert und die B[a]P-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Als essentiell hierbei erwies sich die Verwendung von Glasgefäßen bei der LLE. Besonders die Verwendung von Kunststoffröhrchen für LLE und Zentrifugation führt aufgrund der Adsorption von B[a]P an die unpolare Oberfläche zu deutlichen Verlusten während der Extraktion. Durch den Einsatz von Glasröhrchen können die Wiederfindungen deutlich verbessert werden (Tab. 15).

**Tabelle 15:** Wiederfindungsraten aufgestockter Olivenölproben bei Lösemittelextraktion in Kunststoff- bzw. Glaszentrifugenröhrchen.

aufgestockte Konzentration [µg/kg]	Kunststoffröhrchen		Glasröhrchen	
	Gemessene Konz. [µg/kg]	Wiederfindung [%]	Gemessene Konz. [µg/kg]	Wiederfindung [%]
2.5	0.13 ± 0.01	5	1.91 ± 0.04	76
5	0.51 ± 0.01	10	5.21 ± 0.44	104
10	1.32 ± 0.04	13	13.28 ± 0.28	133

Proben von Olivenöl, Sonnenblumenöl und Leinsamenöl wurden daraufhin mit B[a]P aufgestockt und Wiederfindungsraten bestimmt. Wie in Tabelle 16 dargestellt, reichten die Wiederfindungen für B[a]P von 63 bis 114 %, wobei für Olivenöl und Leinsamenöl tendenziell Unterbestimmungen vorlagen, während die Wiederfindungen für Sonnenblumenöl eher höher lagen.

**Tabelle 16:** Wiederfindungsraten für aufgestockte Speiseölproben.

Öl	aufgestockte B[a]P-Konz. [µg/kg]	gemessene B[a]P-Konz. [µg/kg]	Wieder- findung [%]
Olivenöl	2.5	2.47 ± 0.10	99
	5	3.24 ± 0.19	65
Sonnen- blumenöl	2.5	2.86 ± 0.30	114
	6	4.70 ± 0.29	78
Leinöl	2.5	2.36 ± 0.09	94
	6	3.75 ± 0.12	63

Zur weiteren Validierung wurde eine Referenzprobe von PAH-belastetem Olivenöl vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit erhalten. Die Konzentrationen der 15+1 PAKs der EU-Prioritätsliste waren hier mit GC/MS bestimmt worden. Die Probe wurde ebenso mit der entwickelten Methode gemessen, wobei hier aufgrund der Kreuzreaktivität des Antikörpers gegenüber den übrigen, in der Probe vorliegenden PAKs lediglich ein PAK-Summensignal bestimmt werden kann, das deutlich über der tatsächlichen B[a]P-Konzentration liegen sollte. Die Berechnung des theoretischen Signalbeitrags (B[a]P-Äquivalent) jedes einzelnen PAK erfolgte auf Grundlage der Selektivität des MIP, die mittels GC/MS-Messungen bestimmt wurde, sowie der Antikörper-Kreuzreaktivität (siehe Tab. 17). Dazu wurden beide Werte mit der tatsächlichen Konzentration des jeweiligen PAK multipliziert und die Summe der B[a]P-Äquivalente mit der im ELISA ermittelten B[a]P-Konzentration verglichen. Diese ergab einen Wert von 5.4 µg/kg und lag damit um einen Faktor von 2.1 über der mit GC/MS bestimmten Konzentration von 2.56 µg/kg. Die berechnete Konzentration, die sich aus den B[a]P-Äquivalenten ergab, lag mit 11.07 aber nochmal etwa doppelt so hoch. Die Unterbestimmung kann über die limitierte Anzahl an Antikörperbindestellen erklärt werden und die verstärkte Konkurrenz durch das Vorliegen einer hohen Zahl an Antigenen. So werden offensichtlich weniger PAKs detektiert als tatsächlich vorhanden sind, was ein unterbestimmtes Summensignal zur Folge hat.

**Tabelle 17:** Berechnung von B[a]P-Äquivalenten für die 15(+1) EU PAKs basierend auf der MIP-Selektivität und der Kreuzreaktivität des Antikörpers.

PAK	c [µg/kg]	MIP Selektivität [%]	Kreuz- reaktivität [%]	B[a]P Äquivalente [µg/kg]
Benzo[a]pyren	2.56	100	100	2.56
Benzo[c]fluoren	4.68	43	6	0.12
Benzo[a]anthracen	1.84	71	13	0.17
Chrysen	4.02	80	77	2.47
Benzo[b]fluoranthen	4.32	87	24	0.90
Benzo[j]fluoranthen	4.65	94	45	1.96
Benzo[k]fluoranthen	1.96	86	5	0.08
Cyclopenta[cd]pyren	3.66	75	3	0.09
Dibenzo[ah]anthracen	1.10	104	< 0.1	0.00
Benzo[ghi]perylen	3.60	96	1	0.03
Dibenzo[ae]pyren	2.05	105	< 0.1	0.00
Dibenzo[ah]pyren	2.34	111	3	0.08
Dibenzo[ai]pyren	3.09	116	6	0.21
Dibenzo[al]pyren	1.90	84	< 0.1	0.00
Indeno[1,2,3-cd]pyren	5.17	99	45	2.31
5-Methylchrysen	2.62	66	5	0.08
				$\Sigma$ <b>11.07</b>

Aufgrund der Selektivität der MIPs sowie der Kreuzreaktivität des B[a]P-Antikörpers ergibt sich also ein PAK-Summensignal bei der Messung der B[a]P-Konzentration. Ist die gemessene B[a]P-Äquivalent-Konzentration unter dem Grenzwert von 2 µg/kg, kann in jedem Fall auf die Unbedenklichkeit der Ölprobe geschlossen werden. Höhere Konzentrationen lassen keinen eindeutigen Rückschluss auf einen möglicherweise überschrittenen B[a]P-Grenzwert zu, so dass in diesem Fall eine weitergehende chromatographische Untersuchung der Probe zu empfehlen ist.

## 2.2 Test weiterer Extraktionsverfahren

### 2.2.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion mit polaren Lösemitteln

Aufgrund der generell hohen Matrixtoleranz von Immunoassays wurden einfache Flüssig-Flüssig-Extraktionen (LLE) zur Extraktion von B[a]P aus Speiseölen für eine anschließende immunanalytische Quantifizierung getestet. Gängige LLE-Verfahren greifen nach

Verdünnung der Ölprobe mit Alkanen oftmals auf DMSO oder DMF/Wasser-Mischungen als Extraktionsmittel zurück (Plaza-Bolaños, 2010). Zur Entwicklung eines einfachen und schnellen Extraktionsverfahrens wurden beide Lösemittel zur Extraktion unverdünnter, unbelasteter Olivenölproben eingesetzt, um nach Verdünnung des Extrakts mit Wasser/MeOH (9:1) sowie Herstellung einer B[a]P-Verdünnungsreihe Kalibrierkurven aufzunehmen. Um den Matrixeinfluss zu minimieren bzw. eine möglichst hohe Nachweisstärke zu erreichen, wurden verschiedene Verdünnungen des Extrakts in Wasser/MeOH getestet. Mit einer DMF/Wasser-Mischung (9:1) konnte selbst bei einer Extraktverdünnung von 1:1000 keine Kalibrierkurve aufgenommen werden, da hier entweder ein hoher Anteil an lipidischen Matrixkomponenten oder das Lösemittel selbst die Antigen-Antikörperbindung zu stark beeinflussten. Bei einer Extraktion mit DMSO konnte nur mit einer Extraktverdünnung von 1:1000 eine Kalibrierung erstellt werden, allerdings war diese mit einem Testmittelpunkt von  $135.4 \pm 78.6 \mu\text{g/kg}$  bzw. einem Arbeitsbereich von 23.0 bis  $798.8 \mu\text{g/kg}$  für eine B[a]P-Messung um den gesetzlichen Höchstwert zu wenig nachweisstark. Mit niedrigeren Verdünnungen waren keine Kalibrierungen möglich.

Der Anteil ölhaltiger Matrices im Extrakt bei einer LLE mit DMSO konnte durch eine Vorextraktion mit einer Mischung aus DMSO und 0.3 M HCl (9:1) entscheidend reduziert werden (Glass, 2005). Ein Test dieses Verfahrens mit Olivenölproben ergab, dass dadurch die Extraktverdünnung deutlich verringert werden konnte und erst ab einer Verdünnung von 1:50 kein sigmoidaler Kurvenverlauf mehr beobachtet wurde (Tab. 18).

**Tabelle 18:** Ermittlung der zur ELISA-Messung minimal möglichen Extraktverdünnung.

<b>Extrakt- verdünnung</b>	<b>IC<sub>50</sub> [<math>\mu\text{g/L}</math>]</b>
1:1000	$0.33 \pm 0.07$
1:500	$0.35 \pm 0.04$
1:250	$0.34 \pm 0.07$
1:100	$0.34 \pm 0.33$
1:50	--
1:25	--

Bei einer Extraktverdünnung von 1:100 konnte zwar eine Kalibrierfunktion erstellt werden, allerdings war diese mit einer hohen Unsicherheit verbunden, wie anhand des Fehlers des Testmittelpunkts deutlich wird. Die folgenden Messungen wurden daher mit einer

Verdünnung von 1:250 durchgeführt. Für die aufgestellte Kurve wurden damit die in Tabelle 19 dargestellten Parameter erhalten.

**Tabelle 19:** Testmittelpunkt, Arbeitsbereich und Nachweisgrenze der Kalibrierung bei einer Extraktverdünnung von 1:250.

	$\mu\text{g}/\text{kg}$
<b>IC<sub>50</sub></b>	85.42 ± 17.5
<b>Arbeitsbereich</b>	17.43 – 418.67
<b>LOD</b>	15.73

Dadurch war die erhaltene Kalibrierung mit einem LOD von etwa 16  $\mu\text{g}/\text{kg}$  nicht nachweisstark genug zur Messung des B[a]P-Grenzwerts von 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Auch hier wurde versucht, durch die Verwendung anderer PAK-Konjugate eine Verringerung der Nachweisgrenze zu erreichen (Tab. 20). Ein signifikanter Unterschied der IC<sub>50</sub>-Werte und eine damit einhergehende Steigerung der Nachweisstärke konnte jedoch nicht beobachtet werden. Mit dem Chrysenyl-BSA-Konjugat musste sogar eine deutliche Verschlechterung des Testmittelpunkts festgestellt werden. Der ELISA wurde daher weiterhin mit B[a]P-BSA durchgeführt.

**Tabelle 20:** Verdünnungsfaktoren und zugehörige Testmittelpunkte für Proteinkonjugate anderer PAKs.

<b>Konjugat</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>IC<sub>50</sub> [<math>\mu\text{g}/\text{L}</math>]</b>
Fluoranthenyl-BSA	1:1000	0.40
	1:250	0.47
Benzo[a]anthracenyl-BSA	1:1000	0.30
	1:250	--
Pyrenyl-BSA	1:1000	0.38
	1:250	0.37
Chrysenyl-BSA	1:1000	1.84
	1:250	1.43

Zur Bestimmung der Wiederfindungen wurde unbelastetes Olivenöl mit B[a]P in unterschiedlichen Konzentrationen aufgestockt und mittels ELISA quantifiziert (Tab. 21). Für alle drei Proben wurden leichte Unterbestimmungen erhalten, wobei die Wiederfindungsraten zwischen 70 und 97 % liegen.

**Tabelle 21:** Bestimmung von Wiederfindungsraten für aufgestockte Olivenölproben.

<b>aufgestockte Konzentration [µg/kg]</b>	<b>gemessene Konzentration [µg/kg]</b>	<b>Wieder- findungs- rate [%]</b>	<b>IC<sub>50</sub>/ Arbeits- bereich [µg/kg]</b>
40	39 ± 2	97	
80	68 ± 4	85	120/ 34 - 427
250	175 ± 12	70	

Zur B[a]P-Messung im Bereich weniger µg/kg ist die Extraktionsmethode damit ungeeignet. Zur Messung starker PAK-Belastungen, wie sie beispielsweise in unraffiniertem oder mehrmals erhitztem Öl auftreten können, stellt sie allerdings eine schnelle und kostengünstige Alternative dar (Wijeratne, 1996; Srivastava, 2010).

### 2.2.2 Test verschiedener Materialien für eine Festphasen-Extraktion

Bei einer SPE mit Umkehrphasen wie beispielsweise C<sub>18</sub>-modifiziertem Silica wird typischerweise mit polaren Lösemitteln wie MeCN eluiert (Gey, 2008). Für eine Quantifizierung mittels ELISA hätte dies den Vorteil, dass so möglicherweise das Eluat direkt mit Wasser/MeOH verdünnt werden kann. Zur Extraktion von B[a]P sind Methoden mit verschiedenen Umkehrphasen beschrieben (Bogusz, 2004; Weißhaar, 2002). Auch für die Kopplung mit einem Immunoassay wurden neben dem gängigen C<sub>18</sub> auch Phenyl-Ethyl-Silica, Poly(styrol-co-divinylbenzol) und Poly(N-(4-vinyl)benzyl-2-piperidon) getestet. Es musste jedoch festgestellt werden, dass nach Aufgabe der unverdünnten Ölprobe und Elution der Anteil an koeluiertes Ölmatrix relativ hoch war, so dass nach anschließender Verdünnung mit Wasser/MeOH-Gemischen die Löslichkeit des Eluats nicht mehr gegeben war.

Bei der Normalphasen-SPE, oftmals unter Verwendung von unmodifiziertem Silica, wird in der Regel mit unpolaren Lösemitteln eluiert, wodurch bei Kombination mit einem Immunoassay entweder eine sehr hohe Verdünnung im wässrigen Lösemittelgemisch gewählt oder das Lösemittel gewechselt werden muss, um die Messung in hydrophilem Milieu durchführen zu können. Da mit Verdünnungsfaktoren über 10<sup>3</sup> der angestrebte Nachweisbereich von wenigen µg/kg nicht erreicht werden kann, wurde die Überführung des Eluats in hydrophile Lösemittel getestet. Zunächst wurde versucht, das Eluat einzudampfen und den verbleibenden Rückstand mit polaren Lösemitteln wieder aufzunehmen. Hierbei zeigte sich aber, dass der ölige Rückstand unabhängig vom Lösemittel nicht komplett wieder

in Lösung gebracht werden konnte. Vielversprechender schien eine der SPE nachgeschaltete LLE mit DMSO. Zur Entwicklung einer Silica-SPE-Methode in Kombination mit einer LLE mit DMSO wurde zunächst der Einfluss verschiedener Elutionsmittel auf die Nachweisstärke der Kalibrierung sowie die Höhe der Wiederfindungsraten getestet. Praktikable Kalibrierungen wurden mit *n*-Hexan sowie DCM als Elutionsmittel erreicht (siehe Tab. 22).

**Tabelle 22:** Vergleich der Kalibrierparameter unter Einbeziehung der Extraktverdünnung bei Elution mit *n*-Hexan und Dichlormethan.

Elutionsmittel	Arbeitsbereich [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	$\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	LOD [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	minim. Extrakt- verdünnung
<i>n</i> -Hexan	1.99 - 18.20	$6.02 \pm 1.48$	1.77	1:6.25
Dichlormethan	16.99 – 216.67	$60.68 \pm 7.24$	6.82	1:25

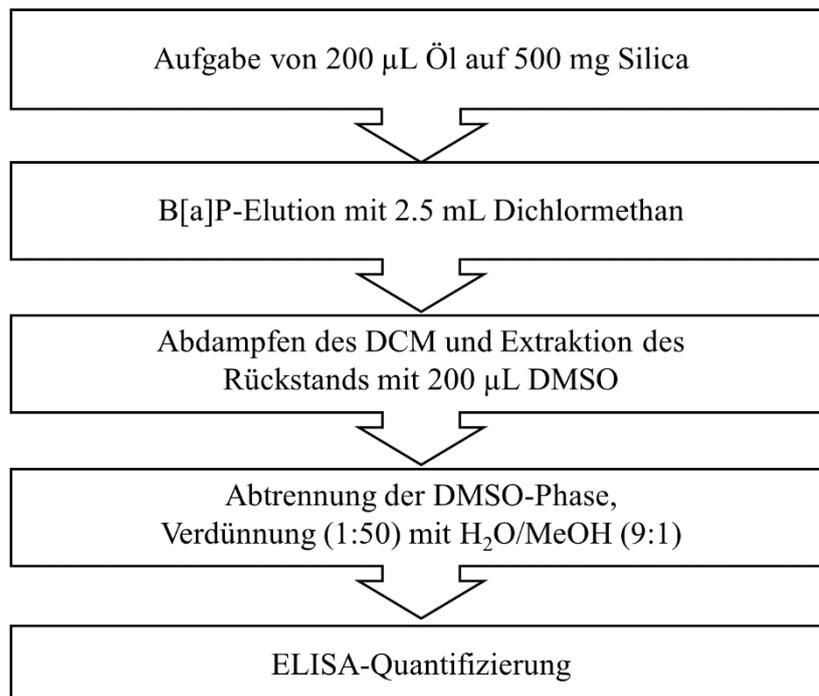
Als Verdünnungsfaktor in Wasser/MeOH (9:1) wurde die minimal mögliche Verdünnung gewählt, mit der die Erstellung einer Kalibrierfunktion noch möglich war. Sowohl hinsichtlich der Verdünnungsfaktoren, die als Hinweis auf den Restgehalt an Matrix im Eluat angesehen werden können, als auch der damit verbundenen Nachweisstärke zeigte sich eine Elution mit Hexan der DCM-Elution überlegen. Ein erster Test der Wiederfindungsraten mit beiden Elutionsmitteln, d. h. der Elutionskraft beider Lösemittel für B[a]P, erfolgte durch Extraktion von drei in einem breiten Konzentrationsbereich aufgestockten Ölproben und Vergleich der im ELISA erhaltenen Absorptionen. Diese sind für beide Lösemittel in Tabelle 23 dargestellt.

