

Lehrstuhl für Zellbiologie der Technischen Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan
Univ.-Prof. Dr. Bertold Hock

**Entwicklung von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern zum
Nachweis von Domoinsäure**

Matthias Kania

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Agrarwissenschaften (Dr. agr.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. Huber
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. B. Hock
2. Univ.-Prof. Dr. S. Scherer

Die Dissertation wurde am 14.05.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 10.07.2002 angenommen.

*Und alles Wasser wurde zu Blut,
und die Fische im Strom starben,
und der Strom wurde stinkend,
so dass die Ägypter das Wasser
aus dem Nil nicht trinken konnten;
und es war Blut in ganz
Ägyptenland
(Mose 7, 20-21)*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung.....	1
1.2	Domoinsäure.....	3
1.2.1	Klassifizierung, Vorkommen und Wirkung.....	3
1.2.2	Biosynthese und Einflussfaktoren auf die Domoinsäureproduktion.....	4
1.2.3	Domoinsäure-Analytik	6
1.3	Immunologische Methoden.....	8
1.3.1	Struktur von Antikörpern	8
1.3.2	Herstellung von Antikörpern.....	10
1.3.2.1	Gewinnung von polyklonalen Antikörpern.....	11
1.3.2.2	Herstellung monoklonaler Antikörper.....	12
1.3.3	Immunoassays	15
1.4	Ziele.....	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Material.....	17
2.1.1	Allgemeine Chemikalien.....	17
2.1.2	Immunreagenzien.....	18
2.1.3	Chromatographiereagenzien.....	18
2.1.4	Zellkulturmedien	18
2.1.5	Pufferlösungen.....	20
2.1.6	Verbrauchsmaterial.....	23
2.1.7	Geräte und sonstige Bedarfsgegenstände	23
2.2	Methoden.....	25
2.2.1	Synthese und Charakterisierung von Domoinsäure-Protein-Konjugaten.	25

2.2.1.1	Konjugat-Synthese	25
2.2.1.2	Konjugat-Charakterisierung	27
2.2.2	Herstellung polyklonaler Antikörper.....	28
2.2.3	Herstellung monoklonaler Antikörper.....	30
2.2.3.1	Immunisierung.....	30
2.2.3.2	Zellfusion.....	32
2.2.3.3	HAZ-Selektion	33
2.2.3.4	Klonieren von Hybridomzellen.....	33
2.2.3.5	Screening von Anti-DO Antikörpern produzierenden Zelllinien.....	34
2.2.3.6	Cryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	37
2.2.3.7	Massenproduktion von monoklonalen Antikörpern.....	38
2.2.3.8	Subklassenbestimmung	40
2.2.3.9	Aufreinigung und Konzentrierung von monoklonalen Antikörpern.	41
2.2.3.10	Bestimmung der Immunglobulinkonzentration.....	43
2.2.4	Entwicklung eines kompetitiven ELISA.....	45
2.2.5	Entwicklung eines kompetitiven ELISA mit Verstärkersystem.....	47
2.2.6	Berechnung der Domsäurekonzentrationen	50
2.2.7	Bestimmung von Kreuzreaktivitäten.....	51
2.2.8	Probenmessung.....	53
2.2.8.1	Probenaufbereitung.....	53
2.2.8.2	Methanol-Kompatibilität des mAk 4D1D.....	54
2.2.8.3	Wiederfindungsraten von DO im ELISA.....	54
2.2.8.4	Probenaufstockung	54
2.2.9	Messung im BIAcore.....	55
2.2.9.1	Grundlagen.....	55
2.2.9.2	Messablauf.....	56

3	Ergebnisse.....	59
3.1	Konjugatsynthese und Charakterisierung.....	59
3.2	Polyklonale Antikörper	62
3.2.1	Immunisierung und Serumgewinnung	62
3.2.2	DO-Enzymimmunoassay mit polyklonalen Antikörpern.....	64
3.2.2.1	Entwicklung eines Standard-ELISA.....	64
3.2.2.2	DO-Enzymimmunoassay mit Amplifizierungssystem.....	65
3.2.3	Bestimmung von Kreuzreaktivitäten.....	66
3.3	Entwicklung von monoklonalen Antikörpern gegen Domoinsäure	67
3.3.1	Immunisierung von Mäusen mit KLH-DO	67
3.3.2	Zellfusion.....	70
3.3.3	Screening der Zellkulturüberstände.....	70
3.4	Entwicklung eines Enzymimmunoassays zum Nachweis von Domoinsäure	72
3.4.1	Bestimmung der Immunglobulinsubklasse	74
3.4.2	Massenproduktion monoklonaler Antikörper.....	74
3.4.3	Reinigung und Konzentrierung von Antikörpern.....	77
3.5	Standardisierung und Optimierung eines Enzymimmunoassay zum Nachweis von Domoinsäure mit monoklonalen Antikörpern.....	79
3.5.1	DO-ELISA mit Amplifizierungssystem.....	80
3.5.2	Bestimmung der Kreuzreaktivitäten des mAk 4D1D.....	81
3.6	Probenmessung.....	82
3.6.1	Methanol-Kompatibilität des mAk 4D1D.....	82
3.6.2	Ermittlung von Wiederfindungsraten.....	83
3.6.3	Bestimmung der DO-Konzentration von exponierten Muscheln.....	84
3.6.4	Realprobenmessung.....	86
3.7	BIAcore-Messungen.....	86

3.7.1	Bestimmung der Affinitätskonstanten mit dem BIAcore 3000 [®]	86
3.7.2	Kompetitiver BIAcore-Immunoassay	89
3.7.3	Kreuzreaktivitätsstudien mit dem BIAcore 3000 [®] und Chipregeneration.....	91
4	Diskussion	93
4.1	Konjugatsynthese und -charakterisierung	93
4.2	Immunisierung von Kaninchen und Mäusen.....	95
4.3	Polyklonale Antikörper	97
4.4	Monoklonale Antikörper	97
4.4.1	Zellfusion und Zellkultur.....	97
4.4.2	Massenproduktion und Aufreinigung.....	99
4.5	Entwicklung eines DO-Enzymimmunoassays	101
4.6	Probenmessung.....	104
4.7	Untersuchung der Antikörper-Antigen-Interaktionen.....	106
4.8	Ausblick.....	107
5	Zusammenfassung	109
6	Literatur	111

Abbildungen

Abbildung 1: Biosynthese von Domoinsäure	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Herstellung monoklonaler Antikörper.....	14
Abbildung 3: Synthese von KLH/OVA-DO-Konjugaten	26
Abbildung 4: Screeningverfahren von Zellkulturüberständen.....	36
Abbildung 5: Biofermenter Miniperm (a) und CL 350 (b)	39
Abbildung 6: Schematischer Aufbau des Standard-ELISA zum Nachweis von DO	46
Abbildung 7: Schematische Darstellung des ABC-ELISAs	49
Abbildung 8: Strukturen der zum Kreuzreaktivitätstest eingesetzten Verbindungen.....	52
Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines SPR-Systems	56
Abbildung 10: MALDI-TOF Spektren von OVA (a) und OVA-DO (b)	61
Abbildung 11: Checkerboardtitration des polyklonalen Antikörpers KDO 1/1	63
Abbildung 12: Kompetitiver ELISA des polyklonalen Antikörpers KDO 1/1	63
Abbildung 13: Kompetitiver ELISA des polyklonalen Antikörpers KDO 1/5	64
Abbildung 14: ABC-ELISA mit polyklonalen Antikörpers KDO 1/5	65
Abbildung 15: Kreuzreaktivitäten des polyklonalen Antikörpers KDO 1/5	66
Abbildung 16: Checkerboardtitration des polyklonalen Mousantiseraums M9	68
Abbildung 17: Kompetitiver ELISA mit polyklonalen Mousantisera.....	68
Abbildung 18: Titeranstieg von Mousantisera während einer Immunisierungsphase.....	69
Abbildung 19: Screening verschiedener Zellkulturüberstände	71
Abbildung 20: Kompetitiver ELISA mit ZKÜ 7D6C	73
Abbildung 21: Kompetitiver ELISA mit ZKÜ 9B10D	73
Abbildung 22: Kompetitiver ELISA mit ZKÜ 4D1D.....	74
Abbildung 23: Massenproduktion des mAk 4D1D im Biofermenter CL 350	76
Abbildung 24: Massenproduktion des mAk 4D1D im Biofermenter MiniPerm	76

Abbildung 25: Photometrische Bestimmung des Proteingehaltes von ZKÜ	78
Abbildung 26: SDS-Gel des mAk 4D1D	79
Abbildung 27: Optimierter ABC- und Standard-ELISA mit mAk 4D1D.....	81
Abbildung 28: Kreuzreaktivitäten des mAk 4D1D.....	82
Abbildung 29: Methanolkompatibilität des mAk 4D1D.....	83
Abbildung 30: Wiederfindungsraten von DO	84
Abbildung 31: Verteilung von DO in den unterschiedlichen Gewebearten exponierter Muscheln (<i>Anadonta</i> sp.).....	85
Abbildung 32: Verteilung von DO in den unterschiedlichen Gewebearten exponierter Muscheln (<i>Mytilus edulis</i>)	85
Abbildung 33: Sensogramm der Immobilisierung von OVA-DO auf dem Sensorchip	87
Abbildung 34: Bindung des mAk 4D1D an OVA-DO oder OVA.....	88
Abbildung 35: Fitting der Assoziationsrate.....	88
Abbildung 36: Fitting der Dissoziationsrate.....	89
Abbildung 37: Kompetitiver Immunoassay im Biosensor-Format	90
Abbildung 38: Kalibrationskurve des kompetitiven Immunoassay im Biosensorformat	90
Abbildung 39: Kreuzreaktivitäten des mAk 4D1D ermittelt mit dem BIAcore	91
Abbildung 40: Vollständige Regeneration des Sensorchips mit SDS 0,2 % HCl 10 mM	92

Tabellen

Tabelle 1: Häufig vorkommende aquatische Naturtoxine	2
Tabelle 2: Übersicht über unterschiedliche Nachweisverfahren von Domoinsäure	7
Tabelle 3: Immunisierungs- und Blutabnahmeschema für Kaninchen.	29
Tabelle 4: Immunisierungs- und Blutabnahmeschema für Mäuse.	31
Tabelle 5: Konzentration der Immun- und Beschichtungskonjugate.....	59
Tabelle 6: Vergleich der Kulturdaten von MiniPerm und CL 350.....	75
Tabelle 7: Vergleich der mit dem EIA und HPLC ermittelten Werte	86

Abkürzungen

A	Absorption
ABC	(Strept-)Avidin-Biotin-Komplex
Ak	Antikörper
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
CARD	catalyzed reporter deposition
cFA	komplettes Freund's Adjuvans
Da	Dalton
DO	Domainsäure
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
EIA	Enzym-Immunoassay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay+
Fc	kristallisierbarer konstanter Teil des Antikörpers
FG	Frischgewicht
FKS	Fötale Kälberserum
GC	Gaschromatographie
H	Hypoxanthin
HAZ	Hypoxanthin-Azaserin
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
IA	Immunoassay
iFA	inkomplettes Freund's Adjuvans
Ig	Immunglobulin
KA	Kaininsäure
kDa	Kilodalton
KLH	Hämocyanin (Keyhole Limpet Hemocyanin)
KR	Kreuzreaktivität
mAk	monoklonale Antikörper
MP	Magermilchpulver
MS	Massenspektrometrie
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NM	Normalmedium

OVA	Hühner-Ovalbumin
pAk	polyklonale Antikörper
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PEG	Polyethylenglykol
POD	Meerrettichperoxidase
RPMI 1640	Grundmedium für die Zellkultur („Roswell Park Memorial Institute“)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFM	Serumfreies Medium
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Umdrehungen
ZKÜ	Zellkulturüberstand

1 Einleitung

1.1 Einführung

Phytoplankton ist ein wichtiges Nahrungsmittel für alle filternden Schalentiere und Larven von Crustaceen und Fischen. Weltweit treten immer häufiger Massenvermehrungen von Algen in Binnen- und Küstengewässern auf. Die zunehmende Eutrophierung der Gewässer verbunden mit der globalen Klimaerwärmung wird hierfür verantwortlich gemacht. Viele Spezies produzieren nur harmlose Wasserverfärbungen, sogenannte Algenblüten. Diese können jedoch auch Fischsterben o.ä. verursachen, da sie dem Wasser unter ungünstigen Umständen viel Sauerstoff entziehen. Einige Arten produzieren jedoch auch hochgiftige Toxine. Von ca. 5000 marinen Phytoplanktonarten kommt es bei 300 Arten zu Algenblüten, während von diesen nur ca. 40 Arten Toxine produzieren (Van Apeldoorn *et al.*, 1999). Bei Aufnahme der Toxine kommt es zu Vergiftungserscheinungen bei Menschen, Haus- und Wildtieren, Wasservögeln und Fischen. Häufig kommt es auch durch den Verzehr von Fisch, Muscheln oder anderen Weichtieren zu ernsten Erkrankungen beim Menschen.

Als Toxinproduzenten kommen Bakterien, Cyanobakterien und Algen in Frage. Die akute Toxizität wird meist als LD₅₀-Wert ausgedrückt. Er gibt die innerhalb eines Zeitraumes tödliche Dosis („lethal dosis“) eines Wirkstoffes für 50 % der Versuchstiere wieder. Der LD₅₀-Wert der einzelnen Toxine ist dabei sehr unterschiedlich und liegt im Bereich zwischen µg/kg Körpergewicht und mg/kg Körpergewicht. Zum Vergleich liegt der LD₅₀-Wert des Kaliumcyanid bei ca. 800 µg/kg. Im Allgemeinen gehören diese Toxine zur Klasse der giftigsten Naturstoffe. Unter ihnen befinden sich sogar einige Toxine wie die Saxitoxine, die zu den gefährlichen Kampfstoffen gezählt werden (Bundesgesetzblatt, 1990). Einige von ihnen wirken neurotoxisch und können innerhalb von wenigen Minuten zum Tode führen. Andere wirken akut als auch chronisch lebertoxisch. Letztere wirken innerhalb weniger Stunden tödlich. Die aufgeführten Organismen kommen weltweit vor und haben sich an die unterschiedlichsten Lebensräume angepasst. Die verschiedenen Organismen leben sowohl im Süß- als auch im Meerwasser und bevorzugen gemäßigtes bis subtropisches Klima. Cyanobakterien wurden aber auch schon in antarktischen Gewässern gefunden (Hitzfeld *et al.*, 2000). Tabelle 1 gibt einen Überblick über die am häufigsten Naturtoxine, ihre Produzenten, ihr Vorkommen, ihre Wirkung auf den Organismus und den entsprechenden LD₅₀-Wert.

Tabelle 1: Häufig vorkommende aquatische Naturtoxine

Toxin	Habitat	Vorkommen	Produzent	Toxizität
Domoinsäure	Meerwasser	Fisch, Schalentiere	Diatomaeae <i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	Neurotoxin "Amnesic shellfish poisoning" (ASP); LD ₅₀ : 3 mg/kg
Kaininsäure	Meerwasser	Fisch, Schalentiere	Rotalgen <i>Digena simplex</i> (Rhodomelaceae)	Neurotoxin Anthelmintikum
Saxitoxin	Meerwasser	Fisch, Schalentiere	Dinoflagellates: <i>Alexandrium</i> (<i>Gonyaulax</i>)	Neurotoxin "Paralytic shellfish poisoning" (PSP); LD ₅₀ : 3-10 µg/kg
Brevetoxine	Meerwasser	Fisch, Schalentiere	Dinoflagellates: <i>Gymnodinium breve</i>	Neurotoxin "Neurotoxic shellfish poisoning" (NSP); LD ₅₀ : 0,2 mg/kg
Okadasäure	Meerwasser	Schalentiere	Dinoflagellates: <i>Dinophysis</i> und <i>Prococentrum</i>	Neurotoxin "Diarrhetic shellfish poisoning" (DSP); LD ₅₀ : 0,19 mg/kg
Ciguatoxin, Scaritoxin, Maitotoxin	Meerwasser	Fisch, Schalentiere	Dinoflagellates: <i>Gambierdiscus toxicus</i>	Neurotoxin "Ciguatera fish poisoning" (CSP); LD ₅₀ : 0,1-0,4 µg/kg
Tetrodotoxin	Meerwasser	Pufferfisch	Bakterien	Neurotoxin LD ₅₀ : 8-10 µg/kg
Anatoxine	Süßwasser	Süßwasser	Cyanobakterien: <i>Anabaena flos-aquae</i> ; <i>Oscillatoria</i> ; <i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Neurotoxine LD ₅₀ : 20-250 µg/kg
Microcystine	Süßwasser	Süßwasser	Cyanobakterien z.B. <i>Microcystis aeruginosa</i>	Hepatotoxine LD ₅₀ : 50-300 µg/kg
Nodularine	Süßwasser	Süßwasser	Cyanobakterien: <i>Nodularia spumigena</i>	Hepatotoxine; LD ₅₀ : 50-1200 µg/kg