**Tabelle 23:** Absorptionen für drei aufgestockte B[a]P-Konzentrationen bei Elution mit *n*-Hexan bzw. Dichlormethan.

B[a]P [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	B[a]P [ $\mu\text{g}/\text{L}$ ]	Absorption [a.u.]	
		Hexan	DCM
10	0.4	$1.19 \pm 0.12$	$1.75 \pm 0.34$
75	3	$0.89 \pm 0.13$	$0.63 \pm 0.11$
250	10	$1.03 \pm 0.36$	$0.33 \pm 0.08$

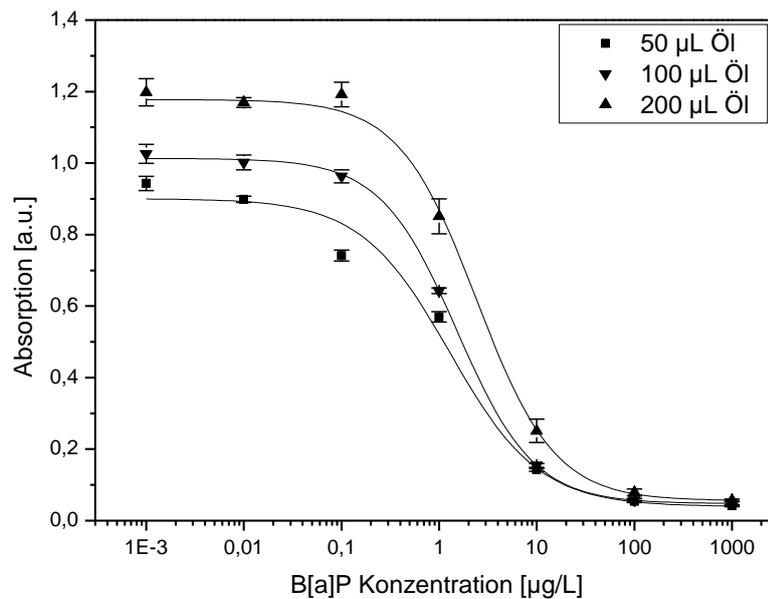
Für Hexan kann kein signifikanter Signalunterschied zwischen den drei Konzentrationen beobachtet werden. Weiterhin liegen alle drei Werte deutlich über den Absorptionen, die typischerweise für die untere Asymptote der Kalibrierkurven erreicht werden ( $< 0.50$  a.u.),

wodurch eine Lage oberhalb des linearen Konzentrationsbereichs nicht plausibel ist. Eine Elution von B[a]P von der Silica-Säule erfolgt damit wohl entweder gar nicht oder nur in sehr limitiertem Ausmaß. Ein Vergleich der Signalwerte von DCM zeigt den erwarteten Abfall mit zunehmender B[a]P-Konzentration auf ein Minimum, das mit 0.33 a.u. auch im erwarteten Signalbereich der unteren Asymptote liegt. Mit DCM konnte also eindeutig eine zunehmende B[a]P-Konzentration im Eluat detektiert werden, was mit n-Hexan nicht möglich war. Somit war bereits dieser erste Test zum Ausschluss von n-Hexan als Elutionsmittel ausreichend.



**Abbildung 44:** Schematische Darstellung der entwickelten SPE-Methode.

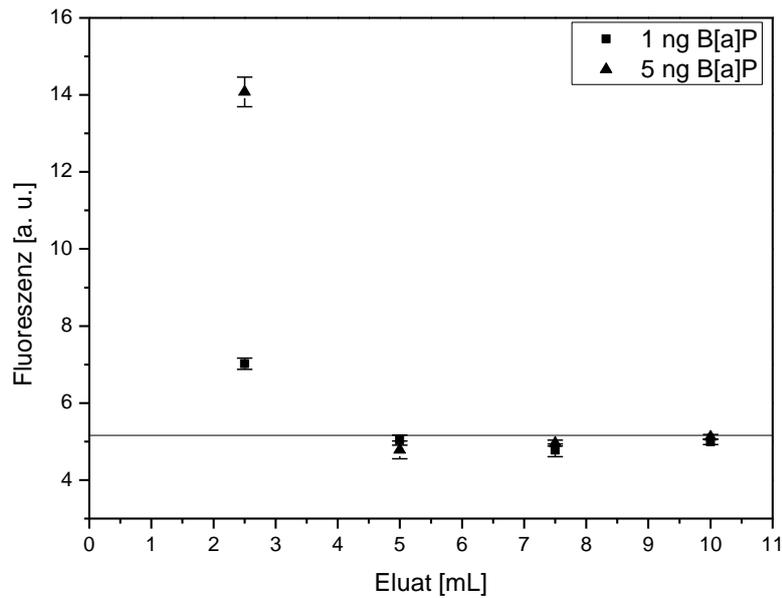
Um den Nachweisbereich bei Verwendung von DCM als Elutionsmittel weiter zu senken, wurden systematisch sämtliche Parameter der Extraktionsmethode optimiert. Zunächst wurde das maximal mögliche Probenvolumen bei Verwendung von 500 mg Silica pro Säule ermittelt, um einerseits die Kosteneffektivität zu erhöhen, andererseits aber keine zu hohen Verluste bezüglich der Nachweisstärke hinnehmen zu müssen. Da die ersten Tests mit einem Probenvolumen von 100 µL sehr erfolgreich durchgeführt werden konnten, wurden vier Volumina zwischen 50 und 500 µL auf ihren Einfluss auf den Testmittelpunkt getestet. Da mit 500 µL bereits ein Durchbruch der Probe erfolgte, konnten nur für die übrigen drei Volumina Kalibrierkurven erstellt werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 45 dargestellt.



**Abbildung 45:** Einfluss des Probenvolumens auf die Kalibrierkurven ( $n = 8$ ,  $m = 3$ ).

Wie erwartet konnte mit zunehmendem Probenvolumen eine Erhöhung des Testmittelpunkts beobachtet werden. Mit  $2.43 \mu\text{g/L}$  bei  $200 \mu\text{L}$  Probe lag dieser aber nur um etwa einen Faktor 1.6 über dem Testmittelpunkt, der mit  $100 \mu\text{L}$  Probe erhalten wurde. Der leichte Verlust an Nachweisstärke wurde aufgrund des doppelten Probenvolumens in Kauf genommen und die folgenden Versuche mit  $200 \mu\text{L}$  Probe durchgeführt.

Nachdem in den ersten Versuchen  $10 \text{ mL}$  DCM zur Elution verwendet worden waren, um eine vollständige Elution sicherzustellen, sollte das Eluatvolumen nun reduziert werden, um den Lösemittelverbrauch so gering wie möglich zu gestalten. Dazu wurde B[a]P in Hexan in zwei verschiedenen Konzentrationen auf die Säule gegeben und die Säule anschließend getrocknet. Das gebundene B[a]P wurde schrittweise mit  $2.5\text{-mL}$ -Fraktionen DCM eluiert und die B[a]P-Konzentration fluorimetrisch bestimmt (Abb. 46). Es wurde beobachtet, dass B[a]P nur in den ersten  $2.5 \text{ mL}$  nachgewiesen werden konnte, während die übrigen Fraktionen für beide Konzentrationen nicht signifikant vom Blindwert verschieden waren. Daher konnte von einer kompletten Elution innerhalb der ersten  $2.5 \text{ mL}$  ausgegangen werden, wodurch der Lösemittelverbrauch der Elution um  $75 \%$  gesenkt werden konnte.



**Abbildung 46:** B[a]P-Elution mit unterschiedlichen Volumina Dichlormethan ( $m = 3$ ). Die durchgezogene Linie stellt den Blindwert dar.

Nach der Elution sollte das Eluatvolumen so weit wie möglich verringert werden, um einen möglichst lösemittelfreien Extrakt zu erhalten, der dann mit gleichem Volumen an DMSO weiter extrahiert werden konnte. Es stellte sich jedoch heraus, dass bei Verwendung von DCM als Elutionsmittel die zunehmende Viskosität der Lösung aufgrund zunehmenden Matrixanteils eine Reduktion des Extraktvolumens nur etwa bis zum Volumen der aufgegebenen Ölprobe ermöglichte. Eine Aufkonzentrierung der Probe konnte auf diesem Weg nicht erfolgen. Somit wurde in der Folge auf dieses minimale Extraktvolumen eingengt und dieses dann mit DMSO extrahiert.

Für die Verdünnung des DMSO-Extrakts mit Wasser/MeOH (9:1) sollte ein Faktor gewählt werden, der möglichst niedrig ist, um eine zu hohe Verdünnung des Analyten zu verhindern, die dann eventuell außerhalb des messbaren Konzentrationsbereichs liegt. Andererseits wird bei zu geringer Verdünnung eine Verschlechterung der Nachweisstärke aufgrund von Matrixeinflüssen zu beobachten sein, was ebenfalls unerwünscht war. Bei der Entwicklung der beschriebenen Methode wurden verschiedene Extraktverdünnungen auf ihren Einfluss auf die Nachweisstärke untersucht (Tab. 24). Dabei konnten mit einer Verdünnung von 1:50 auch nach Einberechnung des Verdünnungsfaktors die niedrigsten Testmittelpunkte erreicht werden.

**Tabelle 24:** Optimierung der Extraktverdünnung in Wasser/Methanol (10 %) für eine möglichst hohe Nachweisstärke.

Verdünnung	IC <sub>50</sub> [µg/L]	IC <sub>50</sub> [µg/kg]	Arbeitsbereich [µg/kg]	LOD [µg/kg]
1:12.5	--	--	--	--
1:25	2.61 ± 0.44	65.29 ± 10.88	3.34 – 1277.58	9.29
1:50	1.24 ± 0.03	61.95 ± 1.50	15.59 – 246.10	9.15

Schließlich wurden die Bedingungen des ELISA variiert, um möglichst niedrige Testmittelpunkte zu erreichen. Dabei ist speziell die Variation der Verdünnungen des B[a]P-BSA-Konjugats sowie des anti-B[a]P-Antikörpers entscheidend. Typischerweise erlauben höhere Verdünnungen eine Detektion in kleineren Konzentrationsbereichen, allerdings nimmt damit auch das Maximalsignal ab. Die Ergebnisse aus einer Variation beider Parameter und dem Einfluss auf den IC<sub>50</sub>-Wert sind in Tabelle 25 dargestellt.

**Tabelle 25:** Optimierung der ELISA-Bedingungen.

Konjugat-Verdünnung	Antikörper-Verdünnung	IC <sub>50</sub> [µg/L]	Arbeitsbereich [µg/L]
1:10000	1:1000	2.27 ± 0.34	0.63 – 8.23
1:5000	1:2500	1.27 ± 0.17	0.12 – 13.25
1:5000	1:5000	0.99 ± 0.20	0.05 – 18.32

Hierbei zeigt vor allem die Antikörperverdünnung einen deutlichen Einfluss auf den Testmittelpunkt. Prinzipiell wird bei einer Verdünnung von 1:5000 der niedrigste Wert erreicht. Dieser ist jedoch mit einem relativ schwachen Maximalsignal verbunden, was unter anderen in der hohen Unsicherheit des IC<sub>50</sub>-Werts zum Ausdruck kommt. Daher schien diese Antikörperverdünnung für eine zuverlässige Quantifizierung ungeeignet und es wurde eine Verdünnung von 1:2500 gewählt in Verbindung mit einer Konjugatverdünnung von 1:5000.

Mit der so optimierten Methode wurden nun aufgestockte Ölproben von Olivenöl und Sonnenblumenöl extrahiert und mittels ELISA quantifiziert (Tab. 26). Für Olivenöl wurden hier Wiederfindungsraten zwischen 56 und 124 % beobachtet, während für Sonnenblumenöl tendenziell Überbestimmungen der aufgestockten Konzentrationen gemessen wurden. Hier reichten die Wiederfindungsraten von 100 bis 170 %.

**Tabelle 26:** Wiederfindungsraten für aufgestockte Oliven- und Sonnenblumenölproben.

aufgestockte Konzentration [µg/kg]	Olivenöl		Sonnenblumenöl	
	gemessene Konz. [µg/kg]	Wiederfindung [%]	gemessene Konz. [µg/kg]	Wiederfindung [%]
25	30.89 ± 1.27	124	42.62 ± 2.21	170
50	48.15 ± 1.55	96	50.21 ± 1.55	100
75	42.34 ± 2.12	56	101.71 ± 3.86	136

## **IV Zusammenfassung und Ausblick**

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung und Charakterisierung von Antikörperfragmenten von anti-Benzo[a]pyren-Antikörpern zur Gewinnung von Einkristallen des Hapten-Antikörper-Komplexes für eine Strukturbestimmung mittels Röntgenkristallographie. Hierbei wurden Fab-Fragmente verwendet, die durch enzymatische Spaltung kompletter Maus-IgGs oder auf gentechnischem Weg hergestellt wurden. Darüber hinaus wurde mit den vorliegenden monoklonalen anti-B[a]P-Antikörpern ein Verfahren zum Nachweis von B[a]P in Speiseölen im gesetzlich relevanten Konzentrationsbereich von wenigen  $\mu\text{g}/\text{kg}$  entwickelt. Dabei wurden zur B[a]P-Extraktion molekular geprägte Polymere verwendet, für deren Herstellung auf den Einsatz von B[a]P selbst verzichtet werden konnte. B[a]P, das zur Klasse der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) gehört, stellt einen der toxischsten Vertreter dieser Klasse dar, die bei allen Arten von Verbrennungsprozessen durch unvollständige Verbrennung organischen Materials gebildet wird. Vor allem seine starke kanzerogene Wirkung ist seit Langem bekannt, was B[a]P zu dem am intensivsten untersuchten und am besten charakterisierten PAK macht. Daher und aufgrund seines hohen Gefährdungspotentials wird B[a]P oft als Indikator für die allgemeine PAK-Belastung herangezogen und ist mit mehreren gesetzlichen Grenzwerten belegt. In der EU sind neben dem extrem niedrigen Grenzwert von 10 ng/L in Trinkwasser auch in verschiedenen, meist fetthaltigen Lebensmitteln strenge Grenzwerte für B[a]P festgelegt. Einer der niedrigsten gilt für Speiseöle, wo als Höchstmenge 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  festgelegt sind. Aufgrund hoher Matrixtoleranz in Verbindung mit niedrigen Nachweisgrenzen sowie kurzen Analysezeiten stellen immunanalytische Verfahren eine sinnvolle Alternative zu den routinemäßig durchgeführten chromatographischen Methoden dar. Entscheidend ist dabei eine hohe Affinität der verwendeten Antikörper zum Analyten, die in aller Regel auf starken polaren Wechselwirkungen des Antikörpers mit dem Analyten beruht. Das komplette Fehlen polarer funktioneller Gruppen bei B[a]P macht eine tiefergehende Charakterisierung der Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen von bereits erfolgreich hergestellten, hochaffinen anti-B[a]P-Antikörpern interessant.

Ein detaillierter Einblick in die Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen kann durch die Aufklärung der Kristallstruktur des Antikörper-Hapten-Komplexes gewonnen werden. Da die Herstellung hochgeordneter Einkristalle mit kompletten Antikörpern aufgrund ihrer Größe und der damit verbundenen strukturellen Flexibilität der einzelnen Untereinheiten sehr schwierig ist, werden hierfür alternativ oftmals Fab-Fragmente verwendet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten hierfür zunächst durch enzymatische Spaltung des monoklonalen

Maus-Antikörpers 22F12 mit Papain Fab-Fragmente gewonnen werden. Da die Rate der enzymatischen Spaltung in Abhängigkeit vom eingesetzten Antikörper stark schwankt, wurde, um optimale Ausbeuten zu erreichen, zunächst die Spaltungsdauer optimiert. Hierbei erwiesen sich längere Reaktionszeiten von mindestens 20 h als optimal. Neben der Vollständigkeit der Spaltung ist zur erfolgreichen Kristallisation aber auch eine hohe Reinheit der hergestellten Fragmente entscheidend. Eine vollständige Abtrennung der als Nebenprodukt entstehenden Fc-Fragmente konnte mit Protein A-Säulen im *gravity-flow*-Modus nicht erreicht werden, so dass diese extern mittels FPLC durchgeführt werden musste. Nachdem auf diesem Weg eine gute Reinheit des Fab-Fragments erreicht werden konnte, wurde dieses auf seine Affinität sowie Selektivität gegen B[a]P getestet. Dies erfolgte mittels klassischem ELISA, wobei die erhaltenen Kalibrierkurven mit denen des kompletten IgG verglichen wurden, um eventuelle Affinitätsverluste feststellen zu können. Nach Optimierung der Assay-Bedingungen wurde für den Fab ein Testmittelpunkt von etwa 0.4 µg/L erhalten. Verglichen mit dem kompletten IgG war dieser um etwa den Faktor zwei höher. Der zusätzlich durchgeführte Vergleich mit einem rekombinant hergestellten scFv-Fragment mit gleicher Antigenbindestelle, das IC<sub>50</sub>-Werte von etwa 2 µg/L liefert, zeigt jedoch, dass insgesamt eine gute Übereinstimmung der Antigenbindung des Fab mit der des kompletten Antikörpers angenommen werden konnte. Auch bezüglich der Kreuzreaktivitäten wurden größtenteils übereinstimmende Werte für komplettes IgG und Fab-Fragment gefunden, während sich beim scFv deutliche Abweichungen zeigten. Damit schien das hergestellte Fab-Fragment gut geeignet für Röntgenkristallographieversuche. Da eine vollständige Homogenität enzymatisch hergestellter Fab-Fragmente aufgrund meist mehrerer Schnittstellen in aller Regel nicht gewährleistet ist, wurden darüber hinaus in Kooperation mit Prof. Skerra vom Lehrstuhl für Biologische Chemie der TUM rekombinante Fab-Fragmente hergestellt und charakterisiert. Im Zuge der Sequenzanalyse wurde ein freier Cystein-Rest in der CDR2 der schweren Kette wegen seiner chemischen Labilität als problematisch eingestuft, so dass an dieser Stelle eine Mutation eingeführt wurde und Cystein gegen Alanin, Methionin, Serin, Threonin, Tyrosin und Valin ausgetauscht wurde. Die sechs hergestellten Mutanten wurden hinsichtlich ihrer Affinität mittels ELISA und SPR untersucht und mit dem Wildtyp-Fab verglichen. Die ELISA-Messungen zeigten für alle Fabs Testmittelpunkte in einem engen Konzentrationsbereich zwischen 0.22 und 0.34 µg/L und da auch die Kurvenverläufe aller Fabs gut übereinstimmten, konnte kein Hinweis auf eine Beeinflussung der Affinität durch den Austausch des Cystein gefunden werden. Auch die zusätzlich

durchgeführten SPR-Messungen ergaben keine signifikanten Affinitätsunterschiede innerhalb der hergestellten Fabs und eine gute Übereinstimmung der Mutanten mit dem nichtmutierten Fragment. Die erhaltenen Affinitätskonstanten aller Fabs lagen in einem Bereich von 2.4 bis  $7.0 \text{ M}^{-1}$ , was im Rahmen der Messungengenauigkeit des verwendeten Biacore-Systems keinen Hinweis auf signifikant unterschiedliche Affinitäten gibt. Die Aminosäure an Position 60 innerhalb der schweren Kette scheint also keinen wesentlichen Einfluss auf die Antigenbindung zu besitzen. Zur Kristallisation ausgewählt wurde aufgrund guter Produktionsraten Fab C60Y. In der Herstellung von Einkristallen des Fab-B[a]P-Komplexes erwies sich die sequentielle Homogenität der rekombinant hergestellten Fabs als vorteilhaft. So konnten mit den enzymatisch hergestellten Fabs keine Kristalle von ausreichend aufgelöster Röntgenstreuung hergestellt werden, während dies mit den rekombinant hergestellten Fragmenten gelang. Da die Auswertung der hierzu erhaltenen Daten noch aussteht, kann darüber keine abschließende Aussage getroffen werden.

Neben der Charakterisierung der Antigenbindung sollten auch die analytischen Nachweisverfahren mit anti-B[a]P-Antikörpern weiter ausgebaut werden. Daher wurde eine immunologische B[a]P-Quantifizierung in Speiseölen getestet, die aufgrund der komplexen Matrixzusammensetzung der Öle sowie der geringen Toleranz von Antikörpern gegenüber unpolaren Medien eine besondere Herausforderung darstellte. Zur Extraktion von B[a]P wurde daher eine möglichst spezifische und in wenigen Schritten durchführbare Methode favorisiert. Für Wasserproben war eine solche Methode bereits erfolgreich auf der Basis von molekular geprägten Polymeren (MIPs) angewandt worden, die durch radikalische Polymerisation von 4-Vinylpyridin mit Divinylbenzol unter Verwendung von B[a]P als Templat hergestellt werden können. Um die Polymerproduktion einfacher und kostengünstiger zu gestalten, sollte statt B[a]P mit strukturell ähnlichen, aber besser verfügbaren und weniger toxischen PAKs geprägt werden. Hierfür wurde eine Mischung aus Phenanthren und Pyren verwendet, die in Summe alle relevanten Strukturmerkmale von B[a]P wiedergeben. In einem ersten Schritt musste die Zusammensetzung des PAK-Gemischs variiert werden, um eine möglichst hohe Bindekapazität für B[a]P zu erreichen. Dazu wurden Polymere mit Phenanthren- bzw. Pyrenanteilen zwischen 0 und 100 % hergestellt, wobei die Summenkonzentration beider PAKs stets konstant bei 0.2 mmol gehalten wurde. Für alle hergestellten Polymere wurde die maximale Bindekapazität  $Q$  ermittelt, wobei gute Bindekapazitäten für ein Verhältnis von Phenanthren zu Pyren von 3:5 erhalten werden konnten. Im Vergleich mit einem nichtgeprägten Polymer wurde eine doppelt so hohe Menge

an B[a]P durch das MIP gebunden. Zur vollständigen Entfernung der Template wurden die Polymere in mehreren Schritten zunächst mit Dichlormethan und anschließend mit Acetonitril im Ultraschallbad gewaschen. Mittels Fluoreszenzspektroskopie konnte ein nahezu vollständiges Auswaschen der Template bestätigt werden. Mit dem so hergestellten Polymer wurde nun eine Extraktionsmethode entwickelt, die aus den Schritten Probenaufgabe, Auswaschen der Matrix und schließlich Elution von B[a]P bestand. Bei der Probenaufgabe musste zur Verbesserung der Polymerbenetzung die Viskosität des Öls durch Lösemittelzugabe reduziert werden. Ein Test verschiedener Lösemittel ergab hierbei eine hohe B[a]P-Bindung bei Verwendung von n-Hexan im Verhältnis 1:1. Auch zur Elution wurden mehrere Lösemittel getestet, wobei eine schnelle und vollständige Elution mit 5 mL Dichlormethan erreicht wurde. Eine möglichst geringe Matrixkonzentration im Extrakt wurde durch Waschen der Säule mit n-Hexan und anschließend mit Isopropanol erreicht, wobei keine Elution von B[a]P beobachtet wurde. Um die Matrixkonzentrationen im Extrakt weiter zu reduzieren, wurde der MISPE schließlich eine LLE mit Acetonitril vorgeschaltet. Zur Messung mittels ELISA wurde das Eluat einer Probe von 1.5 mL Öl in 750 µL DMSO überführt, das dann mit Wasser/Methanol (10 %) im Verhältnis 1:100 verdünnt wurde. Nach Optimierung der ELISA-Bedingungen wurden in Speiseölen unterschiedlichster Matrixzusammensetzung erfolgreich Kalibrierungen durchgeführt, deren Messbereich mit LODs zwischen 0.6 und 1.6 µg/kg den gesetzlichen Grenzwert von 2 µg/kg für alle getesteten Öle einschloss. Mit selbst aufgestockten Ölproben verschiedener Provenienz konnten mit Wiederfindungsraten zwischen 63 und 114 % gute Ergebnisse erzielt werden. Allerdings können in Abhängigkeit von der Anwesenheit kreuzreagierender PAKs Überbestimmungen von B[a]P nicht ausgeschlossen werden. So sind bei festgestellter Grenzwertüberschreitung weitergehende chromatographische Kontrollanalysen erforderlich.

## **V Experimenteller Teil**

## **1 Geräte und Verbrauchsmaterialien**

### **1.1 Geräte**

#### **Elektrophorese**

Elektrophoresekammer und -träger (Appligene, Watford, UK)

Gelaufnahmen: Gel documentation system G:BOX (Syngene, Cambridge, USA),

Digital Graphic Printer UP-D897 (Sony)

Mini PROTEAN® Cell (BioRad, Hercules, USA)

PowerPac Basic Power Supply (BioRad, Hercules, USA)

#### **ELISA**

Auslesegerät Synergy HT (BioTek, Bad Friedrichshall)

Schüttler Easyshaker EAS 2/4 (SLT, Crailsheim)

Waschautomat ELx 405 Select (BioTek, Bad Friedrichshall)

#### **Kristallographie**

Cooled Incubator Series 3000 RUMED (Rubarth Apparate, Laatzen)

Phoenix Liquid Handling System (Art Robbins Instruments, Sunnyvale, USA)

Quick Combi Sealer Plus (HJ-Bioanalytik, Mönchengladbach)

Stereomikroskop SZX10/KL1500LCD (Olympus, Tokyo)

#### **MALDI-TOF**

Ultraflex TOF/TOF, N<sub>2</sub>-Laser, 337 nm, positiv Modus (Bruker-Daltonics, Bremen)

#### **Oberflächenplasmonenresonanz**

Biacore X100 (GE Healthcare, Freiburg)

#### **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**

ATR-FTIR-Spektrometer Nicolet 6700 (Fisher Scientific GmbH, Schwerte)

Fluorimeter RF-5301PC (Shimadzu, Duisburg)

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

Reinstwasseranlage Milli-Q plus 185 (Millipore, Eschborn)

Schüttelinkubator C24KC (Edison, NJ, USA)

Thermoblock TB1 (Biometra, Göttingen)

Trockenschrank 20-250 °C (Memmert, Büchenbach)

Ultraschallbad Sonorex Super RK106 (Bandelin, Berlin)

UV/Vis-Spektrometer Specord 250 Plus (Analytik Jena, Jena)

Vortexer TopMix FB1 5024 (Fisher Scientific, Schwerte)

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**

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

Gen5 (BioTek, Bad Friedrichshall)

Omic 8.0 (Thermo Fisher Scientific, Bremen)

Win Aspect Plus (Analytik Jena, Jena)

## **1.3 Antikörper und Antigene**

Monoklonaler Antikörper gegen Benzo[a]pyren 22F12 (Institut für Wasserchemie, München)

Monoklonaler Antikörper gegen Benzo[a]pyren 5G1 (Institut für Wasserchemie, München)

Monoklonaler Antikörper gegen Benzo[a]pyren 25C8 (Institut für Wasserchemie, München)

Monoklonaler Antikörper gegen Benzo[a]pyren 10E9 (Institut für Wasserchemie, München)

Monoklonaler Antikörper gegen Benzo[a]pyren 3B5 (Institut für Wasserchemie, München)

Monoklonaler Antikörper gegen Hexa-His konjugiert mit Peroxidase (Sigma-Aldrich, Steinheim)

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

Ziege-Anti-Maus IgG-Fab, HRP-markiert, affinitätsgereinigt (Bethyl, Montgomery, USA)

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

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

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

15 (+1) EU PAKs, einzeln, fest (PAH Research Institute, Greifenberg)

8-Benzo[a]anthracen-Buttersäure (PAH Research Institute, Greifenberg)

6-Chrysen-Buttersäure (PAH Research Institute, Greifenberg)

3-Fluoranthren-Buttersäure (PAH Research Institute, Greifenberg)

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

## 1.4 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

### Matrices

Erdnussöl (4003247104155, Fauser Vitaquell, Hamburg)

Extra virgin Rotes Palmöl (5425013641531, Noble-House, Brasschaat, BEL)

Kokosöl nativ (4003247101802, Fauser Vitaquell, Hamburg)

Leinöl kaltgepresst (4005009102997, Bio-Zentrale GmbH, Ulbering)

Natives Olivenöl extra (Olivenöl 1; 4005009102973, Bio-Zentrale GmbH, Ulbering)

Natives Olivenöl extra (Olivenöl 2; 400540100419, Peter Kölln KGaA, Elmshorn)

Sonnenblumenöl (4005009102966, Bio-Zentrale GmbH, Ulbering)

Traubenkernöl (4003247103967, Fauser Vitaquell Hamburg)

### Materialien

Biacore X100: BIA Maintenance Kit (BR-1006-66, GE Healthcare, Freiburg)

HBS EP+ Puffer (BR-1008-26, 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)

Crystal Clear Sealing Tape (Hampton, Aliso Viejo, USA)

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

Einmalspritze, 10 mL (0058.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Einmalspritze, 5 mL (0057.1, Carl Roth, Karlsruhe)

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

Einmal-Kanüle, 0.80 x 120 mm (C630.1, Carl Roth, Karlsruhe)  
Faltenfilter (595.5, Schleicher & Schüll, Dassel)  
Fritten, PTFE, Porosität 10 µm (Merck Millipore, Darmstadt)  
Handschuhe, Nitril (P778.1, Carl Roth, Karlsruhe)  
Intelli-Plate 96-Well (Art Robbins Instruments, Sunnyvale, USA)  
Kanülen, steril, 0.8 x 120 (C630.1, Carl Roth, Karlsruhe)  
Kunststoffküvetten für UV/Vis Spektroskopie (Y199.1, Carl Roth, Karlsruhe)  
Mikrotiterplatten, 96-well, flacher Boden, hohe Bindungskapazität (655061, Greiner, Frickenhausen)  
Mikrotiterplatten, 96-well, flacher Boden, niedrige Bindungskapazität (655061, Greiner, Frickenhausen)  
NAb Protein A Spin Column, 1 ml (89978, Thermo Fisher, Bremen)  
Parafilm (H666.1, Carl Roth, Karlsruhe)  
Pasteurpipetten (4522, Carl Roth, Karlsruhe)  
Pipettenspitzen 0.1 – 10 µL, weiß (K138.1, Carl Roth, Karlsruhe)  
Pipettenspitzen 1 – 200 µL, gelb (B007.1, Carl Roth, Karlsruhe)  
Pipettenspitzen 100 – 1000 µL, blau (2679.1, Carl Roth, Karlsruhe)  
Probefläschchen, 4 mL (E155.1, Carl Roth, Karlsruhe)  
Reaktionsgefäße 1.5 mL (4190.1, Carl Roth, Karlsruhe)  
Rollrandgläser, 10 mL (X655.1, Carl Roth, Karlsruhe)  
Verschlussfilm für Mikrotiterplatten (EN76.1, Carl Roth, Karlsruhe)  
Zeba Spin Desalting Columns, 2 mL (89889, Thermo Scientific, Bremen)  
Zentrifugenröhrchen PP, 50 mL, unsteril (AN78.1, Carl Roth, Karlsruhe)  
Zentrifugenröhrchen PP, 15 mL, unsteril (AN76.1, Carl Roth, Karlsruhe)  
ZipTip, C<sub>4</sub> Pipettenspitzen (Millipore, Molsheim, Frankreich)

### **Chemikalien**

Aceton (179973, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Acetonitril (34998, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Argon 4.6 (Air Liquide, München)  
Azo-bis-(isobutyronitril) (11630, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Bromphenolblau (B0126, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Casein (C5890, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Coomassie Brilliant Blue R250 (27816, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
 $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure (C2020, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
L-Cystein (30089, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Dichlormethan, *anhydrous* (270997, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Dichlormethan (34856, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
*N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (36650, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Dikaliumhydrogenphosphat (60220, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
*N,N'*-Dimethylformamid (40258, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Dimethylsulfoxid (41647, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Dinatriumhydrogenphosphat (71633, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Dioxan (42510, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Divinylbenzol (414565, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Essigsäure (320099, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Ethanol (34852, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Ethanolamin (411000, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Ethylacetat (439169, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Glycerin (G9012, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Glycin (G6201, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Hexan (270504, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
N-Hydroxysuccinimid (56480, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Immobilisiertes Papain (20341, Thermo Scientific, Bremen)  
Isopropanol (34863, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Kaliumdihydrogencitrat (60214, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Kaliumdihydrogenphosphat (04248, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Kaliumsorbit (85520, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
2-Mercaptoethanol (Serva, Heidelberg)  
Methanol (34966, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Natriumacetat (S8750, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Natriumazid (S2002, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Natriumcarbonat (71628, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Natriumchlorid (13565, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Natriumdodecylsulfat (71728, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat, Dihydrat (E6635, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Natriumhydrogencarbonat (71628, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Natriumhydroxid (S8045, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Natriumsulfat (238597, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Phenanthren (P11409, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Protein Crystallization Screening Suites (QIAGEN, Hilden)  
Pyren (82648, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Rinderserumalbumin (A3059, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Roti-Mark STANDARD (14-200 kDa) Carl Roth (Karlsruhe)  
Saccharose (84097, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
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)  
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (860336, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Tetrahydrofuran (186562, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Trizma® Base, (T62200, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Tween 20 (8.17072, Merck, Darmstadt)  
4-Vinylpyridin (V3204, Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Wasserstoffperoxid, 30 % (31642, Sigma-Aldrich, Steinheim)

## **1.5 Pufferlösungen**

Für sämtliche Puffer wurde UV-Licht-vorbehandeltes Reinstwasser verwendet.