1.2 Domoinsäure

1.2.1 Klassifizierung, Vorkommen und Wirkung

Im Winter 1987 traten bei Menschen, welche aus den Gewässern um Prince Edward Islands, Kanada, stammende Muscheln aßen, erhebliche Vergiftungserscheinungen auf. Dabei wurde eine Diatomee, nämlich *Pseudonitzschia pungens* f. *multiseries*, als Toxinproduzent entdeckt (Wright *et al.*, 1989). *Pseudonitzschia*-Arten zählen zur Familie der Bacillariophyceae (Diatomeae, Kieselalgen), Ordnung Pennales. Die Diatomeae sind mit über 10.000 Arten in 200 Gattungen eine Gruppe äußerst formenreicher, teilweise zu Bändern und Fächern vereiniger kokkaler Einzeller. Sie nehmen eine Sonderstellung durch den Besitz zweier innerhalb der äußeren Plasmaschicht gelagerter Silikatschalen ein. Die ältesten Diatomeen sind seit dem Jura bekannt. Ihre schon damals auftretende Massenvermehrung führte zu Gesteinsbildung wie Polierschiefer und Kieselgur (Straßburger, 1998). *Pseudonitzschia*-Arten sind weltweit verbreitet und kommen in allen Meeren vor. Optimales Wachstum und Photosynthesebedingungen finden sie zwischen 15 °C und 20 °C. Jedoch wurden schon Algenblüten bei Wassertemperaturen von 3 °C beobachtet (Van Apeldoorn *et al.*, 1999). Viel wichtiger als die Wassertemperatur scheint ausreichender Nährstoffgehalt und Licht im Wasser zu sein (Fryxell *et al.*, 1997).

Schalentiere akkumulieren die Phycotoxine entweder durch direkte Filtration der Algenzellen oder durch Aufnahme kontaminierter Organismen. Bei Aufnahme dieser Schalentiere mit der Nahrung kommt es dann zu Vergiftungserscheinungen. Domoinsäure (DO) ist ein Glutamat analog und bindet mit 100fach höherer Affinität als L-Glutamat an Glutamatrezeptoren. Die Rezeptoren sind für synaptische Reizleitungen im zentralen Nervensystem zuständig. DO greift vor allem die hippocampalen und die umliegenden Bereiche an, welche v.a. für das Erinnerungsvermögen zuständig sind (Peng *et al.*, 1994; Hampson und Manalo, 1998). Vergiftungen äußern sich vor allem durch Übelkeit, Krämpfe, Durchfall, Kopfschmerzen und Gedächtnisverlust. Bei konstitutionell schwachen Leuten kann dies bis zum Tode führen.

„Amnesic shellfish poisoning“ (ASP)-Ausbrüche treten insbesondere in den Regionen um Australien und Kalifornien auf. Es mehrt sich aber das Auftreten von ASP auch in Europa. So konnten Mitte bis Ende der neunziger Jahre mehrere ASP-Ausbrüche in den Niederlanden, in Dänemark, in Portugal, in Spanien und in England beobachtet werden (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

1.2.2 Biosynthese und Einflussfaktoren auf die Domoinsäureproduktion

Versuche zur Aufklärung der Biosynthese von Domoinsäure wurden von Douglas *et al.* (1992) und Ramsey *et al.* (1998) mit radioaktiv markiertem Acetat durchgeführt. Durch Analyse der radioaktiv markierten C-Atome wurde festgestellt, dass DO durch Kondensation einer Isoprenoideinheit mit aus dem Citratzyklus stammendem α -Ketoglutarat entsteht (Abb. 1). Dabei wird angenommen, dass die Biosynthese der beiden Derivate in verschiedenen Zellkompartimenten abläuft. Während der Citratzyklus in den Mitochondrien stattfindet, wird die Biosynthese der Isoprenoideinheit in den Chloroplasten durchgeführt (Ramsey *et al.*, 1998). Verschiedene Umweltfaktoren können unterschiedliche Auswirkungen auf das Wachstum, die Dominanz und die Toxinproduktion haben. Es ist sehr schwierig, Algenblüten und die damit verbundene Toxinproduktion vorauszusagen. Ein Wachstumsfaktor braucht nicht unbedingt zu einer Dominanz im Phytoplankton führen, da er auch anderen Organismen bessere Wachstumsbedingungen liefern kann. Dagegen kann ein limitierender Faktor aufgrund besserer Speicher- und Aufnahmemöglichkeiten zu einer Dominanz von Diatomen führen. Hauptsächlich werden Lichtintensität, Wassertemperatur, sowie der Nährstoffgehalt als wesentliche Einflussparameter auf die Toxinproduktion angesehen. Es wurde festgestellt, dass unter Phosphat- und Silikatmangel eine erhöhte Domoinsäureproduktion stattfindet (Pan *et al.*, 1996a; Pan *et al.*, 1996b). Diese Nährstofflimitationen fördern die Toxinproduktion dadurch, dass sie die Aktivitäten des Primärstoffwechsels reduzieren und somit energiereiche Komponenten wie ATP und NADPH für die Biosynthese von DO zur Verfügung stehen und weiterhin vermehrt Gene exprimiert werden, die für die Biosynthese notwendig sind (Pan *et al.*, 1998). Stattdessen wirkt sich ein Stickstoffmangel negativ auf die Toxinproduktion aus (Bates *et al.*, 1993). Da es sich bei DO um ein nitrogenes Toxin handelt, ist Stickstoff zur Synthese unbedingt notwendig (Pan *et al.*, 1998).