### **Auftragspuffer SDS-PAGE**

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 7.27 g  
Glycerin, 300 mL  
Saccharose, 100 g  
SDS, 50 g  
2-Mercaptoethanol, 30 mL  
Bromphenolblau, 0.2 g  
Dest. Wasser, ad 1000 mL

### **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)**

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.59 g

NaHCO<sub>3</sub>, 2.93 g

NaN<sub>3</sub>, 0.2 g

Dest. Wasser, ad 1000 mL

#### **Coomassie-Brillantblau SDS-PAGE**

Coomassie Brilliant Blue R250, 0.5 g

Essigsäure, 100 mL

Isopropanol, 250 mL

Dest. Wasser, ad 1000 mL

#### **Elutionspuffer Fc-Fragmente (pH 2-3)**

Glycin, 7.51 g

Dest. Wasser, ad 1000 mL

#### **Entfärbungslösung SDS-PAGE**

Essigsäure, 50 mL

Dest. Wasser, 450 mL

#### **Kopplungspuffer Proteinkonjugate (pH 7.5)**

NaHCO<sub>3</sub>, 5.96 g

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

#### **Laufpuffer SDS-PAGE (10x)**

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 30.29 g

Glycin, 144.13 g

SDS, 10 g

Dest. Wasser, ad 1000 mL

#### **Neutralisationspuffer Fc-Fragmente (pH 8-9)**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 165.47 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6.8 g

Dest. Wasser, ad 1000 mL

**Phosphatpuffer (PBS, pH 7.6)**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.36 g

$\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 12.2 g

$\text{NaCl}$ , 8.5 g

Dest. Wasser, ad 1000 mL

**Probenpuffer Papainreaktion (pH 7.0)**

$\text{Na}_2(\text{edta}) \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 3.722 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 3.560 g

Dest. Wasser, ad 1000 mL

**Regenerationspuffer SPR (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.

**Stopplösung ELISA (5 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$ )**

98 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 50 mL

Dest. Wasser, ad 1000 mL

**Substratlösung ELISA**

Substratpuffer, 25 mL

TMB-Stammlösung, 500  $\mu\text{L}$

$\text{H}_2\text{O}_2$  (1%), 100  $\mu\text{L}$

**Substratpuffer ELISA (pH 3.8)**

Kaliumdihydrogencitrat, 46.04 g

Kaliumsorbit, 0.10 g

Dest. Wasser, ad 1000 mL

**Tris/HCl-Puffer (pH 7.5)**

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 1.211 g

Dest. Wasser, ad 1000 mL, pH-Wert mit 4 M HCl eingestellt

**TMB-Stammlösung ELISA**

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

DMSO, 30 mL

**Verdaupuffer Papainreaktion (pH 7.0)**

Cystein·HCl·H<sub>2</sub>O, 3.513 g

Probenpuffer, ad 1000 mL, pH-Wert mit 20 M Natronlauge eingestellt

**Waschpufferkonzentrat ELISA (PBST-Konzentrat)**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.17 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 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

## 2 Standardprozeduren

### 2.1 Synthese von Hapten-Protein-Konjugaten

Zur Hapten-Buttersäure-Lösung (12.9 mM in trockenem Dioxan, 1 Äq.) wurden 200 µL einer Lösung von N-Hydroxysuccinimid (NHS, 0.29 M, 1.3 Äq.) in Dioxan und 250 µL einer Lösung von N,N'-Dicyclohexylarbodiimid (DCC, 0.19 M, 1.05 Äq.) in Dioxan gegeben und bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss 24 h bei 100 rpm geschüttelt. Anschließend wurde das auskristallisierte Nebenprodukt N,N'-Dicyclohexylharnstoff (farblose Kristalle) durch Zentrifugation bei 2196 g für 2 bis 3 min abgetrennt und 1.5 mL des Überstands wurden unter Eiskühlung zu 3.4 mL BSA in Kopplungspuffer (0.13 mM) gegeben. Die dabei entstandene Suspension wurde 2 h bei Raumtemperatur und 100 rpm geschüttelt. Die Aufreinigung der Konjugate erfolgte mittels Dialyse (Cellulose Membran, 21 mm) gegen Wasser. Zur Lagerung wurde das Produkt lyophilisiert und bei -20 °C aufbewahrt. Vor ihrer Verwendung wurden die BSA-Konjugate in coating-Puffer resuspendiert.

Die Kopplungsdichte wurde über MALDI-TOF-MS bestimmt. Hierzu wurden zur Entsalzung 25 µL Probe (1 mg/mL) zehn Mal mit C<sub>4</sub>-Säulen (ZipTip) 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 wurde BSA (10 mg/mL) in PBS verwendet.

### 2.2 Enzymatische Herstellung von Antikörperfragmenten

#### 2.2.1 Spaltung von Maus-IgG mit Papain

Zur Aufkonzentration wurden die Antikörperstammlösungen (1 mg/mL) gegen PBS (1:10 mit Wasser verdünnt) dialysiert und nach Lyophilisation in einem Zwanzigstel des Volumens der ursprünglich eingesetzten Lösung wieder mit Wasser gelöst. Die Antikörperkonzentration konnte so auf 20 mg/mL erhöht werden. Die anschließende Spaltung mit Papain sowie die Aufreinigung mit Protein A erfolgten im Wesentlichen nach der Anleitung des Fab Preparation Kit (Thermo Scientific). Dazu wurden 0.5 mL der konzentrierten Antikörperlösung zunächst mittels Entsalzungs-Zentrifugationskartuschen in frisch hergestellten Verdauopuffer umgepuffert und dann mit immobilisiertem Papain (0.5 mL einer 50 %igen Suspension) mindestens 5 h bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Nach dem Ende der

Reaktion wurden 1.5 mL Tris/HCl-Puffer zugegeben und das Enzym bei 21255 g für 4 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend durch Dialyse gegen PBS umgepuffert. Zur Abtrennung der Fabs aus dem Produktgemisch wurden Zentrifugationskartuschen mit immobilisiertem Protein A verwendet. Zu diesem wurde der Überstand der Papainreaktion gegeben und mindestens 10 min unter Schütteln inkubiert. Durch Zentrifugation wurde die Durchflussfraktion, in der die Fabs enthalten waren, gewonnen. Die Kartusche wurde anschließend zweimal mit je 1 mL PBS gewaschen und zentrifugiert und die Durchflussfraktionen vereinigt. Bei Bedarf wurde die Kartusche schließlich regeneriert, indem zunächst dreimal mit Elutionspuffer gespült wurde. Die im Eluat enthaltenen IgG und Fc-Fragmente wurden durch Zugabe von 100 µL Neutralisationspuffer für weitere Analysen stabilisiert. Zur vollständigen Regeneration wurde die Kartusche anschließend zweimal mit je 3 mL Elutionspuffer und dreimal mit je 3 mL gewaschen. Die Proteinkonzentrationen wurden UV/Vis-spektroskopisch bei 280 nm bestimmt unter der Annahme einer Absorption von 1.4 für eine Lösung von 1 mg/mL.

### **2.2.2 SDS-PAGE**

Zur gelelektrophoretischen Analyse der erhaltenen Fragmente wurden 10 µL Probe mit 2.5 µL Auftragspuffer gemischt, etwa 5 bis 10 min im Thermoblock aufgeköcht und zusammen mit einem Molgewichtsmarker (6 µL) auf vorgefertigte 15 %ige SDS-Gele gegeben. Die Elektrophorese wurde 50 bis 60 min in Laufpuffer bei einer Stromstärke von 25 mA pro Gel durchgeführt. Die Anfärbung erfolgte durch Schütteln in Coomassie-Färbelösung für etwa 30 min. Anschließend wurden die Gele für mindestens eine Stunde in Entfärbelösung geschüttelt und schließlich gescannt.

## **2.3 Fab-Charakterisierung**

### **2.3.1 Indirekt kompetitiver ELISA**

Die Mikrotiterplatten wurden mit 100 µL je Kavität einer Lösung von 10-B[a]P-BSA (Stammlösung 1 mg/mL) in Coatingpuffer in variierenden Verdünnungen beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach einem Waschschrift (dreimal mit je 300 µL PBST je Kavität, automatisch) wurde zum Blocken freier Bindestellen an der Oberfläche eine Stunde mit Blocklösung unter Schütteln bei 300 rpm und Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden für die Kompetition 50 µL Kalibrierlösung pro Kavität in die Mikrotiterplatte pipettiert. Zur Erstellung sigmoidaler Kalibrierkurven wurden Lösungen von

B[a]P in Konzentrationen zwischen 1000 und 0.0001 µg/L in Reinstwasser unter Zusatz 10 % Methanol verwendet. Dazu wurden je 50 µL einer mit PBS verdünnten Fab-Lösung gegeben, wobei die Fab-Verdünnungen variiert wurden, und es wurde eine Stunde bei Raumtemperatur und 100 rpm geschüttelt. Nach einstündiger Inkubation wurde erneut automatisch gewaschen. Danach wurden 100 µL einer in PBS verdünnten Lösung des jeweiligen HRP-markierten Sekundärantikörpers (siehe Kapitel III.1.3.2) zugegeben und wieder eine Stunde bei Raumtemperatur und 100 rpm inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Zugabe von je 100 µL Substratlösung Die Farbreaktion (Blaufärbung) wurde optisch überwacht und nach maximal 50 min gestoppt. Als Stopplösung wurden 100 µL 5 %ige Schwefelsäure verwendet. Anschließend wurde die Absorption bei 450 nm gemessen.

### **2.3.2 Bestimmung der Kreuzreaktivitäten**

Für den enzymatisch generierten Fab sowie den rekombinant hergestellten scFv mit gleicher Aminosäuresequenz wurde die Kreuzreaktivität gegenüber allen 16 EPA PAKs bestimmt. Für die Kreuzreaktivitätstests wurde der indirekt kompetitive ELISA verwendet (siehe Kapitel 2.3.1). Die Mikrotiterplatten wurden mit 10-B[a]P-BSA beschichtet und für die Kompetition wurde eine Verdünnungsreihe 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 eingesetzt. Die Konzentrationen des BSA-Konjugats (2 µg/mL bei Fab, 1 µg/mL bei scFv) bzw. der Antikörperfragmente (0.1 µg/mL Fab, 1 µg/mL scFv) wurden konstant gehalten. Der aus der Kalibrierkurve erhaltene IC<sub>50</sub>-Wert für die EPA PAKs wurde durch den IC<sub>50</sub>-Wert von Benzo[a]pyren dividiert und in Prozent angegeben.

### **2.3.3 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie**

Alle SPR-Messungen wurden im indirekten ELISA-Format mit dem Sensorchip CM 5 durchgeführt. Alle Messungen wurden bei 25 °C und einer Flussrate von 10 µL/min durchgeführt. Als Laufpuffer diente HBS EP+ (pH 7.4).

#### **Immobilisierung von 10-B[a]P-BSA**

Die Aktivierung der Chipoberfläche erfolgte mit einer frisch hergestellten 1:1-Mischung aus 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (0.4 M) und N-Hydroxysuccinimid (0.1 M), die für 7 min über den Chip geleitet wurde. Anschließend wurde eine Lösung von 10-B[a]P-BSA (0.01 mg/mL) in Natriumacetatpuffer (10 mM, pH 5) schrittweise über den Chip geleitet, bis keine weitere Signalzunahme mehr beobachtet werden konnte und damit eine

maximale Belegungsdichte erreicht war. Als reine Immobilisierungsdauer resultierten so 36.5 min. Schließlich wurde die Chipoberfläche mit 1 M Ethanolamin 7 min deaktiviert. Die Referenzflusszelle wurde wie die Messzelle aktiviert, anschließend wurde eine 0.01 mg/mL Lösung von BSA in Natriumacetatpuffer bis zur maximalen Belegung schrittweise über den Chip geleitet und dieser schließlich wieder mit Ethanolamin deaktiviert. Die Chips wurden bei 4 °C in EBS HP+ Puffer gelagert.

### Bestimmung der Affinitätskonstanten

Zur Bestimmung der Affinitätskonstanten wurden für jede Fab-Mutante Assoziations- und Dissoziationskurven für je drei verschiedene Konzentrationen aufgenommen. Die Konzentrationen sind in Tabelle 27 angegeben. Die Verdünnungen wurden dabei mit HBS EP+ hergestellt.

**Tabelle 27:** Verwendete Fab-Konzentrationen für die Bestimmung der Affinitätskonstanten.

<b>Fab</b>	<b>Konzentrationen [nM]</b>
C60A	100, 500, 1000
C60M	100, 500, 1000
C60S	100, 500, 1000
C60Y	88, 440, 880
C60V	100, 500, 1000
C60T	100, 500, 1000
Wildtyp	100, 500, 1000

Während der Assoziationsphase wurde die jeweilige Fab-Lösung für 4 min über den Chip geleitet. Unmittelbar darauf folgte eine Dissoziationsphase von 15 min, während der Chip mit Laufpuffer gespült wurde. Anschließend wurde der Chip 30 s regeneriert, wobei sich hierbei der Zusatz von einem Teil Wasser zu drei Teilen Regenerationspuffer bewährt hat. Zuletzt folgte eine Stabilisierungsphase von 5 min mit HBS EP+.

## 2.4 Kristallisation des Fab-B[a]P-Komplexes

Für die Kristallisation des Fab-Hapten-Komplexes des enzymatisch hergestellten Fab wurde zunächst der Komplex hergestellt. Dazu wurden je 25 µL einer 0.5 mg/mL-Lösung von B[a]P in Methanol bzw. Ethanol zu je 110 µL Antikörper gegeben und eine Stunde unter

horizontalem Schütteln bei 100 rpm und Raumtemperatur inkubiert. Das Screening der Kristallisationsbedingungen erfolgte mittels der *sitting drop*-Methode. Dazu wurden 0.2  $\mu\text{L}$  der Lösung mit 0.2  $\mu\text{L}$  der jeweiligen Reservoirlösung gemischt und in 96-well Kristallisationsplatten gegen 40  $\mu\text{L}$  Reservoirlösung äquilibriert. Die Platten wurden mit einer durchsichtigen Folie verschlossen und bei 20 °C mehrere Wochen inkubiert.

## 2.5 Herstellung molekular geprägter Polymere

In 4-mL-Schraubfläschchen wurde eine Lösung aus insgesamt 0.2 mmol Templat (Summe aus Pyren und Phenanthren) in 2.0 mL trockenem Dichlormethan hergestellt. Als optimales Templatverhältnis stellten sich 0.125 mmol Pyren und 0.075 mmol Phenanthren heraus. Nach der Zugabe von 105.1 mg (1.0 mmol) 4-Vinylpyridin wurde die Mischung bei 4 °C 30 min lang gekühlt. Danach wurden 651.0 mg (5.0 mmol) Divinylbenzol und 30 mg N,N'-Azobisisobutyronitril zugegeben, die Fläschchen im Eisbad gekühlt und für 5 min mit Stickstoff deoxygeniert. Zur Polymerisation wurden die Fläschchen im Thermoblock 24 h auf 60 °C erhitzt. Die resultierenden Polymerblöcke wurden zerkleinert, gemahlen und mit 63- und 125- $\mu\text{m}$ -Sieben der Größe nach fraktioniert. Zur Entfernung des Templats wurden die Polymerpartikel innerhalb dieses Größenbereichs 24 h unter leichtem Schütteln mit Dichlormethan gewaschen. Dieser Waschschrift wurde sechsmal wiederholt und danach wurden die Partikel mit Acetonitril dreimal für 15 min ins Ultraschallbad gestellt. Schließlich wurden die Partikel lyophilisiert und bei 4 °C gelagert.