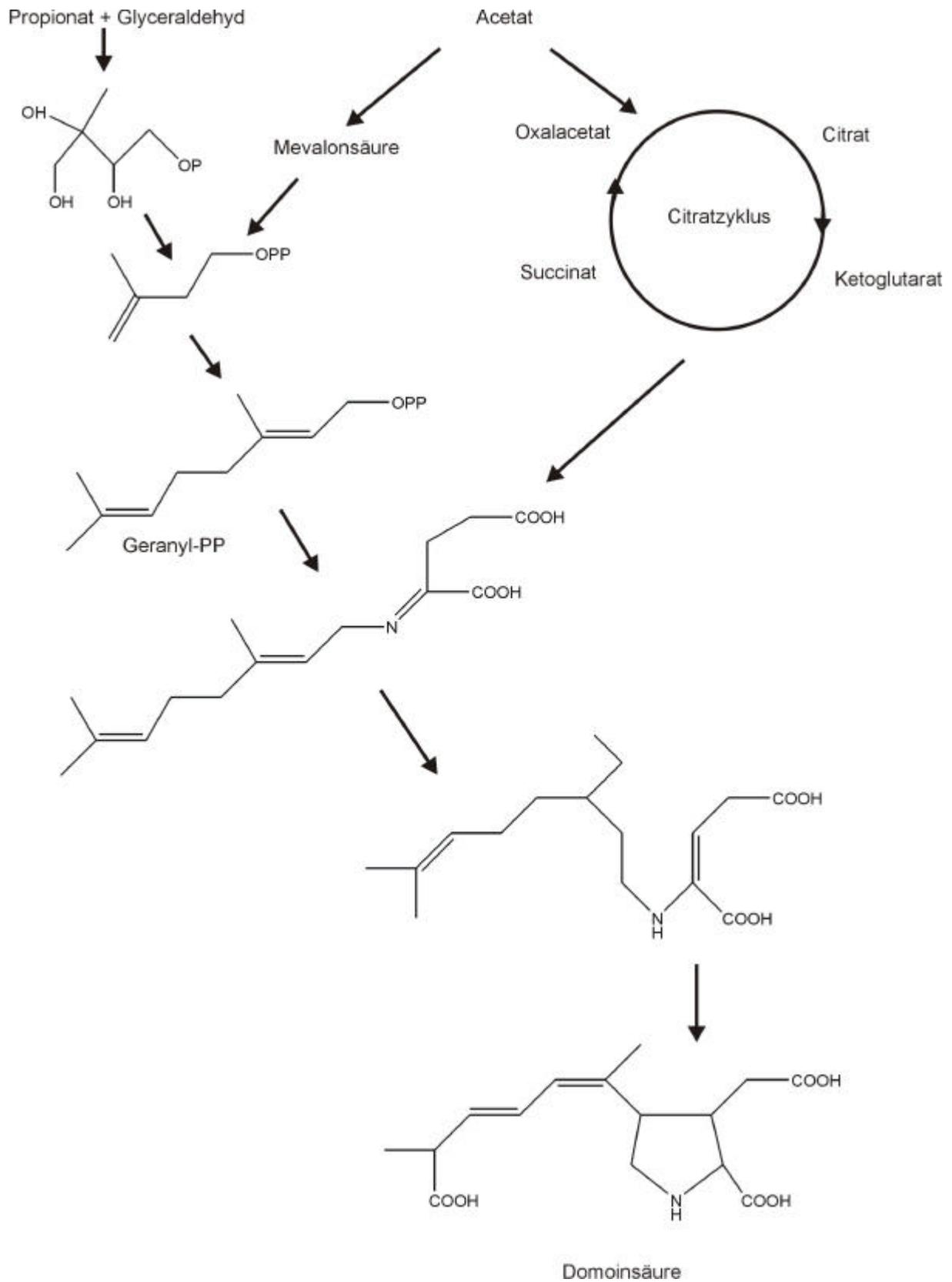


Abbildung 1: Biosynthese von Domoinsäure

1.2.3 Domoinsäure-Analytik

Zur Bestimmung von DO wurden bisher unterschiedliche Methoden entwickelt. Man unterscheidet zwischen chemischen und biochemischen Messmethoden und Bioassays. Einen Überblick über die bisherigen Messmethoden gibt Tabelle 2. Bei dem von Iverson *et al.* (1989) entwickelten Bioassay werden Mäusen wässrige Extrakte aus Muschelgewebe intraperitoneal injiziert. Daraufhin wird die Zeit von der Injektion bis zum Eintreten des Todes notiert. Stirbt die Maus innerhalb von 15 min liegt die DO-Konzentration über den Bereich des von der Association of Official Analytical Chemists (AOAC) festgesetzten Grenzwert von 20 µg DO/g Muschelgewebe. Obwohl der Bioassay DO in Muschelgewebe detektieren kann, ist er nicht dafür geeignet, dieses Toxin quantitativ zu detektieren. Dizer *et al.* (2001) untersuchte neurotoxische, immuntoxische und gentoxische Effekte in Muscheln bei Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen von DO. Aufgrund von Änderungen in der Phagozytoseaktivität könnte so auch unter Verzicht von Mäusen auf die DO-Konzentration geschlossen werden. Diese Tests befinden sich allerdings noch im Anfangsstadium. Routineuntersuchungen werden immer häufiger mit instrumentellen Messmethoden durchgeführt. Quilliam *et al.* (1998) konnten Domoinsäure mit Dünnschichtchromatographie (LC) bis zu einer Konzentration von 10 µg/g detektieren. Eine bessere Nachweisgrenze erreichten Lawrence *et al.* (1989) und Quilliam *et al.* (1989a, 1995) mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC). Letzterer konnte mit dieser Methode noch 20-30 ng/g detektieren. Diese Methode wird mittlerweile standardmäßig von der AOAC angewandt (Van Apeldoorn *et al.*, 1999). Eine einfache und schnelle Methode bietet die Kapillarelektrophorese (CE) (Nguyen *et al.*, 1990). Innerhalb von 10 min konnten Proben bis zu einer Konzentration von 2 µg/g bestimmt werden. Gerade bei wenig Probenvolumen bietet sich diese Methode an, da sie nur 3-15 nl Probenvolumen benötigt. Pleasance *et al.* (1990) verwendete zur Detektion Gaschromatographie verbunden mit Massenspektrometrie (GC-MS). Obwohl DO von 1-500 µg/g detektiert werden konnte, erfordert diese Meßmethode eine aufwändige Probenaufbereitung und ist deshalb für eine schnelle Bestimmung nicht geeignet. Bei den oben beschriebenen Methoden konnten dagegen direkt die Rohextrakte eingesetzt werden. Neben den klassisch-chemischen Messmethoden, finden in neuerer Zeit immer mehr bioanalytische Messungen Einzug in die quantitative Bestimmung von DO. Die Vorteile dieser Assays liegen in der einfachen Durchführbarkeit ohne teuren apparativen Aufwand sowie in einem hohen Probendurchsatz. Rezeptorassays und allen voran Immunoassays spielen dabei eine große Rolle. Rezeptorassays wurden von van Dolah *et al.* (1997) erwähnt. Dabei konkurrierte radioaktiv markierte Kaininsäure mit

Domoinsäure um die Bindungsstellen eines Glutamatrezeptors. Diese Methode zeigte eine gute Korrelation mit HPLC. Eine Probenvorbehandlung mit Glutamatdecarboxylase war jedoch aufgrund des hohen Anteils an endogenem Glutamat im Muschelgewebe notwendig.

Immunoassays auf Basis polyklonaler Antikörper wurden schon öfter in der Literatur beschrieben (Newsome *et al.*, 1991; Smith und Kitts, 1994 ; Smith und Kitts, 1995; Garthwaite *et al.*, 1998; Branaa *et al.*, 1999). Dabei wurden Messbereiche von 0,15-15 µg/l (Garthwaite *et al.*, 1998) bis mg/l (Smith und Kitts, 1994) erreicht. Obwohl die Probenmessung mit IA relativ schnell und einfach durchführbar ist, konnte sich bisher noch kein kommerzielles Testsystem etablieren. Dabei würden sie sich sehr gut als Screeningmethode eignen. Auch tragen sie dem Trend Rechnung, mittels Schnelltests Probenmessungen direkt vor Ort durchführen zu können.

Tabelle 2: Übersicht über unterschiedliche Nachweisverfahren von Domoinsäure

Assaytyp	Methode	Referenz
Chemische Analytik	LC	Quilliam <i>et al.</i> (1998)
	HPLC	Lawrence <i>et al.</i> (1989)
		Quilliam <i>et al.</i> (1989a)
		Quilliam <i>et al.</i> (1995)
CE	Nguyen <i>et al.</i> (1990)	
	GC-MS	Pleasance <i>et al.</i> (1990)
Bioanalytische Assays	Rezeptorassays	Van Dolah <i>et al.</i> (1994)
	Immunoassays	Newsome <i>et al.</i> (1991)
Smith und Kitts (1994)		
Smith und Kitts (1995)		
Garthwaite <i>et al.</i> (1998)		
Branaa <i>et al.</i> (1999)		
Bioassays	Mausbioassay	Iverson <i>et al.</i> (1989)
	Phagozytoseaktivität	Dizer <i>et al.</i> (2001)

1.3 Immunologische Methoden

Antikörper stellen das Rückgrat aller immunologischen Bestimmungsverfahren dar. Das Grundprinzip aller immunchemischer Reaktionen beruht auf der spezifischen Wechselwirkung von Antikörpern mit komplementären Strukturen eines Antigens. Aufgebaut sind die Antikörper aus über tausend einzelnen Aminosäuren. Die Struktur der Antikörper und ihre Bindungseigenschaften sind durch ihre Funktion innerhalb des Immunsystems bedingt. Die Struktur und die Bindungseigenschaften sind entscheidend für immunanalytische Verfahren wie Immunoassays.

1.3.1 Struktur von Antikörpern

Antikörper sind biochemisch gesehen Glykoproteine, die zur Klasse der Immunglobuline gehören und im Serum so wie in Körperflüssigkeiten von Wirbeltieren vorkommen. Sie dienen dem Immunsystem als Fänger und Marker körperfremder Substanzen. Markierte Fremdkörper werden anschließend von anderen Teilen des Immunsystems eliminiert. Ein Molekül, das die Bildung von Antikörpern auslöst, wird Immunogen genannt. Im Gegensatz dazu werden Substanzen, die aufgrund ihrer geringen Molekülgröße (< 1000 Da) keine Immunantwort hervorrufen, als Haptene bezeichnet. Primär nicht immunogene Substanzen können durch die Bindung an ein Trägerprotein immunogen werden.

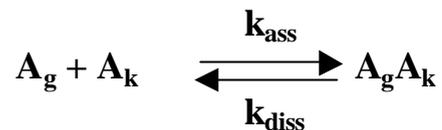
Immunglobuline lassen sich nach Struktur und Funktion in fünf verschiedene Klassen einteilen, nämlich IgG, IgM, IgA, IgD und IgE. IgG wird wegen Unterschieden in der Zusammensetzung der Polypeptidketten in vier Subklassen unterteilt (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3). Die Hauptkomponente im Blutserum mit einem Anteil von 70-80 % an der Immunglobulinfraktion stellt das IgG dar (Roitt *et al.*, 1995, Harlow und Lane, 1988). Das IgG-Molekül setzt sich aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Polypeptidketten sowie zwei Kohlenhydratresten zusammen. Jeweils eine lange Kette ist über Disulfidbrücken mit einer kurzen Kette verbunden, während zwischen den beiden langen Ketten weitere Disulfidbrücken die beiden Untereinheiten verbinden. Dies führt zu einer y-förmigen Struktur der Antikörper. Die Erkennung und Bindung eines Fremdstoffes erfolgt durch die variablen Regionen des Antikörpers. Diese werden jeweils aus einer schweren und leichten Kette gemeinsam gebildet.

Die Aminosäurezusammensetzung und die Länge einzelner Regionen sind im variablen Bereich extrem unterschiedlich. Diese Bereiche werden als hypervariable Region oder CDRs

(Complementary determining regions) bezeichnet. Die eigentlichen Bindungsstellen des Antikörpers werden aus drei hypervariablen Schleifen der leichten und drei hypervariablen Schleifen der schweren Kette gebildet. Diese Antigenbindungsstelle wird als Paratop bezeichnet. Der Kontakt zwischen Ak und Antigen erfolgt in den CDRs aber nur über wenige Aminosäuren (20-30 %); die Kontaktstellen werden als SDRs bezeichnet (specificity-determining residues) (Padlan *et al.*, 1995). Die übrigen Aminosäuren der CDRs tragen aber über ihre Ladung erheblich zur Bindung bei (Smith-Gill, 1994). Durch die proteolytischen Enzyme Papain und Pepsin lassen sich Antikörper in charakteristische Fragmente spalten. Papain trennt den Antikörper im Bereich der Gelenkregion in zwei identische Fab-Fragmente (fragment antigen binding) mit je einer Antigenbindungsstelle und in ein kristallisierbares F_c-Fragment (fragment crystallizing). Pepsin spaltet dagegen den Antikörper in ein F_{ab2}-Fragment, das aus zwei kovalent verbundenen F_{ab}-Fragmenten besteht. Der übrige Teil des Antikörpers wird in kleine Untereinheiten fragmentiert.

An der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung sind nur bestimmte Oberflächenstrukturen des Antigens beteiligt. Diese sogenannten antigenen Determinanten oder Epitope (Alzari *et al.*, 1988) sind etwa $4\text{-}34 \cdot 10^{-10}$ m groß und haben ein Molekulargewicht von 200-1.000 Da (Kabat, 1980). Die Stabilisierung der Wechselwirkung wird durch Coulomb-Kräfte, van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen sowie Ca²⁺-Brücken erreicht (van Oss, 1992). Webster *et al.* (1994) stellte fest, dass die Selektivität der Bindung mit der Anzahl gebildeter Wasserstoffbrücken zunimmt, da deren Energiebeitrag von der gegenseitigen Orientierung der beiden Bindungspartner abhängt. Einzeln betrachtet sind all diese Bindungsenergien relativ schwach, die Summe aller Bindungskräfte ergibt jedoch eine beachtliche Bindungsenergie. Die nichtkovalenten Kräfte sind ganz wesentlich vom Abstand (d) zwischen den reagierenden Gruppen abhängig. Die Energie ist proportional $1/d^2$ bei elektrostatischen Kräften und $1/d^7$ bei van der Waals-Kräften. Folglich müssen die beteiligten Gruppen eng molekular beieinander stehen, damit diese Kräfte wirksam werden können. Dieses setzt ein hohes Maß an Komplementarität zwischen Paratop und Antigen voraus. Wenn sich jedoch die Elektronenwolken des Antigens und Antikörpers zufällig überlappen, treten sterische Abstoßungskräfte (F) auf, die indirekt proportional zur zwölften Potenz des Abstands zu den Wolken sind ($F \approx 1/d^{12}$) (Roitt *et al.*, 1995). Diese Kräfte prägen die Spezifität des Antikörpermoleküls für ein bestimmtes Antigen und die Fähigkeit zwischen Antigenen zu unterscheiden, weil jede Abweichung von der idealen, komplementären Form einen Abfall der totalen Bindungsenergie durch erhöhte Abstoßungs- und erniedrigter Anziehungskräfte zur Folge hat.

Die Spezifität eines Antikörpers drückt sich in der Kreuzreaktivität aus. Die Kraft einer einzelnen Antigen-Antikörperbindung wird Affinität genannt. Sie stellt die Summe der anziehenden und abstoßenden Kräfte dar. Novotny (1992) stellte einen engen Zusammenhang zwischen Antikörperspezifität und –affinität fest. Die reversible Bindung zwischen dem Antigen und Antikörper lässt sich durch das Massenwirkungsgesetz bzw. durch folgenden thermodynamischen Zusammenhang definieren:



$$K = \frac{k_{\text{ass}}}{k_{\text{diss}}} = \frac{[A_g A_k]}{[A_g] [A_k]}$$

Mit	$[A_k]$	=	Konzentration des Antikörpers
	$[A_g]$	=	Konzentration des Antigens
	$[A_g A_k]$	=	Konzentration des Antikörper-Antigen-Komplex
	k_{diss}	=	Dissoziationskonstante
	k_{ass}	=	Assoziationskonstante
	K	=	Affinitätskonstante

Die Affinitätskonstanten der Antikörper zu den Antigenen liegen meist im Bereich von 10^4 bis 10^{10} MoF^{-1} . Der Kehrwert der Assoziationskonstante wird als Dissoziationskonstante bezeichnet. Dieser Begriff darf allerdings nicht als Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation des Antigen-Antikörperkomplexes verstanden werden.

1.3.2 Herstellung von Antikörpern

Im Jahre 1890 entdeckten von Behring und Kitasato, dass das Blutserum einer geimpften Person Antikörper enthält, welche spezifisch an einem bestimmten Krankheitserreger binden (Janeway u. Travers, 1995) und schufen damit den Grundstein für die moderne Immunologie. Ungefähr 70 Jahre später stellten Medawar und Burnet die Theorie zur klonalen Selektion der B-Zellen vor und erklärten so die Bildung der monospezifischen Antikörper (Mitchison, 1990). Zu Beginn der modernen Immunologie war es nur möglich, gewünschte Antikörper in Form von polyklonalen Antiseren (pAk), einem Gemisch von Ak unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität, zu gewinnen. Mit der von Köhler und Milstein (1975) entwickelten Metho-

de der Hybridomtechnologie konnten erstmalig monoklonale Antikörper (mAk) hergestellt werden. Diese konnten den Wunsch nach einen unbegrenzten Vorrat an Antikörpern gleicher Spezifität und Affinität erfüllen. Neben dem pAk und mAk haben sich mittlerweile auch rekombinante Antikörper (rAk) etabliert. Better *et al.* (1988) sowie Skerra und Plückthun (1988) beschrieben erstmals eine Methode zur Produktion von rAks in Bakterien. Der Vorteil dieser Methode liegt in der gezielten Veränderung der Ak auf Genebene und damit der Modifikation, Affinität und Spezifität. In jüngster Zeit wurden sogenannte „Molekular Imprinted Polymers“ (MIPs) entwickelt, welche durch selektive Wechselwirkung einzelne Analyten erkennen können. MIPs werden durch Polymerisation der Trägersubstanz in Gegenwart des Analyten hergestellt. Nach dem Aushärten des Polymers erfolgt die Extrahierung des Analyten, welcher dadurch Abdrücke im Polymer hinterlässt. Die Affinität der MIPs ist bisher jedoch wesentlich niedriger als die der Antikörper (Ansell *et al.*, 1996). Seit der Entdeckung katalytisch aktiver RNA, also von RNA, die in spezifische dreidimensionale Formen faltet und ähnlich einem Protein Reaktionen katalysieren kann, ist vor allem die Selektion neuer Enzyme auf RNA und DNA Basis in den Vordergrund der Forschung gerückt. DNA und RNA Moleküle können auch, ähnlich Antikörpern hochspezifisch kleine Moleküle oder Proteine molekular binden. Ein zweites Ziel der evolutiven Methoden ist die Erzeugung hochspezifischer Rezeptoren auf DNA oder RNA Basis, die zum Beispiel medizinisch relevante Proteine binden können. Diese Rezeptoren nennt man Aptamere. Aptamere können aus Gemischen von Billionen zufällig erzeugter Sequenzen über die feste Bindung an ihren Bindungspartner herausgesucht werden. Die dazu notwendigen Methoden wurden in der 90er Jahren von Jack Szostak und von Larry Gold in den USA entwickelt (Burgstaller *et al.*, 1994; Famulok, 1994). Die neu identifizierten funktionellen Nukleinsäuren werden als Werkzeuge in der Biochemie, für die Suche von neuen Medikamenten, für die Aufklärung der Funktion von Biomolekülen, die Enzymologie and als Hilfsmittel für Problemstellungen im Zusammenhang mit der Frage nach der frühen Evolution des Lebens eingesetzt (Klug *et al.*, 1999; Proske *et al.*, 2002).