## 2.6 Bestimmung der B[a]P-Bindekapazität

In einem 4-mL-Glasfläschchen wurden zu 10 mg MIP 0.5 mL B[a]P in Acetonitril in bekannter Konzentration gegeben und das Gemisch 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Filtration des Überstands wurde die B[a]P-Konzentration fluorimetrisch bestimmt ( $\lambda_{\text{ex}} = 297 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 405 \text{ nm}$ ) und die maximal gebundene Menge an B[a]P (Q) aus der Differenz zwischen ursprünglicher und gemessener B[a]P-Konzentration errechnet.

## 2.7 MIP-Selektivität

Die Selektivität der hergestellten MIPs für die 15(+1) EU PAKs wurde mittels GC/MS bestimmt. Zunächst wurde eine Lösung der PAKs (je 75  $\mu\text{g/L}$ ) in *n*-Hexan auf eine SPE-Säule mit 50 mg MIP gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Die gebundenen PAKs wurden

daraufhin mit 5 mL Dichlormethan eluiert, das Lösemittel abgezogen und der Rückstand in 1 mL *n*-Hexan wieder aufgenommen. Die PAK-Konzentrationen der Ausgangslösung sowie im Eluat wurden mittels GC/MS bestimmt, wobei die Messungen hierzu vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit durchgeführt wurden (Pschenitzka, 2014). Da nicht für alle PAKs eine Kalibrierung durchgeführt werden konnte, wurden aus den Peakverhältnissen von Eluat und Ausgangslösung relative Konzentrationswerte gebildet. Durch Division der relativen Konzentration jedes PAKs durch die von B[a]P und Multiplikation mit 100 % wurde die Selektivität berechnet.

## **2.8 Kreuzreaktivität des monoklonalen Antikörpers**

Die Kreuzreaktivität des monoklonalen anti-B[a]P-Antikörpers 22F12 gegenüber den 15(+1) EU PAKs wurde mittels dem bereits beschriebenen indirekt kompetitiven ELISA durchgeführt (siehe auch Kapitel 2.9.2). Zum Beschichten der Kavitäten wurde 10-B[a]P-BSA in einer Konzentration von 0.2 µg/mL verwendet. Alle PAK-Verdünnungsreihen wurden in Reinstwasser (mit 10 % Methanol) hergestellt und in äquimolaren Konzentrationen zu B[a]P eingesetzt. Der anti-B[a]P-Antikörper wurde in einer Konzentration von 0.2 µg/mL zugegeben. Die Kreuzreaktivität wurde berechnet, indem der aus der Kalibrierkurve erhaltene IC<sub>50</sub>-Wert für die EU PAKs durch den IC<sub>50</sub>-Wert von Benzo[a]pyren dividiert und in Prozent angegeben wurde.

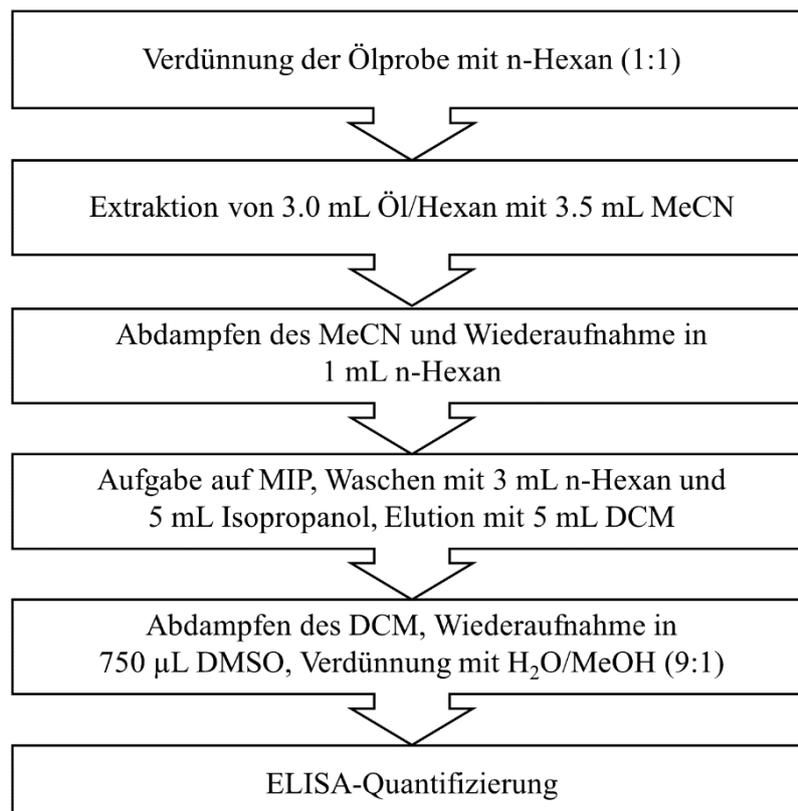
## **2.9 Quantifizierung von B[a]P in Speiseölen mittels MISPE**

### **2.9.1 Probenvorbereitung und Extraktion**

Vor der Festphasenextraktion mittels MIP-Säulen wurden die Ölproben durch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion vorextrahiert. Dazu wurden 1.5 mL Öl in ein Zentrifugenglas gegeben und mit 1.5 mL *n*-Hexan verdünnt. Nach Zugabe von 2.0 g trockenem Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde das Gemisch mit 3.5 mL Acetonitril extrahiert, wobei zunächst 30 s auf dem Vortexer und dann 5 min horizontal bei 100 rpm geschüttelt wurde. Zur besseren Phasentrennung wurde anschließend 5 min bei 2450 g und 4 °C zentrifugiert, danach die (obere) Acetonitrilphase abgetrennt und das Lösemittel bei 60 °C komplett abgedampft. Der verbleibende ölige Rückstand wurde in 1 mL *n*-Hexan aufgenommen und konnte so mittels MISPE extrahiert werden.

Zur Herstellung der MISPE-Säulen wurden 50 mg des trockenen Polymers in einer 3-mL-Glassäule zwischen zwei PTFE-Fritten gepackt. Vor der Probenaufgabe wurde die Säule mit

Dichlormethan gewaschen und mit 2.5 mL *n*-Hexan konditioniert. Dann wurde der Ölextrakt mit einer Flussrate von etwa  $0.1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  zugegeben und die Säule anschließend mit Luft getrocknet. Die Ölmatrix wurde mit 3 mL *n*-Hexan und 5 mL Isopropanol von der Säule gewaschen und danach wurde B[a]P mit 5 mL Dichlormethan eluiert. Das Eluat wurde bei  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  eingedampft und der Rückstand in 0.75 mL DMSO aufgenommen. Der Extrakt in DMSO wurde 1:100 mit 10 % Methanol in Wasser verdünnt und konnte so im ELISA gemessen werden (siehe Abb. 47).



**Abbildung 47:** Überblick über die entwickelte MISPE-Methode.

### 2.9.2 Indirekt kompetitiver ELISA

Die Mikrotiterplatten wurden mit 3-Fluoranthenyl-BSA (Stammlösung  $1 \text{ mg/mL}$ , 1:15000 in Coatingpuffer verdünnt,  $100 \text{ } \mu\text{L}$  je Kavität) beschichtet und bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  über Nacht inkubiert. Nach dem automatischen Waschschrift wurde mit  $300 \text{ } \mu\text{L}$  Blocklösung je Kavität geblockt und eine Stunde bei Raumtemperatur und  $100 \text{ rpm}$  inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden zur Kompetition je  $50 \text{ } \mu\text{L}$  der B[a]P-Kalibrationslösungen oder  $50 \text{ } \mu\text{L}$  des Ölextrakts gegeben. Als Kalibrationslösungen wurde B[a]P in Konzentrationen von 0.001, 0.01, 0.05,

0.1, 0.5, 1, 10, 100 und 1000 µg/L in nichtkontaminiertem Ölextrakt verwendet. Dazu wurden je 50 µL des monoklonalen anti-B[a]P-Antikörpers 22F12 gegeben (Stammlösung 1 mg/mL, 1:20000 in PBS verdünnt) und wieder eine Stunde bei Raumtemperatur und 100 rpm geschüttelt. Nach dem Waschschrift folgte die Zugabe des HRP-markierten anti-Maus-Sekundäantikörpers (1:5000 in PBS verdünnt, 100 µL je Kavität), mit dem wieder eine Stunde bei 100 rpm inkubiert wurde. Nach dem letzten Waschen wurden 100 µL der Substratlösung zugegeben und die Farbreaktion nach 45 min bei 100 rpm mit 100 µL Stopplösung beendet. Schließlich wurde die Absorption bei 450 nm gemessen.

### **2.10 Flüssig-Flüssig-Extraktion mit DMSO**

Zu 900 µL der Ölprobe wurden 900 µL DMSO/10 % (v/v) HCl (0.3 M) gegeben und eine Minute auf dem Vortexer gemischt. Anschließend wurde für eine Minute bei etwa 10 000 g zentrifugiert und die DMSO-Phase abgetrennt. Zur Ölphase wurden 900 µL DMSO gegeben, das Gemisch eine Minute auf dem Vortexer geschüttelt und anschließend erneut eine Minute bei 10 000 g zentrifugiert. Die DMSO-Phase wurde mit Wasser/10 % Methanol im Verhältnis 1:250 verdünnt und konnte so mittels ELISA gemessen werden.

### **2.11 Normalphasen-SPE mit Silica**

Zur Herstellung der SPE-Säulen wurden 500 mg Silica zwischen zwei PTFE-Fritten in eine 3 mL Glassäule gepackt. Je Säule wurden 200 µL der Ölprobe aufgegeben und der Durchlauf verworfen. B[a]P wurde mit 2.5 mL Dichlormethan eluiert und das Lösemittel bei 60 °C abgedampft. Der Rückstand wurde mit 200 µL DMSO extrahiert. Dazu wurde das Gemisch eine Minute auf dem Vortexer geschüttelt und anschließend bei etwa 10 000 g zentrifugiert. Die DMSO-Phase wurde mit Wasser/10 % Methanol im Verhältnis 1:50 verdünnt und die B[a]P-Konzentration mittels ELISA gemessen.

## **VI Abkürzungsverzeichnis**

---

4-VP	4-Vinylpyridin
ADCC	<i>Antibody dependent cellular cytotoxicity</i> (Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität)
AIBN	Azo-bis-(isobutyronitril)
APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i> (Chemische Ionisation unter Normaldruck)
APPI	<i>Atmospheric pressure photo ionization</i> (Photoionisation bei Atmosphärendruck)
Äq.	Äquivalent
ASE	<i>Accelerated solvent extraction</i> (beschleunigte Flüssigextraktion)
a.u.	<i>Arbitrary units</i> (willkürliche Einheiten)
B[a]P	Benzo[a]pyren
BCR	<i>B cell receptor</i> (B-Zellrezeptor)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CDR1-3	<i>Complementarity determining region 1-3</i> (Antikörperbindungsstelle 1-3)
C <sub>H</sub> 1-3	<i>Constant region heavy chain 1-3</i> (konstante Region der schweren Kette 1-3)
CI	Chemische Ionisation
C <sub>L</sub>	<i>Constant light chain</i> (konstanter Teil der leichten Kette)
CR	<i>Cross-reactivity</i> (Kreuzreaktivität)
Da	Dalton
DACC	Donor-Akzeptor-Komplex-Chromatographie
DAD	Diodenarray-Detektoren

DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	<i>Deoxyribonucleic acid</i> / Desoxyribonukleinsäure
DVB	Divinylbenzol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	Elektronenstoß-Ionisation
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') <sub>2</sub>	<i>Fragment antigen binding 2</i> (Antigen bindendes Fragment 2)
Fc	<i>Fragment crystallizable</i> (kristallisierbares Fragment)
FID	Flammenionisationsdetektor
FLD	Fluoreszenzdetektor
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i> (schnelle Protein-Flüssigkeitschromatographie)
FR1-4	<i>Framework 1-4</i> (Grundgerüst des variablen Teils 1-4)
FS	Fettsäure
Fv	<i>Variable fragment</i> (variables Fragment)
GC	Gaschromatographie

---

GPC	Gelpermeationschromatographie
HAT	Hypoxanthin/Aminopterin/Thymidin-Medium
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HSA	Humanes Serumalbumin
IC <sub>50</sub>	Testmittelpunkt der ELISA-Kalibrierkurve
Ig	Immunglobulin
IMAC	<i>Immobilized metal-ion-affinity chromatography</i> (Metallchelat-Affinitätschromatographie)
IR	Infrarot
IUPAC	<i>International union of pure and applied chemistry</i>
IWC	Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie (Technische Universität München)
K <sub>A</sub>	Affinitätskonstante [1/M]
k <sub>a</sub>	Assoziationsratenkonstante [1/Ms]
k <sub>d</sub>	Dissoziationsratenkonstante [1/s]
LC	Flüssigkeitschromatographie
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
MAE	<i>Microwave assisted extraction</i> (Mikrowellen-unterstützte Extraktion)
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption ionisation</i> (Matrix-unterstützte Laserdesorptionsionisation)
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MIP	<i>Molecularly imprinted polymer</i> (molekular geprägtes Polymer)
MSPD	<i>Matrix solid-phase dispersion</i> (Matrix-Festphasen-Dispersion)
MISPE	<i>Molecularly imprinted solid phase extraction</i> (molekular geprägte Festphasenextraktion)
MI-SPME	<i>Molecularly imprinted solid phase microextraction</i> (molekular geprägte Festphasenmikroextraktion)
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MTP	Mikrotiterplatte
n	Anzahl der Messpunkte einer Kalibrierung
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NIP	<i>Non-imprinted polymer</i> (nicht-geprägtes Polymer)
OVA	Ovalbumin
PAK(s)	Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe

---

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
PLE	<i>Pressurized liquid extraction</i> (Hochdruck-Flüssigkeitsextraktion)
POD	Peroxidase
PS	Polystyrol
rAk	Rekombinantes Antikörperfragment
RNA	Ribonukleinsäure
RP	<i>Reversed phase</i> (Umkehrphase)
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>
SBSE	<i>Stir bar sorptive extraction</i> (Rührstab-Sorptionsextraktion)
scFv	<i>Single-chain fragment variable</i> (einkettiges variables Fragment)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SEC	<i>Size-exclusion chromatography</i> (Größenausschlusschromatographie)
SFE	<i>Supercritical fluid extraction</i> (überkritische Fluidextraktion)
SIM	<i>Selected ion monitoring</i>
SPE	<i>Solid phase extraction</i> (Festphasenextraktion)
SPNE	<i>Solid phase nano extraction</i> (Festphasennanoextraktion)

SPR	<i>Surface plasmon resonance</i> (Oberflächenplasmonenresonanz)
THF	Tetrahydrofuran
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TOF	<i>Time of flight</i> (Flugzeitanalysator)
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
UAE	<i>Ultrasound assisted extraction</i> (Ultraschall-unterstützte Extraktion)
UV	Ultraviolettes Licht
V <sub>H</sub>	<i>Variable heavy chain</i> (variabler Teil der schweren Kette)
Vis	Sichtbarer Bereich des Lichts
V <sub>L</sub>	<i>Variable light chain</i> (variabler Teil der leichten Kette)
v/v	Volumenprozent
w/v	Massenprozent

## **VII Literaturverzeichnis**

**Adamczyk M.**, Gebler J. C., Wu J., Papain digestion of different mouse IgG subclasses as studied by electrospray mass spectrometry, *J. Immunol. Methods* **2000**, 237, 95-104.

**Adhikari C.**, Proctor A., Blyholder G. D., Diffuse-reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy of vegetable oil triglyceride adsorption on silicic acid, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1994**, 71, 589-594.

**Anyakora C.**, Ogbeche A., Palmer P., Coker H., Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in marine samples of Siokolo fishing settlement, *J. Chromatogr. A* **2005**, 1073, 323-330.

**Aybay C.**, Differential binding characteristics of protein G and protein A for Fc fragments of papain-digested mouse IgG, *Immunol. Lett.* **2003**, 85, 231-235.

**Badger G. M.**, Kimber R. W. L., The formation of aromatic hydrocarbons at high temperatures. Part VI. The pyrolysis of tetralin, *J. Chem. Soc.* **1960a**, 266-270.

**Badger G. M.**, Spotswood T. M., Formation of aromatic hydrocarbons at high temperatures. Part IX. Pyrolysis of toluene, ethylbenzene, propylbenzene, and butylbenzene, *J. Chem. Soc.* **1960b**, 4420-4427.

**Badger G. M.**, Spotswood T. M., The formation of aromatic hydrocarbons at high temperatures. Part V. The pyrolysis of 1-phenylbuta-1,3-diene, *J. Chem. Soc.* **1959**, 1635-1641.

**Bailon P.**, Ehrlich G. K., Fung W.-J., Berthold W., Affinity chromatography, Humana Press, Totowa **2000**.

**Ballesteros E.**, Garcia Sanchez A., Ramos Martos N., Simultaneous multidetermination of residues of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in olive and olive-pomace oils by gas chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **2006**, 1111, 89-96.

**Barceló D.**, Oubina A., Salau J. S., Perez S., Determination of PAHs in river water samples by ELISA, *Anal. Chim. Acta* **1998**, 376, 49-53.

**Barco-Bonila N.**, Vidal J. L. M., Frenich A. G., Romero-Gonzales R., Comparison of ultrasonic and pressurized liquid extraction for the analysis of polycyclic aromatic compounds in soil samples by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Talanta* **2009**, 78, 156-164.

**Barranco A.**, Alonso-Salces R. M., Bakkali A., Berrueta L. A., Gallo B., Vicente F., Sarobe M., Solid-phase clean-up in the liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils, *J. Chromatogr. A* **2003**, 988, 33-40.

**Barranco A.**, Alonso-Salces R. M., Corta E., Berrueta L. A., Gallo B., Vicente F., Sarobe M., Comparison of donor-acceptor and alumina columns for the clean-up of polycyclic aromatic hydrocarbons from edible oils, *Food Chem.* **2004**, 86, 465-474.

**Beloglazova N. V.**, Goryacheva I. Y., Mikhirev D. A., Saeger S. de, Niessner R., Knopp D., New immunochemically-based field test for monitoring benzo[a]pyrene in aqueous samples, *Anal. Sci.* **2008**, 24, 1613-1617.

**Benito A.**, Valero F., Lafuente J., Uses of  $\beta$ -galactosidase tag in on-line monitoring production of fusion proteins and gene expression in *Escherichia coli*, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, 15, 66-71.

**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.

**Bogusz M. J.**, El Hajj S. A., Ehaideb Z., Hassan H., Al-Tufail M., Rapid determination of benzo[a]pyrene in olive oil samples with solid-phase extraction and low-pressure, wide-bore gas chromatography-mass spectrometry and fast liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1026, 1-7.

**Bonwick** G. A., Smith C. J., Immunoassays: their history, development and current place in food science and technology, *Int. J. Food Sci. Technol.* **2004**, *39*, 817-827.

**Borrebaeck** C. A. K., Antibodies in diagnostics – from immunoassays to protein chips, *Immunol. Today* **2000**, *21*, 379-382.

**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**.

**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.

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

**Cammann** K., Instrumentelle Analytische Chemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **2001**.

**Canziani** G. A., Klakamp S., Myszka D. G., Kinetic screening of antibodies from crude hybridoma samples using Biacore, *Anal. Biochem.* **2004**, *323*, 301-307.

**Caro** E., Marcé R. M., Borrull F., Cormack P. A. G., Sherrington D. C., Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples, *TRAC-Trends Anal. Chem.* **2006**, *25*, 143-154.

**Carter** C. W. Jr., Carter C. W., Protein crystallization using incomplete factorial experiments, *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 12219-12223.

**Cejpek** K., Hajslová J., Kocourek V., Tomaniová M., Cmolik J., Changes in PAH levels during production of rapeseed oil, *Food Addit. Contam.* **1998**, 15, 563-574.

**Cervino** C., Entwicklung von immunanalytischen, chromatographischen und massenspektrometrischen Methoden zur Bestimmung von Aflatoxinen in Lebensmitteln, Dissertation, Technische Universität München **2008**.

**Château** M. de, Nilson B. H. K., Erntell M., Myhre E., Magnusson C. G. M., Åkerström B., Björck L., On the interaction between protein L and immunoglobulins of various mammalian species, *Scand. J. Immunol.* **1993**, 37, 399-405.

**Chaudhuri** J., Alt F. W., Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair, *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, 4, 541-552.

**Chen** B. H., Wang C. Y., Chiu C. P., Evaluation of analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in meat products by liquid chromatography, *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 2244-2251.

**Chen** B. H., Lin Y. S., Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons during processing of duck meat, *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 1394-1403.

**Chuang** J. C., Emon J. M. van, Chou Y.-L., Junod N., Finegold J. K., Wilson N. K., Comparison of immunoassay and gas chromatography–mass spectrometry for measurement of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil, *Anal. Chim. Acta* **2003**, 486, 31-39.

**Chuang** J. C., Pollard M. A., Chou Y.-L., Menton R. G., Wilson N. K., Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in house dust and residential soil, *Sci. Total Environ.* **1998**, 224, 189-199.

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

**Coleman** L., Mahler S. M., Purification of Fab fragments from a monoclonal antibody papain digest by Gradiflow electrophoresis, *Protein Expres. Purif.* **2003**, 32, 246-251.

**Courter** L. A., Pereira C., Baird W. M., Diesel exhaust influences carcinogenic PAH-induced genotoxicity and gene expression in human breast epithelial cells in culture, *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2007**, 625, 72-82.

**Cruse** J. M., Lewis R. E., Atlas of immunology, CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton **2010**.

**Cudney** R., Patel S., Weisgraber K., Newhouse Y., McPherson A., Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth, *Acta Crystallogr. D* **1994**, 50, 414-423.

**Cumming** R. C., Andon N. L., Haynes P. A., Park M., Fischer W. H., Schubert D., Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 21749-21758.

**Dabestani** R., Ivanov I. N., A compilation of physical, spectroscopic and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Photochem. Photobiol.* **1999**, 70, 10-34.

**Dachs** J., Glenn IV T. R., Gigliotti C. L., Brunciak P., Totten L. A., Nelson E. D., Franz T. P., Eisenreich S. J., Processes driving the short-term variability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Baltimore and northern Chesapeake Bay atmosphere, USA, *Atmos. Environ.* **2002**, 36, 2281-2295.

**Danyi** S., Brose F., Brasseur C., Schneider Y.-J., Larondelle Y., Pussemier L., Robbens J., Saeger S. de, Maghuin-Rogister G., Scippo M.-L., Analysis of EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons in food supplements using high performance liquid chromatography

coupled to an ultraviolet, diode array or fluorescence detector, *Anal. Chim. Acta* **2009**, *633*, 293-299.

**Darwish I. A.**, Immunoassay methods and their applications in pharmaceutical analysis: basic methodology and recent advances, *Int. J. Biomed. Sci.* **2006**, *2*, 217-235.

**David M. P.**, Asprer J. J., Ibane J. S., Concepcion G. P., Padlan E. A., (2007). A study of the structural correlates of affinity maturation: antibody affinity as a function of chemical interactions, structural plasticity and stability, *Mol. Immunol.* **2007**, *44*, 1342-1351.

**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.

**Diletti G.**, Scortichini G., Scarpone R., Gatti G., Torreti L., Migliorati G., Isotope dilution determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in olive pomace oil by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **2005**, *1062*, 247-254.

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

**Djozan D.**, Baheri T., Preparation and evaluation of solid-phase microextraction fibers based on monolithic molecularly imprinted polymers for selective extraction of diacetylmorphine and analogous compounds, *J. Chromatogr. A*, **2007**, *1166*, 16-23.

**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.

**Dudley R. A.**, Edwards P., Ekins R. P., Finney D. J., McKenzie I. G. M., Raab G. M., Rodbard D., Rodgers R. P. C., Guidelines for immunoassay data processing, *Clin. Chem.* **1985**, *31*, 1264-1271.

**Ebermann R.**, Elmadfa I., Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung, Springer-Verlag, Wien **2011**.

**Elovaara E.**, Heikkilä P., Pyy L., Mutanen P., Riihimäki V., Significance of dermal and respiratory uptake in creosote workers: exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and urinary excretion of 1-hydroxypyrene, *J. Occup. Environ. Med.* **1995**, 52, 196-203.

**Engvall E.**, Perlmann P., Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) - Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **1971**, 8, 871-874.

**Enokizono J.**, Wikström M., Sjöbring U., Björck L., Forsén S., Arata Y., Kato K., Shimada I., NMR analysis of the interaction between protein L and Ig light chains, *J. Mol. Biol.* **1997**, 270, 8-13.

**EPA**, Test Method, Polynuclear aromatic hydrocarbons - Method 610, Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati (USA) **1982**.

**Erntell M.**, Myhre E. B., Sjöbring U., Björck L., Streptococcal protein G has affinity for both Fab- and Fc-fragments of human IgG, *Mol. Immunol.* **1988**, 25, 121-126.

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

**Fernandez P.**, Grimalt J. O., Vilanova R. M., Atmospheric gas-particle partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons in high mountain regions of Europe, *Environ. Sci. Technol.* **2002**, 36, 1162-1168.

**Filpula D.**, Antibody engineering and modification technologies, *Biomol. Eng.* **2007**, 24, 201-215.

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

**Findlay J. W. A., Smith W. C., Lee J. W., Nordblom G. D., Das I., DeSilva B. S., Khan M. N., Bowsher R. R.,** Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* **2000**, *21*, 1249-1273.

**Fitzpatrick B., O’Kennedy R.,** The development and application of a surface plasmon resonance-based inhibition immunoassay for the determination of warfarin in plasma ultrafiltrate, *J. Immunol. Methods* **2004**, *291*, 11-25.

**Frenklach M.,** Reaction mechanism of soot formation in flames, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**, *4*, 2028-2037.

**Fritcher D. L., Mazet J. A. K., Ziccardi M. H., Gardner I. A.,** Evaluation of two direct immunoassays for rapid detection of petroleum products on marine birds, *Mar. Pollut. Bull.* **2002**, *44*, 388-395.

**García Falcón M. S., González Amigo S., Lage Yusty M. A., López de Alda Villaizán M. J., Simal Lozano J.,** Enrichment of benzo[a]pyrene in smoked food products and determination by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection, *J. Chromatogr. A* **1996**, *753*, 207-215.

**Geacintov N. E., Cosman M., Hingerty B. E., Amin S., Broyde S., Patel D. J.,** NMR solution structures of stereoisomeric covalent polycyclic aromatic carcinogen-DNA adducts: Principles, patterns, and diversity, *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 111-146.

**Gey M. H.,** Instrumentelle Analytik und Bioanalytik. Springer Verlag, Berlin Heidelberg **2008**.

**Gilbert J.,** The fate of environmental contaminants in the food chain, *Sci. Total Environ.* **1994**, *143*, 103-111.

**Gill S. C., von Hippel P. H.,** Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data, *Anal. Biochem.* **1989**, *182*, 319-326.

**Glass** T. R., Ohmura N., Taemi Y., Joh T., Simple immunoassay for detection of PCBs in transformer oil, *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 5005-5009.

**Gobi** K. V., Kataoka C., Miura N., Surface plasmon resonance detection of endocrine disruptors using immunoprobes based on self-assembled monolayers, *Sensor. Actuat. B* **2005**, *108*, 784-790.

**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 immunosensor, *Sensor. Actuat. B* **2004**, *103*, 265-271.

**Gobi** K. V., Sasaki M., Shoyama Y., Miura N., Highly sensitive detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and association constants of the interaction between PAHs and antibodies using surface plasmon resonance immunosensor, *Sensor. Actuat. B* **2003**, *89*, 137-143.

**Gómez-Ruiz** J. A., Wenzl T., Evaluation of gas chromatography columns for the analysis of the 15 + 1 EU-priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 1697-1707.

**Götze** H.-J., Schneider J., Herzog H.-G., Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Diesel soot by high-performance liquid chromatography, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1991**, *340*, 27-30.

**Grob** K., Biederman M., Caramaschi A., Pacciarelli B., LC-GC analysis of the aromatics in a mineral oil fraction: Batching oil for jute bags, *J. High Resolut. Chromatogr.* **1991**, *14*, 33-39.

**Guillén** M. D., Sopelana P., Palencia G., Polycyclic aromatic hydrocarbons and olive pomace oil, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2123-2132.

**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.

**Gunstone F. D.**, The chemistry of oils and fats, John Wiley & Sons, Hoboken (NJ) **2004**.

**Hack R.**, Märtlbauer E., Terplan G., Production and characterization of monoclonal antibodies to the macrocyclic trichothecene Roridin A, *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 2328-2330.

**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.

**Han D. M.**, Fang G. Z., Yan X. P., Preparation and evaluation of a molecularly imprinted sol-gel material for on-line solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of trace pentachlorophenol in water samples, *J. Chromatogr. A* **2005**, *1100*, 131-136.

**Hargis J. C.**, Schaefer H. F., Houk K. N., Wheeler S. E., Noncovalent interactions of a benzo[a]pyrene diol epoxide with DNA base pairs: Insight into the formation of adducts of (+)-BaP DE-2 with DNA, *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 2038-2044.

**Harriman W.**, Volk H., Defranoux N., Wabl M., Immunoglobulin class switch recombination, *Annu. Rev. Immunol.* **1993**, *11*, 361-384.

**Harris B.**, Exploiting antibody-based technologies to manage environmental pollution, *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 290-296.

**Harvey R. G.**, Polycyclic aromatic hydrocarbons, Wiley-VCH, New York **1997**.

**Harvey R. G.**, Geacintov N. E., Intercalation and binding of carcinogenic hydrocarbon metabolites to nucleic acids, *Accounts Chem. Res.* **1988**, *21*, 66-73.

**Harvey R. G.**, Polycyclic hydrocarbons and carcinogenesis (ACS Symposium Series), American Chemical Society, Washington D. C. **1985**.

**Harwood** N. E., Batista F. D., Early events in B cell activation, *Annu. Rev. Immunol.* **2010**, 28, 185-210.

**Haupt** K., Imprinted polymers – Tailor-made mimics of antibodies and receptors, *Chem. Commun.* **2003**, 171-178.

**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.

**Hecht** S. S., Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3, 733-744.

**Hecht** S. S., Zinggeler Berg J., Hochalter J. B., Preferential glutathione conjugation of a reverse diol epoxide compared to a bay region diol epoxide of phenanthrene in human hepatocytes: Relevance to molecular epidemiology studies of glutathione-S-transferase polymorphisms and cancer, *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, 22, 426-432.

**Heyningen** V. A. van, Simple method for ranking the affinities of monoclonal antibodies, *Methods Enzymol.* **1986**, 121, 472-481.

**Hiner** A. N. P., Raven E. L., Thorneley R. N.F., Garcia-Canovas F., Rodriguez-Lopez J. N., Mechanisms of compound I formation in heme peroxidases, *J. Inorg. Biochem.* **2002**, 91, 27-34.

**Ho** W. L., Lin T. C., Liu Y. Y., Chen J. A., Analysis of smoke PAHs from selected Taiwanese cigarettes by using molecular imprinting polymers, *J. Environ. Sci. Heal. A* **2010**, 45, 211-223.

**Hodnik** V., Anderluh G., Toxin detection by surface plasmon resonance, *Sensors* **2009**, 9, 1339-1354.

**Holloși** L., Wenzl T., Development and optimization of a dopant assisted liquid chromatographic-atmospheric pressure photo ionisation-tandem mass spectrometric method for the determination of 15+1 EU priority PAHs in edible oils, *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 23-31.

**Homola** J., Surface plasmon resonance based sensors. Springer Verlag, Berlin Heidelberg **2009**.

**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.

**Howard** J. H., Fazio T., White R. H., Polycyclic aromatic hydrocarbons in solvents used in extraction of edible oils, *J. Agric. Food Chem.* **1968**, *16*, 72-75.

**Hutzler** C., Luch A., Filser J. G., Analysis of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in complex environmental mixtures by LC-APPI-MS/MS, *Anal. Chim. Acta* **2011**, *702*, 218-224.

**Ikegami** T., Mukawa T., Nariai H., Takeuchi T., Bisphenol A-recognition polymers prepared by covalent molecular imprinting, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *504*, 131-135.

**Ius** A., Bacigalupo M. A., Roda A., Vaccari C., Development of a time-resolved fluoroimmunoassay of benzo(a)pyrene in water, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1992**, *343*, 55-56.

**Jacob** J., Karcher W., Belliaro J. J., Wagstaffe P. J., Polycyclic aromatic compounds of environmental and occupational importance: Their occurrence, toxicity and the development of high purity certified reference materials, Part II, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1986**, *323*, 1-10.

**Jacob** J., Karcher W., Wagstaffe P. J., Polycyclic aromatic compounds of environmental and occupational importance: Their occurrence, toxicity and the development of high purity certified reference materials, Part I, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1984**, *317*, 101-114.

**Jacob J.**, The significance of polycyclic aromatic hydrocarbons as environmental carcinogens, *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 301-308.

**Jancarik J.**, Kim S. H., Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins, *J. Appl. Crystallogr.* **1991**, *24*, 409-411.