1.3.2.1 Gewinnung von polyklonalen Antikörpern

Immunogen wirken alle körperfremden Stoffe, die eine Molmasse größer als ca. 1000 Da haben (Peters und Baumgarten, 1990). Domoinsäure ist somit aufgrund seiner Größe von 311,3 Da nicht in der Lage, eine Immunantwort auszulösen. Zur Gewinnung von Ak ist es deshalb nötig, das Hapten an Trägermoleküle zu koppeln. Als Trägermoleküle werden häufig Proteine eingesetzt, die den immunisierten Tieren artfremd sind. Dies können Albumine aus Rinderse-

rum (BSA) oder Hühnereiern (OVA) oder Hämocyanine aus Schnecken (KLH) sein. Vor allem letzteres hat sich als gutes Immunogen bewährt, da es Wirbeltieren artfremd ist. Diese Hapten-Konjugate werden dann Vertebraten, häufig Kaninchen und Mäusen, injiziert. Die Immunisierung erfolgt nach einem bestimmten Protokoll, welches die Art und das Alter der immunisierten Tiere, die Menge des applizierten Immunogens, die Art der Applikation, das verwendete Adjuvans, den Abstand zwischen den Immunisierungen und die Anzahl und Zeitpunkt der Blutabnahmen beschreibt. Das einfachste Verfahren, ist die Herstellung polyklonaler Antikörper (pAk). Die Gewinnung von pAk erfolgt aus dem Serum immunisierter Tiere. Häufig werden hierfür Kaninchen verwendet. Das Serum enthält Antikörper-Populationen, die eine Vielzahl verschiedener Epitope unterschiedlicher Antigene in unterschiedlichem Ausmaß erkennen. Oftmals lassen sich so auf schnellem Wege Antikörper mit hoher Affinität und Selektivität gewinnen.

1.3.2.2 Herstellung monoklonaler Antikörper

Antikörper, die gegen ein einziges Epitop einer immunogenen Substanz gerichtet sind und von einem einzigen B-Lymphozyten abstammen, werden monoklonal genannt. Die Vorteile von monoklonalen Antikörpern liegen in der unbegrenzten Verfügbarkeit und in der Tatsache, dass es sich um chemische Reinsubstanzen handelt. Für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern werden Mäuse mit einem Immunkonjugat immunisiert und die B-Lymphozyten gewonnen. Da die B-Lymphozyten nicht unbegrenzt in Gewebekultur wachsen können, werden sie mit Myelomzellen fusioniert. Diese Methode ermöglicht die Herstellung von Hybridomen, die sowohl die Fähigkeit zur Antikörpersynthese als auch die unbegrenzte Teilungsfähigkeit der Myelomzellen besitzen (Köhler und Milstein, 1975). Die zur Fusion verwendeten Myelomzellen weisen einen Stoffwechseldefekt im Nukleinsäuresyntheseweg auf. Ihnen fehlt das Enzym HGPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase). Sie können deshalb auf einem Hypoxanthin-Asazarin (HAZ)-haltigem Kulturmedium nicht überleben. Die Fähigkeit zu wachsen, erlangen sie erst, wenn sie mit Lymphozyten fusionieren. Auf diese Weise überleben nach der HAZ-Selektion nur Hybridomzellen, welche in einem anschließenden Screeningverfahren auf die Produktion von spezifischen Antikörpern getestet werden. Positive Zellhaufen werden mehrmals kontrolliert und kontinuierlich gescreent. Stabile Hybridomzellen, die den gewünschten Antikörper sezernieren, können anschließend für die Massenproduktion von mAk eingesetzt werden (Abb. 2). Die Herstellung von mAk ist im Gegensatz zur Produktion von pAk sehr zeitintensiv und aufwendig. Die Affinität von mo-

noklonalen Antikörpern liegt oftmals im Bereich derer von pAk. So erreichte Winkelmaier *et al.* (1997) mit monoklonalen Antikörpern eine vergleichbare Sensitivität in einem Immunoassay wie Wittmann und Hock (1989). Die Möglichkeit zur unbegrenzten Produktion von mAk sowie die einheitlichen Eigenschaften von mAk rechtfertigen jedoch den hohen Aufwand.

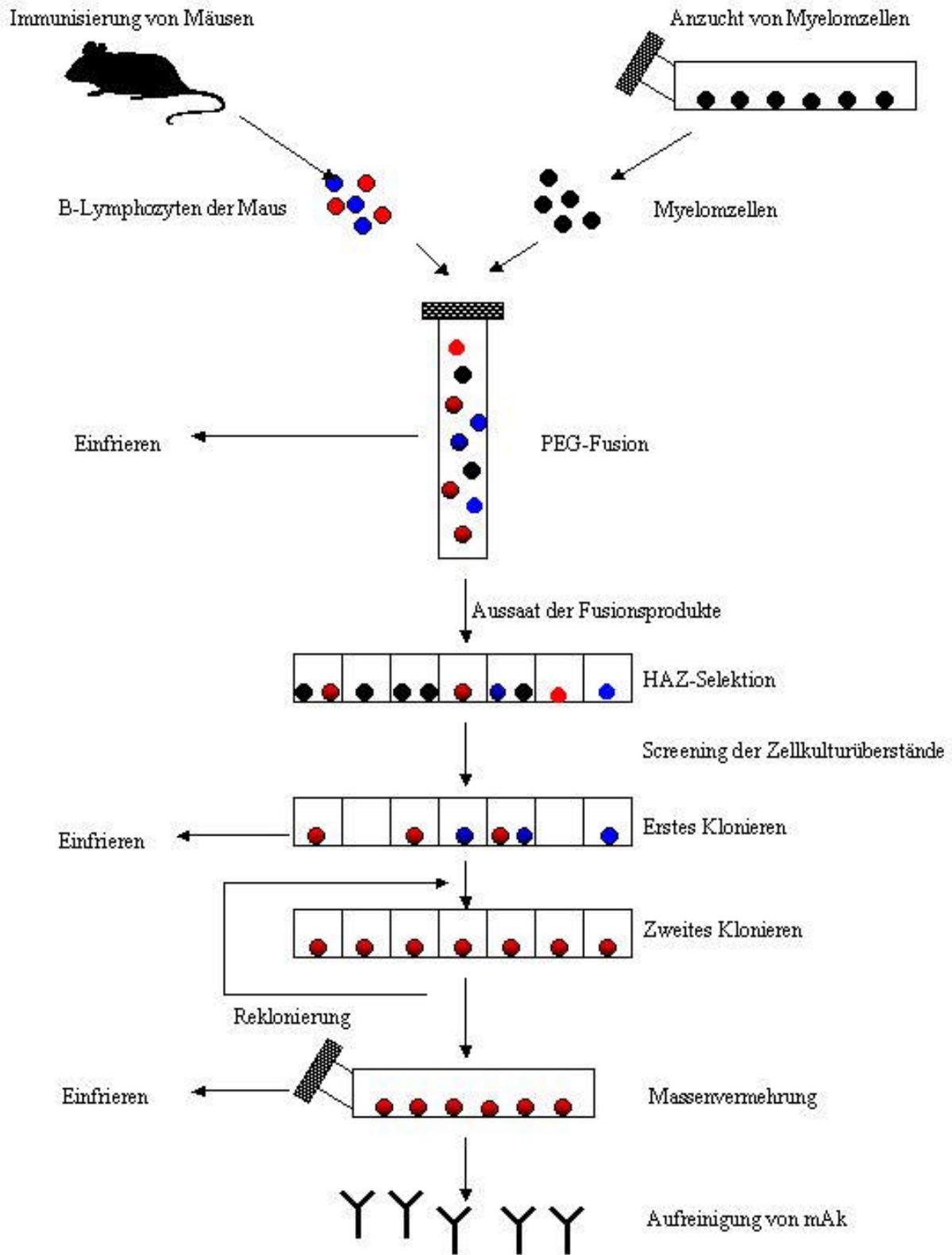


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Herstellung monoklonaler Antikörper

1.3.3 Immunoassays

Landsteiner (1933) entdeckte als einer der ersten, dass Immunsereen zum empfindlichen Nachweis von Proteinen eingesetzt werden können. In den ersten Jahren erfolgten immunochemische Nachweismethoden durch Immunpräzipitation und waren qualitativ Natur. Der eigentliche Durchbruch gelang aber Berson und Yalow (1956) mit der Entwicklung des Radioimmunoassays. Die Handhabung von Radioimmunoassays erwies sich durch schnellen Isotopenzerfall, Produktion von radioaktivem Abfall und ihre Unbrauchbarkeit für Feldstudien als unvorteilhaft. Als Alternative entwickelten Engvall und Perlmann (1971, 1972) den Enzymimmunoassay, bei dem enzymmarkierte Antikörper eingesetzt wurden. Die Möglichkeit der Enzymmarkierung und der Immobilisierung von Antikörpern auf festen Oberflächen führte zur Etablierung des „Enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA).