**Jira W.**, A GC/MS method for the determination of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in smoked meat products and liquid smokes, *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *218*, 208-212.

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

**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.

**Kabat E. A.**, Wu T. T., Gottesman K. S., Foeller C., Sequences of proteins of immunological interest, Diane Publishing Co., Darby **1992**.

**Kaplan W.**, Hüsler P., Klump H., Conformational stability of pGEX-expressed *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase: a detoxication enzyme and fusion protein affinity tag, *Prot. Sci.* **1997**, *6*, 399-406.

**Karakaya A.**, Ates I., Yucesoy B., Effects of occupational polycyclic aromatic hydrocarbon exposure on T-lymphocyte functions and natural killer cell activity in asphalt and coke oven workers, *Hum. Exp. Toxicol.* **2004**, *23*, 317-322.

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

**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. Methods* **2011a**, 371, 81-90.

**Karsunke X. Y. Z.**, Entwicklung immunanalytischer Methoden zur Detektion von niedermolekularen toxischen Verbindungen in Lebensmitteln, Dissertation, Technische Universität München **2011b**.

**Karsunke X. Y. Z.**, Wang H., Weber E., McLean M. D., Niessner R., Knopp D., Development of single-chain variable fragment (scFv) antibodies against hapten benzo[a]pyrene: a binding study, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 402, 499-507.

**Katsamba P. S.**, Navratilova I., Calderon-Cacia M., Fan L., Thornton K., Zhu M., Bos T. V., Forte C., Friend D., Laird-Offringa I., Tavares G., Whatley J., Shi E., Widom A., Lindquist K. C., Klakamp S., Drake A., Bohmann D., Roell M., Rose L., Dorocke J., Roth B., Luginbühl B., Myszka D. G., Kinetic analysis of a high-affinity antibody/antigen interaction performed by multiple Biacore users, *Anal. Biochem.* **2006**, 352, 208-221.

**Kaufmann S. H. E.**, Basiswissen Immunologie, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg **2014**.

**Kawamura O.**, Sato S., Kajii H., Nagayama S., Ohtani K., Chiba J., Ueno Y., A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin a based on monoclonal antibodies, *Toxicon* **1989**, 27, 887-897.

**Kawazumi H.**, Gobi K. V., Ogino K., Maeda H., Miura N., Compact surface plasmon resonance (SPR) immunosensor using multichannel for simultaneous detection of small molecule compounds, *Sensor. Actuat. B* **2005**, 108, 791-796.

**Kennett R. H.**, Cell fusion, *Methods Enzymol.* **1979**, 58, 345-359.

**Khasawneh M. A.**, Vallano P. T., Remcho V. T., Affinity screening by packed capillary high performance liquid chromatography using molecular imprinted sorbents II. Covalent imprinted polymers, *J. Chromatogr. A* **2001**, 922, 87-97.

**Killard** A. J., Deasy B., O'Kennedy R., Smyth M. R., Antibodies: production, functions and applications in biosensors, *TRAC-Trends Anal. Chem.* **1995**, *14*, 257-266.

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

**Kipopoulou** A. M., Manoli E., Samara C., Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in an industrial area, *Environ. Pollut.* **1999**, *106*, 369-380.

**Kipp** S., Peyrer H., Kleiböhmer W., Coupling superheated water extraction with enzyme immunoassay for an efficient and fast PAH screening in soil, *Talanta* **1998**, *46*, 385-393.

**Knopp** D., Immunoassay development for environmental analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385*, 425-427.

**Knopp** D., Seifert M., Väänänen 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.

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

**Kolarovic** L., Traitler H., Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils by caffeine complexation and glass capillary gas chromatography, *J. Chromatogr.* **1982**, *237*, 263-272.

**Kovacs-Nolan** J., Mine Y., Egg yolk antibodies for passive immunity, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2012**, *3*, 163-182.

**Kramer** K., Hock B., Recombinant antibodies for environmental analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 417-426.

**Krämer P.**, A strategy to validate immunoassay test kits for TNT and PAHs as a field screening method for contaminated sites in Germany, *Anal. Chim. Acta* **1998**, 376, 3-11.

**Krupadam R. J.**, Bhagat B., Wate S. R., Bodhe G. L., Sellergren B., Anjaneyulu Y., Fluorescence spectrophotometer analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples based on solid phase extraction using molecularly imprinted polymer, *Environ. Sci. Technol.* **2009**, 43, 2871-2877.

**Kuby J.**, Immunology, W. H. Freeman and Company Verlag, New York **2007**.

**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.

**Kupstat A.**, Knopp D., Niessner R., Kumke M., Novel intramolecular energy transfer probe for the detection of benzo[a]pyrene metabolites in a homogeneous competitive fluorescence immunoassay, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 1666-1673.

**Kusano N.**, Iwanami T., Narahara K., Tanaka M., Production of monoclonal antibodies specific for the recombinant viral protein of Apple stem grooving virus-citrus isolate and their immunochromatographic assay, *J. Virol. Methods* **2014**, 195, 86-91.

**Lai J.-P.**, Niessner R., Knopp D., Benzo[a]pyrene imprinted polymers: synthesis, characterization and SPE application in water and coffee samples, *Anal. Chim. Acta* **2004**, 522, 137-144.

**Länge K.**, Griffin G., Vo-Dinh T., Gauglitz G., Characterization of antibodies against benzo[a]pyrene with thermodynamic and kinetic constants, *Talanta* **2002**, 56, 1153-1161.

**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.

**Lee M. L.**, Novotny M., Bartle K. D., Gas chromatography/mass spectrometric and nuclear magnetic resonance spectrometric studies of carcinogenic polynuclear aromatic hydrocarbons in tobacco and marijuana smoke condensates, *Anal. Chem.* **1976**, *48*, 405-416.

**Lequin R. M.**, Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Clin. Chem.* **2005**, *51*, 2415-2418.

**Letzel T.**, Analytik partiell oxidierter polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe und Abbau von Benzo[a]pyren auf Rußaerosolpartikeln durch Ozon, Dissertation, Technische Universität München, **2001**.

**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.

**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 Z.**, Woo C. J., Iglesias-Ussel M. D., Ronai D., Scharff M. D., The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination, *Genes Dev.* **2004**, *18*, 1-11.

**Liang Y.**, Fung P. K., Tse M. F., Hong H. C., Wong M. H., Sources and seasonal variation of PAHs in the sediments of drinking water reservoirs in Hong Kong and the Dongjiang River (China), *Environ. Monit. Assess.* **2008**, *146*, 41-50.

**Lien G.-W.**, Chen C.-Y., Wu C.-F., Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionization or electrospray ionization with tropylium post-column derivatization, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 3694-3700.

**Ligocki** M. E., Pankow J. F., Oxidative losses of anthracene, acenaphthylene, and benzo[a]pyrene during florisil and silica gel cleanup using diethyl ether containing peroxides, *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 2984-2987.

**Lijinski** W., Shubik P., Benzo(a)pyrene and other polynuclear hydrocarbons in charcoal-broiled meat, *Science* **1964**, *145*, 53-55.

**Lipke** A., Trytek M., Fiedurek J., Majdan M., Janik E., Spectroscopic and biocatalytic properties of a chlorophyll-containing extract in silica gel, *J. Mol. Struct.* **2013**, *1052*, 158-164.

**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.

**Loers** G., Cui Y.-F., Neumaier I., Schachner M., Skerra A., A Fab fragment directed against the neural cell adhesion molecule L1 enhances functional recovery after injury of the adult mouse spinal cord, *Biochem. J.* **2014**, *460*, 437-446.

**Loisel** S., Ohresser M., Pallardy M., Daydé D., Berthou C., Cartron G., Watier H., Relevance, advantages and limitations of animal models used in the development of monoclonal antibodies for cancer treatment, *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* **2007**, *62*, 34-42.

**Long** R., Tompkins E. E., Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons in pre-mixed acetylene-oxygen flames, *Nature* **1967**, *213*, 1011-1012.

**Lottspeich** F., Engels J. W., Simeon A., Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **2006**.

**Love** R. A., Villafranca J. E., Aust R. M., Nakamura K. K., Jue R. A., Major J. G., Radhakrishnan R., Butler W. F., How the anti-(metal chelate) antibody CHA255 is specific for the metal ion of its antigen: X-ray structures for two Fab<sup>γ</sup>/hapten complexes with different metals in the chelate, *Biochemistry* **1993**, *32*, 10950-10959.

**Lu G.-N.**, Dang Z., Tao X.-Q., Yang C., Yi X.-Y., Estimation of water solubility of polycyclic aromatic hydrocarbons using quantum chemical descriptors and partial least squares, *QSAR Comb. Sci.* **2008**, *27*, 618-626.

**Luttmann W.**, Bratke K., Küpper M., Myrtek D., Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **2008**.

**Maagd P. G.-J. de**, Hulscher D. T. E. M. ten, Heuvel H. van den, Opperhuizen A., Sijm D. T. H. M., Physicochemical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons: Aqueous solubilities, n-octanol/water partition coefficients, and Henry's Law constants, *Environ. Toxicol. Chem.* **1998**, *17*, 251-257.

**MacCallum R. M.**, Martin A. C. R., Thornton J. M., Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography, *J. Mol. Biol.* **1996**, *262*, 732-745.

**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.

**Mani J.-C.**, Marchi V., Cucurou C., Effect of HIV-1 peptide presentation on the affinity constants of two monoclonal antibodies determined by BIAcore<sup>TM</sup> Technology, *Mol. Immunol.* **1994**, *31*, 439-444.

**Manoli E.**, Samara C., Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and analysis, *TRAC-Trends Anal. Chem.* **1999**, *18*, 417-428.

**Maragos C.**, Busman M., Sugita-Konishi Y., Production and characterization of a monoclonal antibody that cross-reacts with the mycotoxins nivalenol and 4-deoxynivalenol, *Food Addit. Contam. A* **2006**, *23*, 816-825.

**Marquette C. A.**, Blum L. J., State of the art and recent advances in immunoanalytical systems, *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1424-1433.

**Märtlbauer** E., Gareis M., Terplan P., Enzyme immunoassay for the macrocyclic trichothecene roridin A: Production, properties, and use of rabbit antibodies, *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 225-230.

**Marvin** C. H., Smith R. W., Bryant D. W., McCarry B. E., Analysis of high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **1999**, *863*, 13-24.

**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, *J. Immunol. Methods* **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.

**Menichini** E., di Domenico A., Bonanni L., Reliability assessment of a gas chromatographic method for polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oil, *J. Chromatogr.* **1991**, *555*, 211-220.

**Menichini** E., Monfredini F., Merli F., The temporal variability of the profile of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air: a study in a medium traffic area in Rome, 1993-1998, *Atmos. Environ.* **1999**, *33*, 3739-3750.

**Miura** N., Sasaki M., Gobi K. V., Kataoka C., Shoyama Y., Highly sensitive and selective surface plasmon resonance sensor for detection of sub-ppb levels of benzo[a]pyrene by indirect competitive immunoreaction method, *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 953-959.

**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.

**Moret** S., Conte L. S., Off-Line LC-LC determination of PAHs in edible oils and lipidic extracts, *J. High Resolut. Chromatogr.* **1998**, *21*, 253-257.

**Moret** S., Conte L. S., Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods, *J. Chromatogr. A* **2000a**, *882*, 245-253.

**Moret** S., Dudine A., Conte L. S., Processing effects on the polyaromatic hydrocarbon content of grapeseed oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2000b**, *77*, 1289-1292.

**Moret** S., Purcaro G., Conte L. S., Polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils from canned foods, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2005**, *107*, 488-496.

**Moriette** C., LeBerre M., Bocher S. K., Castric J., Brémont M., Characterization and mapping of monoclonal antibodies against the *Sleeping disease virus*, and aquatic alphavirus, *J. Gen. Virol.* **2005**, *86*, 3119-3127.

**Mosbach** K., Molecular imprinting, *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 9-14.

**Mottier** P., Parisod V., Turesky R. J., Quantitative determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in barbecued meat sausages by gas chromatography coupled to mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1160-1166.

**Mullett** W. M., Martin P., Pawliszyn J., In-tube molecularly imprinted polymer solid-phase microextraction for the selective determination of propranolol, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2383-2389.

**Mychtych** D. T., La S., Barger T., Ferbas J., Swanson S. J., The development and validation of a sensitive, dual-flow cell, SPR-based biosensor immunoassay for the detection, semi-

quantitation, and characterization of antibodies to darbepoetin alfa and epoetin alfa in human serum, *J. Pharmaceut. Biomed.* **2009**, *49*, 415-426.

**Neri D.**, Monigiani S., Kirkham P. M., Biophysical methods for the determination of antibody-antigen affinities, *Trends Biotechnol.* **1996**, *14*, 465-470.

**Nießner R.** (Hrsg.), Höll: Wasser - Nutzung im Kreislauf: Hygiene, Analyse und Bewertung, 9. Auflage, Walter de Gruyter Verlag, Berlin/New York, 2010.

**Nilson B. H. K.**, Solomon A., Björck L., Åkerström B., Protein L from *Peptostreptococcus magnus* binds to the  $\kappa$  light chain variable domain, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 2234-2239.

**Noel L.**, Authier-Martin M., Patry G., Marcoux A., Jean P., Quantitative analysis of PAH in pitch by HPLC with fluorescence detector, *Polycycl. Aromat. Comp.* **1996**, *9*, 373-380.

**Nording M.**, Haglund P., Evaluation of the structure/cross-reactivity relationship of polycyclic aromatic compounds using an enzyme-linked immunosorbent assay kit, *Anal. Chim. Acta* **2003**, *487*, 43-50.

**Oanh N. T. K.**, Reutergardh L. B., Dung N. T., Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons and particulate matter from domestic combustion of selected fuels, *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 2703-2709.

**Oda J.**, Nomura S., Yasuhara A., Shibamoto T., Mobile sources of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in a roadway tunnel, *Atmos. Environ.* **2001**, *35*, 4819-4827.

**Omar N. Y. M. J.**, Bin Abas M. R., Ketulya K. A., Tahir N. M., Concentrations of PAHs in atmospheric particles (PM-10) and roadside soil particles collected in Kuala Lumpur, Malaysia, *Atmos. Environ.* **2002**, *36*, 247-254.

**Orlandi R.**, Güssow D. H., Jones P. T., Winter G., Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 3833-3837.

**Overkamp** D., Mohammed-Ali S., Carledge C., Landon J., Production of polyclonal antibodies in ascitic fluid of mice: Technique and applications, *J. Immunoass. Immunochem.* **2006**, *9*, 51-68.

**Owens** P. K., Karlsson L., Lutz E. S. M., Andersson L. I., Molecular imprinting for bio- and pharmaceutical analysis, *TRAC-Trends Anal. Chem.* **1999**, *18*, 146-154.

**Padlan** E. A., Anatomy of the antibody molecule, *Mol. Immunol.* **1994**, *31*, 169-217.

**Pande** J., Szewczyk M. M., Grover A. K., Phage display: concept, innovations, applications and future, *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 849-858.

**Pandey** M. K., Mishra K. K., Khanna S. K., Das M., Detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in commonly consumed edible oils and their likely intake in the Indian population, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2004**, *81*, 1131-1136.

**Panther** B. C., Hooper M. A., Tapper N. J., A comparison of air particulate matter and associated polycyclic aromatic hydrocarbons in some tropical and temperate urban environments, *Atmos. Environ.* **1999**, *33*, 4087-4099.

**Parham** P., Androlewicz M. J., Brodsky F. M., Holmes N. J., Ways J. P., Monoclonal antibodies: Purification, fragmentation and application to structural and functional studies of class I MHC antigens, *J. Immunol. Methods* **1982**, *53*, 133-173.

**Parham** P., On the fragmentation of monoclonal IgG1, IgG2a, and IgG2b from BALB/c mice, *J. Immunol.* **1983**, *131*, 2895-2902.

**Park** S. S., Kim Y. J., Kang C. H., Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in Seoul, Korea, *Atmos. Environ.* **2002**, *36*, 2917-2924.

**Parkash** S., Blanshard J. M. V., Infrared spectra of selected ultra-pure triglycerides, *Spectrochim. Acta* **1974**, *81A*, 951-957.