Um Immunoassays (IA) klassifizieren zu können, unterscheidet man homogene und heterogene IA. Dabei arbeiten die homogenen Assays ohne Phasentrennung, d.h. es erfolgt keine Trennung von gebundenen und ungebundenen Molekülen. Die Aktivität der Enzymmarkierung wird durch die Antigen-Antikörper-Reaktion beeinflusst. Beim heterogenen Immunoassay ist es nötig, die gebundenen von den ungebundenen Reaktionspartnern zu trennen, d.h. es ist ein Reaktionspartner an der Oberfläche eines Trägers immobilisiert, so dass Waschschriffe erforderlich sind. Weiterhin unterscheidet man bei den heterogenen IA zwischen kompetitiven und nicht-kompetitiven Tests (Rittenburg, 1991). Beim nicht-kompetitiven Testprinzip müssen im Allgemeinen Antigene mit mindestens zwei Epitopen vorliegen. Sie werden von auf einer Festphase immobilisierten spezifischen Antikörpern gebunden. Die Antigenkonzentration wird durch einen zweiten, markierten Antikörper bestimmt, der an den Analyten bindet. Beim kompetitiven Testprinzip konkurriert das Antigen bzw. Hapten aus der Probe mit einem markierten Antigen bzw. Hapten (Tracer) um eine limitierte Anzahl von Antikörperbindungsstellen oder mit einem immobilisierten Antigen um die Antikörperbindungsstellen eines gelösten, markierten Antikörpers. Man bezeichnet ersteres Format als direkten, letzteres als indirekten, heterogenen IA. Über die Markierung wird die Menge der nicht besetzten Bindungsstellen bestimmt, welche indirekt proportional zur Antigen- bzw. Haptenkonzentration ist.

Als Marker werden Radioisotope, Fluoreszenz-, Chemilumineszenzfarbstoffe oder Enzyme wie alkalische Phosphatase, β -Galactosidase oder Peroxidase verwendet. Letztere zeichnet sich besonders durch einfache Handhabung und hohen Substratumsatz aus. Zur Steigerung der Sensitivität stehen verschiedene Amplifizierungssysteme zur Verfügung, welche die Substratumsetzung erhöhen sollen (Bates, 1987). Dies gelingt beispielsweise durch den Einsatz

eines Biotin-Streptavidin-Systems. Streptavidin stammt von *Streptomyces avidinii* und besteht aus vier Untereinheiten, von denen jede ein Biotin-Molekül binden kann. Biotin bindet mit einer hohen Affinität an Streptavidin (Diamandis und Christopoulos, 1991). Durch Inkubation von Streptavidin mit einer genau definierten Menge an biotinylierter Peroxidase entstehen große Streptavidin-Biotin-Komplexe, die noch genau einen freien Bindungsplatz aufweisen. Diese Komplexe binden im ELSIA an biotinylierte Ak oder Analyten. So kann eine große Anzahl von Peroxidase-Molekülen immobilisiert werden, was sich in einem höheren Substratumsatz widerspiegelt. Somit können extrem niedrige Antikörperkonzentrationen eingesetzt werden, womit eine hohe Testsensitivität erreicht wird (Ekins *et al.*, 1989).

1.4 Ziele

Im Rahmen dieser Arbeit sollten monoklonale Antikörper gegen Domoinsäure hergestellt werden. Ziel war die Entwicklung eines Enzymimmunoassays zur Detektion von Domoinsäure im Muschelgewebe. Die Arbeit war Teil des EU-Projektes „The application of integrated biosensors with antibody and macrocyclic receptor libraries in the measurement of algal cells and toxins in water“ (ALGAETOX, ENV4-CT98-0784). Anfangs mussten geeignete Immunkonjugate synthetisiert werden, welche mit MALDI-TOF charakterisiert wurden. Parallel zu den monoklonalen Antikörpern wurden polyklonale Antikörper entwickelt, die zur Entwicklung eines Screeningsystems und für den Einsatz in Biosensoren dienen. Das Kaninchenantiserum der 5. Blutabnahme zeigte eine hohe Spezifität und Sensitivität zu DO. Zur Herstellung von mAk wurden die B-Lymphozyten einer Maus mit Myelomzellen fusioniert. Positive Hybridomlinien wurden vermehrt und die gewonnenen mAk charakterisiert. Der mAk 4D1D wurde zur Entwicklung und Optimierung eines EIA verwendet, mit dem reale Muschelproben ohne Matrixeffekt untersucht werden konnten. Mit diesen ELISA war es möglich, auf einer Mikrotiterplatte bis zu 10 Proben mit dreifacher Wiederholung in relativ kurzer Zeit zu testen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Chemikalien

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC)	Sigma, E-1769
2-Methyl-3-butensäure	Fluka, 66100
3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin	Sigma, T-2885
Asparaginsäure	Sigma, A-8949
Bicinchoninsäure	Sigma, B-9643
Biotin-POD-Konjugat	Sigma, P-9568
Borsäure	Merck, 1.00165
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, 1.02952
Domoinsäure	DCL, 1380
Ethanol	Merck, 1.00983
Excel Gel SDS Gradient 8-18	Pharmacia, 80125553
Excel Gel SDS Pufferstreifen	Pharmacia, 17134201
Freunds Adjuvans komplett	Sigma, F-5881
Freunds Adjuvans inkomplett	Sigma, F-5506
Gelatine	Merck, 1.04078
Geranylsäure	Fluka, 48813
Glutaminsäure	Sigma, G-8415
Harnstoffperoxid	Sigma, U-1753
Hühner-Ovalbumin	Sigma, A-5378
Kaininsäure	RBI, K-0250
Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)	Roche, 1376320
Natriumazid	Merck, 1.06688
Natriumcarbonat	Merck, 1.06392
Natriumchlorid	Merck, 1.06404
Natriumdihydrogenphosphat-monohydrat	Merck, 1.06346
Natriumhydrogencarbonat	Merck, 1.06329
di-Natriumhydrogenphosphat-dodecahydrat	Merck, 1.06579

Natriumhydroxid	Merck, 1.06498
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	Pierce, 24500
Polyethylenglykol (PEG) 1.500	Roche, 783641
ortho-Phosphorsäure	Merck, 1.00552
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, A-7906
Salpetersäure	Merck, 1.00452
Salzsäure 37%	Merck, 1.4747418
Schwefelsäure 95-97 %	Merck, 1.00731
Streptavidin-POD-Komplex	Roche, 1089153
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	ICN, 8.19623
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Merck, 8.22184
Wasserstoffperoxid	Merck, 1.08597
Zitronensäure	Merck, 8.18707

2.1.2 Immunreagenzien

Kaninchen-anti-Maus-IgG (Subklassenspezifisch)	Biorad, 172-2055
Ziege-anti-Kaninchen-IgG-POD	Sigma, A-6154
Ziege-anti-Maus-IgG-POD (Fc-spezifisch)	Sigma, A-2554
Ziege-anti-Maus-IgG-POD (ganzes Molekül)	Sigma, A-8924
Ziege-anti-Maus-IgG-Biotin	Sigma, B-7401
Ziege-anti-Maus-IgG	Sigma, M-5899

2.1.3 Chromatographiereagenzien

Protein A	Bioprocessing, 133-111-324
Protein A-Agarose	Roche, 1719408

2.1.4 Zellkulturmedien

2-Mercaptoethanol	Sigma, M-6250
Amphotericin	Sigma, A-2942
Antibiotika und -mykotika	Sigma, A-9909
BM-Condimed	Roche, 1088974

HAZ-Medium

Stammlösung (50 fach): 0,5 mg Azaserin und 6,8 mg Hypoxanthin in 10 ml NM lösen und bei 4 °C lagern.

3- bzw. 1-fach konzentriertes HAZ-Medium mit NM herstellen und bei –20 °C lagern.

Hypoxanthin-Stammlösung (10^{-2} mol/l)

136,1 mg Hypoxanthin in 100 ml H₂O dest. bei 60-70 °C für 1 h unter Rühren lösen.

Hypoxanthin-Medium

5,5 ml Hypoxanthin-Stammlösung sterilfiltriert in 500 ml NM geben (Lagerung bei –20 °C).