- Parker D. C.**, T cell-dependent B cell activation, *Annu. Rev. Immunol.* **1993**, *11*, 331-360.
- Pena T.**, Pensado L., Casais C., Mejuto C., Phan-Tan-Luu R., Cela R., Optimization of a microwave-assisted extraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons from fish samples, *J. Chromatogr. A* **2006**, *1121*, 163-169.
- Perrin J. L.**, Poirot N., Liska P., Thienpont A., Felix G., Trace enrichment and HPLC analysis of PAHs in edible oils and fat products, using liquid chromatography on electron acceptor stationary phases in connection with reverse phase and fluorescence detection, *Fat Sci. Technol.* **1993**, *95*, 46-51.
- Perugini M.**, DiSerafino G., Giacomelli A., Medrzycki P., Sabatini A. G., Oddo L. P., Marinelli E., Amorena M., Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in bees (*apis mellifera*) and honey in urban areas and wildlife reserves, *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 7440-7444.
- Pierce M. M.**, Raman C. S., Nall B. T., Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions, *Methods* **1999**, *19*, 213-221.
- Pietschmann-Keck M.**, Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) – Untersuchungsergebnisse 2005, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittel, 2012.
- Plaza-Bolaños P.**, Garrido Frenich A., Martinez Vidal J. L., Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. Analytical methods and trends, *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 6303-6326.
- Plückthun A.**, Skerra A., Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*, *Methods Enzymol.* **1989**, *178*, 497-515.
- Pol E.**, Karlsson R., Roos H., Jansson A., Xu B., Larsson A., Jarhede T., Franklin G., Fuentes A., Persson S., Biosensor-based characterization of serum antibodies during development of an anti-IgE immunotherapeutic against allergy and asthma, *J. Mol. Recognit.* **2007**, *20*, 22-31.

**Poma A.**, Turner A. P. F., Piletsky S. A., Advances in the manufacture of MIP nanoparticles, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 629-637.

**Poster D. L.**, Schantz M. M., Sander L. C., Wise S. A., Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: a critical review of gas chromatographic (GC) methods, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 859-881.

**Potter D. W.**, Pawliszyn J., Rapid determination of polyaromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in water using solid-phase microextraction and GC/MS, *Environ. Sci. Technol.* **1994**, *28*, 298-305.

**Preedy V. R.**, Watson R., Olives and olive oil in health and disease prevention, Academic Press, Waltham (MA) **2010**.

**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*, 2083-2092.

**Purcaro G.**, Moret S., Conte L. S., Optimisation of microwave assisted extraction (MAE) for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) determination in smoked meat, *Meat Sci.* **2009**, *81*, 275-280.

**Qiao F.**, Sun H., Yan H., Row K. H., Molecularly imprinted polymers for solid phase extraction, *Chromatographia* **2006**, *64*, 625-634.

**Quelven E.**, Tjollyn S., Rocher L., Mille G., Fourneron J.-D., Development of a monoclonal antibody against polycyclic aromatic hydrocarbons, *Polycycl. Aromat. Comp.* **1999**, *13*, 93-103.

**Ravindra K.**, Sokhi R., Grieken R. van, Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation, *Atmos. Environ.* **2008**, *42*, 2895-2921.

**Rebe Raz S.**, Bremer M. G. E. G., Haasnoot W., Norde W., Label-free and multiplex detection of antibiotic residues in milk using imaging surface plasmon resonance-based immunosensor, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7743-7749.

**Rehm H.**, Letzel T., Proteinbiochemie/Proteomics, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **2010**.

**Rehwagen M.**, Müller A., Massolo L., Herbarth O., Ronco A., Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particles in ambient air from urban and industrial areas, *Sci. Total Environ.* **2005**, *348*, 199-210.

**Reth M.**, Antigen receptors on B lymphocytes, *Annu. Rev. Immunol.* **1992**, *10*, 97-121.

**Rey-Salgueiro L.**, Pontevedra-Pombal X., Alvarez-Casas M., Martinez-Carballo E., Garcia-Falcon M. S., Simal-Gandara J., Comparative performance of extraction strategies for polycyclic aromatic hydrocarbons in peats, *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 5235-5241.

**Richter H.**, Howard J. B., Formation and consumption of single-ring aromatic hydrocarbons and their precursors in premixed acetylene, ethylene and benzene flames, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**, *4*, 2038-2055.

**Richter H.**, Howard J. B., Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons and their growth to soot—a review of chemical reaction pathways, *Prog. Energ. Combust.* **2000**, *26*, 565-608.

**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.

**Rodríguez-Acuña R.**, Pérez-Camino M. C., Cert A., Moreda W., Sources of contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in Spanish virgin olive oils, *Food Addit. Contam.* **2008**, 25, 115-122.

**Rodriguez-Lopez J. N.**, Lowe D. J., Hernandez-Ruiz J., Hiner A. N. P., Garcia-Canovas F., Thorneley R. N. F., Mechanism of reaction of hydrogen peroxide with horseradish peroxidase: Identification of intermediates in the catalytic cycle, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 11838-11847.

**Roos J. G. van**, Bodelier-Bade M. M., Jongeneelen F. J., Estimation of individual dermal and respiratory uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons in 12 coke oven workers, *Brit. J. Ind. Med.* **1993**, 50, 623-632.

**Roskos L. K.**, Davis C. G., Schwab G. M., The clinical pharmacology of therapeutic monoclonal antibodies, *Drug Develop. Res.* **2004**, 61, 108-120.

**Rupp B.**, Biomolecular crystallography, Garland Science, New York **2009**.

**Rybicki B. A.**, Nock N. L., Savera A. T., Tang D., Rundle A., Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct formation in prostate cancerogenesis, *Cancer Lett.* **2005**, 239, 157-167.

**Saitoh T.**, Itoh H., Hiraide M., Admicelle-enhanced synchronous fluorescence spectrometry for the selective determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, *Talanta* **2009**, 79, 177-182.

**Scharnweber T.**, Fisher M., Suchanek M., Knopp D., Niessner R., Monoclonal antibody to polycyclic aromatic hydrocarbons based on a new benzo[a]pyrene immunogen, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2001**, 371, 578-585.

**Sastry** L., Alting M. M., Huse W. D., Short J. M., Sorge J. A., Hay B. N., Janda K. D., Benkovic S. J., Lerner R. A., Cloning of the immunological repertoire in *Escherichia coli* for generation of monoclonal catalytic antibodies: construction of a heavy chain variable region-specific cDNA library, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 5728-5732.

**Schauer** C., Analyse und Reaktivität von polyzyklischen aromatischen Verbindungen in Aerosolen, Dissertation, Technische Universität München **2004a**.

**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.* **2004b**, *378*, 725-736.

**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.

**Schiweck** W., Skerra, A. Fermenter production of an artificial Fab fragment, rationally designed for the antigen cystatin, and its optimized crystallization through constant domain shuffling, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **1995**, *23*, 561-565.

**Shankaran** D. R., Gobi K. V., Miura N., Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest, *Sensor. Actuat. B* **2007**, *121*, 158-177.

**Shea** K. J., Thompson E. A., Template synthesis of macromolecules. Selective functionalization of an organic polymer, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 4253-4255.

**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.

**Shimmo** M., Adler H., Hyötyläinen T., Hartonen K., Kulmala M., Riekkola M.-L., Analysis of particulate polycyclic aromatic hydrocarbons by on-line coupled supercritical fluid

extraction-liquid chromatography-gas chromatography-mass spectrometry, *Atmos. Environ.* **2002**, *36*, 2985-2995.

Šimko P., Khunova V., Simon P., Hrubá M., Kinetics of sunflower oil contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated recycled low density polyethylene film, *Int. J. Food Sci. Technol.* **1995**, *30*, 807-812.

Šimko P., Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives, *J. Chromatogr. B* **2002**, *770*, 3-18.

Simon R., Gomez Ruiz J. A., von Holst C., Wenzl T., Anklam E., Results of a European inter-laboratory comparison study on the determination of EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in edible vegetable oils, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1397-1408.

Simon R., Gómez-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.

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.

Skerra A., Glockshuber R., Plückthun, A. Structural features of the McPC603 Fab fragment not defined in the X-ray structure, *FEBS Lett.* **1990**, *271*, 203-206.

Skerra A., A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments, *Gene* **1994**, *8*, 79-84.

Skerra, A. Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **1994a**, *151*, 131-135.

**Smith** D. R., Robb D. B., Blades M. W., Comparison of dopants for cation exchange ionization of nonpolar polycyclic aromatic hydrocarbons with reversed-phase LC-APPI-MS, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20*, 73-79.

**Smith** K. A., Nelson P. N., Warren P., Astley S. J., Murray P. G., Greenman J., Demystified – recombinant antibodies, *J. Clin. Pathol.* **2004**, *57*, 912-917.

**Speer** K., Steeg E., Horstmann P., Kühn Th., Montag A., Determination and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in native vegetable oils, smoked fish products, mussels and oysters, and bream from the river Elbe, *J. High Res. Chromatogr.* **1990**, *13*, 104-111.

**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.

**Srivastava** S., Singh M., George J., Bhui K., Saxena A. M., Shukla Y., Genotoxic and carcinogenic risks associated with the dietary consumption of repeatedly heated coconut oil, *Brit. J. Nutr.* **2010**, *104*, 1343-1352.

**Stuttle** A. W. J., Powling M. J., Ritter J. M., Hardisty R. M., Effects of a monoclonal antibody to glycoprotein IIb/IIIa (p256) and of enzymically derived fragments of p256 on human platelets, *Thromb. Hemostasis* **1991**, *65*, 432-437.

**Suess** M., The environmental load and cycle of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Sci. Total Environ.* **1976**, *6*, 239-250.

**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.

**Takino** M., Daishima S., Yamaguchi K., Nakahara T., Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using silver nitrate as a post-column reagent, *J. Chromatogr. A* **2001**, *928*, 53-61.

**Teixeira V. H.**, Casal S., Oliveira M. B. P. P., PAHs content in sunflower, soybean and virgin olive oils: Evaluation in commercial samples and during refining process, *Food Chem.* **2007**, *104*, 106-112.

**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.

**Todeschini R.**, Gramatica P., Provenzani R., Marengo E., Weighted holistic invariant molecular descriptors. Part 2. Theory development and applications on modeling physicochemical properties of polyaromatic hydrocarbons, *Chemometr. Intell. Lab.* **1995**, *27*, 221-229.

**Tonegawa S.**, Somatic generation of antibody diversity, *Nature* **1983**, *302*, 575-581.

**Topinka J.**, Schwarz L. R., Kiefer F., Wiebel F. J., Gajdos O., Vidova P., Dobias L., Fried M., Sram R. J., Wolff T., DNA adduct formation in mammalian cell cultures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and nitro-PAH in coke oven emission extract, *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **1998**, *419*, 91-105.

**Traviesa-Alvarez J. M.**, Sánchez-Barragán I., Costa-Fernández 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.

**Tromberg J. T.**, Sepaniak M. J., Alarie J. P., Vo-Dinh T., Santella R. M., Development of antibody-based fiber-optic sensors for detection of a benzo[a]pyrene metabolite, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1901-1908.

**Turiel E.**, Martín-Esteban A., Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review, *Anal. Chim. Acta* **2010**, *668*, 87-99.

**Utsumi S.**, Stepwise cleavage of rabbit immunoglobulin G by papain and isolation of four types of biologically active Fc fragments, *Biochem. J.* **1969**, *112*, 343-355.

**Vatsavai K.**, Goicoechea H. C., Campiglia A. D., Direct quantification of monohydroxy-polycyclic aromatic hydrocarbons, *Anal. Biochem.* **2008**, *376*, 213-220.

**Veyrand B.**, Brosseaud A., Sarcher L., Varlet V., Monteau F., Marchand P., Andre F., Le Bizec B., Innovative method for determination of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons in food and oil samples using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry based on an isotope dilution approach, *J. Chromatogr. A* **2007**, *1149*, 333-344.

**Vo-Dinh T.**, Fetzer J., Campiglia A. D., Monitoring and characterization of polyaromatic compounds in the environment, *Talanta* **1998**, *47*, 943-969.

**Vreuls J. J.**, Jong G. J., Brikman U. A., On-line coupling of liquid chromatography, capillary gas chromatography and mass spectrometry for the determination and identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils, *Chromatographia* **1991**, *31*, 113-118.

**Walters J. M.**, Combes, R. D., Activation of benzo[a]pyrene and aflatoxin B1 to mutagenic chemical species by microsomal preparations from rat liver and small intestine in relation to microsomal epoxide hydrolase, *Mutagenesis* **1986**, *1*, 45-48.

**Wang G.**, Lee A. S., Lewis M., Kamath B., Archer R. K., Accelerated Solvent Extraction and gas chromatography/mass spectrometry for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food samples, *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1062-1066.

**Wang H.**, Campiglia A. 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 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.

**Waters** L. C., Palausky A., Counts R. W., Jenkins R. A., Experimental evaluation of two field test kits for the detection of PAHs by immunoassay, *Field Anal. Chem. Technol.* **1997**, *1*, 227-238.

**Weemen** B. K. van, Schuurs A. H. W. M., Immunoassay using antigen-enzyme conjugates, *FEBS Lett.* **1971**, *15*, 232-236.

**Weigle** W. O., Immunochemical properties of hemocyanin, *Immunochemistry* **1964**, *1*, 295-303.

**Weißhaar** R., Rapid determination of heavy polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002**, *104*, 282-285.

**Whitcombe** M. J., Rodriguez M. E., Villar P., Vulfson E. N., A new method for introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting: Synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7105-7111.

**Wiencke** J. K., DNA adduct burden and tobacco carcinogenesis, *Oncogene* **2002**, *21*, 7376-7391.

**Wijeratne** M. C. P., Samarajeewa U., Rodrigo M. C. P., Polycyclic aromatic hydrocarbons in coconut kernel products, *J. Nat. Sci. Coun. Sri Lanka* **1996**, *24*, 285-297.

**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.

**Wilson** D. S., Wu J., Peluso P., Nock S., Improved method for pepsinolysis of mouse IgG<sub>1</sub> molecules to F(ab')<sub>2</sub> fragments, *J. Immunol. Methods* **2002**, *260*, 29-36.

**Wingfors** H., Sjödin Å., Haglund P., Brorström-Lunden E., Characterisation and determination of profiles of polycyclic aromatic hydrocarbons in a traffic tunnel in Gothenburg, Sweden, *Atmos. Environ.* **2001**, *35*, 6361-6369.

**Winklmaier** M., Weller M. G., Mangler J., Schlosshauer B., Niessner R., Development of a highly sensitive enzyme-immunoassay for the determination of triazine herbicides, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1997**, 358, 614-622.

**Winter** G., Milstein C., Man-made antibodies, *Nature* **1991**, 349, 293-299.

**Wulff** G., Sarhan A., Über die Anwendung von enzymanalog gebauten Polymeren zur Racemattrennung, *Angew. Chem.* **1972**, 84, 364.

**Xi** J., Zhong B.-J., Soot in diesel combustion systems, *Chem. Eng. Technol.* **2006**, 29, 665-673.

**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.

**Yalow** R. S., Berson S. A., Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods, *Nature* **1959**, 184, 1648-1649.

**Yamaguchi** Y., Kim H., Kato K., Masuda K., Shimada I., Arata Y., Proteolytic fragmentation with high specificity of mouse immunoglobulin G, *J. Immunol. Methods* **1995**, 181, 259-267.

**Yan** H., Qiao F., Row K. H., Molecularly imprinted-matrix solid-phase dispersion for selective extraction of five fluoroquinolones in eggs and tissue, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 8242-8248.

**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* **2007a**, 1164, 153-161.

**Yang J. J.**, Roy T. A., Krueger A. J., Nell W., Mackerer C. R., In vitro and in vivo percutaneous absorption of benzo[a]pyrene from petroleum crude-fortified soil in the rat, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1989**, *43*, 207-214.

**Yang S. K.**, Stereoselectivity of cytochrome P-450 isozymes and epoxide hydrolase in the metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 61-70.

**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.

**Yuan Q.**, Wang Z., Nian S., Yin Y., Cheng G., Xia Y., Screening of high-affinity scFvs from a ribosome displayed library using BIAcore biosensor, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2009**, *152*, 224-234.

**Zhang Z.**, Pan H., Chen X., Mass spectrometry for structural characterization of therapeutic antibodies, *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *28*, 147-176.

**Zhao Y.**, Gutshall L., Jiang H., Baker A., Beil E., Obmolova G., Carton J., Taudte S., Amegadzie B., Two routes for production and purification of Fab fragments in biopharmaceutical discovery research: Papain digestion of mAb and transient expression in mammalian cells, *Protein Express. Purif.* **2009**, *67*, 182-189.

**Zhu X.**, Cai J., Yang J., Su Q., Yun G., Film coated with molecularly imprinted polymers for the selective stir bar sorption extraction of monocrotophos, *J. Chromatogr. A* **2006**, *1131*, 37-44.

**Zühlke J.**, Knopp D., Niessner R., Determination of 1-nitropyrene with enzyme-linked immunosorbent assay versus high-performance column switching technique, *J. Chromatogr. A* **1998**, *807*, 209-217.