Einfriermedium

- 1) 70 ml RPMI 1640 mit Hepes
- 2) 20 ml FKS
- 3) 12 ml DMSO
- 4) 1 ml 10^{-3} Mercaptoethanol (frisch angesetzt)

2.1.5 Pufferlösungen

HBS-Puffer für BIAcore

- 1) 10 mM HEPES
- 2) 50 mM NaCl
- 3) 3,4 mM EDTA
- 4) 0.005% (v/v) Tenside P₂₀, pH 7.4

Borax/Boratpuffer (pH 8,7)

- 1) 0,2 mol/l H₃BO₄ und 0,05 mol NaCl
- 2) 0,05 mol/l Na₂B₄O₇ x 10 H₂O

393 ml von 1) zu 607 ml von 2)

Carbonatpuffer (50 mmol/l, pH 9,6)

1) 50 mmol/l NaHCO₃

2) 50 mmol/l Na₂CO₃

Lösung 1) vorlegen und von Lösung 2) solange zugeben, bis ein pH-Wert von 9,6 erreicht ist.

PBS (40mmol/l, pH 7,2)

1) 40 mmol Na₂HPO₄ x 12 H₂O

2) 40 mmol NaH₂PO₄ x H₂O

3) 0,15 mmol/l NaCl

Lösung 1) vorlegen und Lösung 2) zugeben, bis pH 7,2 erreicht ist, dann 3) zugeben.

PBS-Waschpuffer

100 ml PBS (40 mmol/l pH 7,2)

900 ml H₂O dest.

0,5 ml Tween 20

Puffer für die Protein A-Reinigung (High Capacity)

1) Bindungspuffer: 1 mol/l Boratpuffer, 0,15 mol/l NaCl, pH 8,5

6,2 g Borsäure

8,8 g NaCl

Auf 1 l mit H₂O dest. auffüllen und mit NaOH pH-Wert auf 8,5 einstellen.

2) Elutionspuffer: 0,1 mol/l Citratpuffer, pH 3

21 g Zitronensäure-Monohydrat

Auf 1 L mit H₂O dest. auffüllen und mit NaOH pH-Wert auf 3 einstellen.

3) Auffangpuffer: 2 mol/l Tris

Puffer für Protein-Reinigung (Protein A-Agarose)

1) Waschpuffer a)

100 mM Tris-HCL pH 8,0

2) Waschpuffer b)

10 nM Tris-HCL pH 8,0

3) Elutionspuffer

100 mM Glyzin pH 3,0

4) Neutralisierungspuffer

1,0 M Tris-HCL pH 8,0

POD-Substrat für ELISA

1) Chromogenlösung

1,2 mmol/l TMB

8 mmol/l H₃PO₄

DMSO

2) Substratpuffer

3,5 mmol/l Na₂HPO₄ x 12 H₂O

132 mmol/l NaH₂PO₄ x 12 H₂O

3 mmol/l Harnstoffperoxid

Vor Gebrauch 1 Teil Lösung 1) mit 2 Teilen Lösung 2) mischen.

2.1.6 Verbrauchsmaterial

Combitips 2,5 ml, 5 ml, 10 ml	Eppendorf
Cryoröhrchen, steril	Greiner
CM-5 Sensorchip	BIAcore
Dialyseschlauch	Serva
Fermenter CL 350	Integra
Glaspipetten 10 ml	Corning
Injektionskanülen	Braun
Mikrotiterplatten, F-Form	Greiner
Miniperm Versorgungsmodule	Vivascience
Miniperm Produktionsmodule	Vivascience
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1 ml, 2,5 ml, 5 ml	Sarstedt
Plastikpipetten, steril 10 ml, 20 ml, 50 ml	Greiner,
Plastikspritzen 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml	Braun,
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Sterilfilter 0,2 µm, 0,45 µm	Renner, Milipore, Sarstedt
Zellkulturplatten 6, 12, 24, 96 Kavitäten	Sarstedt, Greiner
Zellkulturflaschen 25, 225 cm ²	Renner, Sarstedt
Zentrifugenröhrchen 50 ml, 150 ml	Renner, Greiner

2.1.7 Geräte und sonstige Bedarfsgegenstände

BIAcore 3000 [®]	BIAcore
Brutschrank, BB 6220 CU	Heraeus
Durchflussphotometer, UV-1	Pharmacia
EIA-Photometer Titertek Multiscan Plus MK II	Flow Laboratories
Einfrierbox 5100	Nalgene
Elektrischer Pipettierhelfer	Integra
Elektronische Halb-Mikrowaage R 200 D	Sartorius
Gefriertrocknungsanlage, Hetosicc CD 53-1	Nunc
Horizontalschüttler	Virion
Magnetrührer	Janke & Kunkel

Mikroprozessor pH-Meter Portamess 752	Knick
Mikrotiterplatten-Waschautomat PW 96	Tecan
Objektführung	Hundt
Peristaltische Pumpe P3	Pharmacia
Rührzelle 8010 mit Membran XM 50 > 50.000 MW	Filtron
Schüttler Vortex VF 2	Janke & Kunkel
Sonikator Sonoplus GM 2000	Bandelin
Sterilbank Gelaire HF60	Flow Laboratories,
Sterilbank Laminair	Holten
Stickstofftank XC 47/11	MVE
Umkehrmikroskop Wilovert II	Hundt
Ultraschallbad, Bransonic 2200	Branson
Wasserbad Thermomix 1441	Braun
Zentrifuge Minifuge RF	Heraeus
Zentrifuge RC-5B	Sorvall

2.2 Methoden

2.2.1 Synthese und Charakterisierung von Domoinsäure-Protein-Konjugaten.

2.2.1.1 Konjugat-Synthese

Domoinsäure wirkt aufgrund seiner geringen Molekülgröße nicht als Antigen. Um eine Immunreaktion auslösen zu können, muss diese zuerst an hochmolekulare Trägerproteine gekoppelt werden. Zur Immunisierung wurde an KLH, zur Beschichtung von Mikrotiterplatten im ELISA an OVA gebunden. Da es sich bei DO um eine Tricarbonsäure handelt, bot sich eine Kopplung über Carbodiimid an.

Für diese Kopplungsreaktion wurden die Carboxylgruppen der Tricarbonsäure bei leicht saurem pH-Wert mit wasserlöslichem 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) aktiviert. Das Carbodiimid reagiert zuerst mit den verfügbaren Carboxylgruppen des Haptens, so dass als stark aktives Zwischenprodukt der Ortho-Acylisoharnstoff entsteht. Die aktivierte Carboxylgruppe geht mit den freien Aminogruppen (Lysinreste) des Proteins (KLH/OVA) eine Amidbindung ein (Abb.3), während EDC als löslicher Isoharnstoff vorliegt, welcher durch Zentrifugation entfernt werden kann. Es ist wichtig, im neutralen bis schwach saurem Milieu zu arbeiten, da H^+ -Ionen die Reaktion des aktiven Esters mit der Aminogruppe katalysieren (Erlanger, 1980).

Die Aktivierung der Carboxylgruppen erfolgte nach dem Protokoll von Smith und Kitts (1994) in Zusammenarbeit mit Dipl.-Chem. N. Schmiedeberg, Department für Organische Chemie, TU München, Garching. Hierfür wurden 2 mg KLH/OVA in 200 μ l dest. Wasser gelöst und 1 mg DO, welches in 520 μ l Konjugationspuffer gelöst war, zugegeben. Unter Rühren wurde tropfenweise 50 μ l einer EDC-Lösung hinzugegeben (10 mg/ml). Das Reaktionsgemisch inkubierte 2 h unter Rühren bei Raumtemperatur. Eine anschließende zehnmündige Zentrifugation bei 10.000 U/m entfernte den ausgefallenen Harnstoff. Um freie Domoinsäure vom entstandenen Konjugat zu trennen, wurden die Konjugate über drei Tage gegen H_2O dest. (sechs Wechsel) dialysiert und anschließend in Aliquots bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Zur Überprüfung des Kopplungserfolg wurde anfangs OVA-DO analog KLH-DO synthetisiert. MALDI-TOF diente zur Überprüfung des Kopplungserfolg von OVA-DO. Für den späteren Einsatz im ELSIA wurde die OVA-Konjugation mit geringerer Kopplungsdichte (3:1) durchgeführt. Die Synthese erfolgte analog der KLH-Konjugation mit der Ausnahme, dass zur

Kopplung nur 40 μg DO verwendet wurden. Die Überprüfung des Kopplungserfolges erfolgte wiederum mit MALDI-TOF.

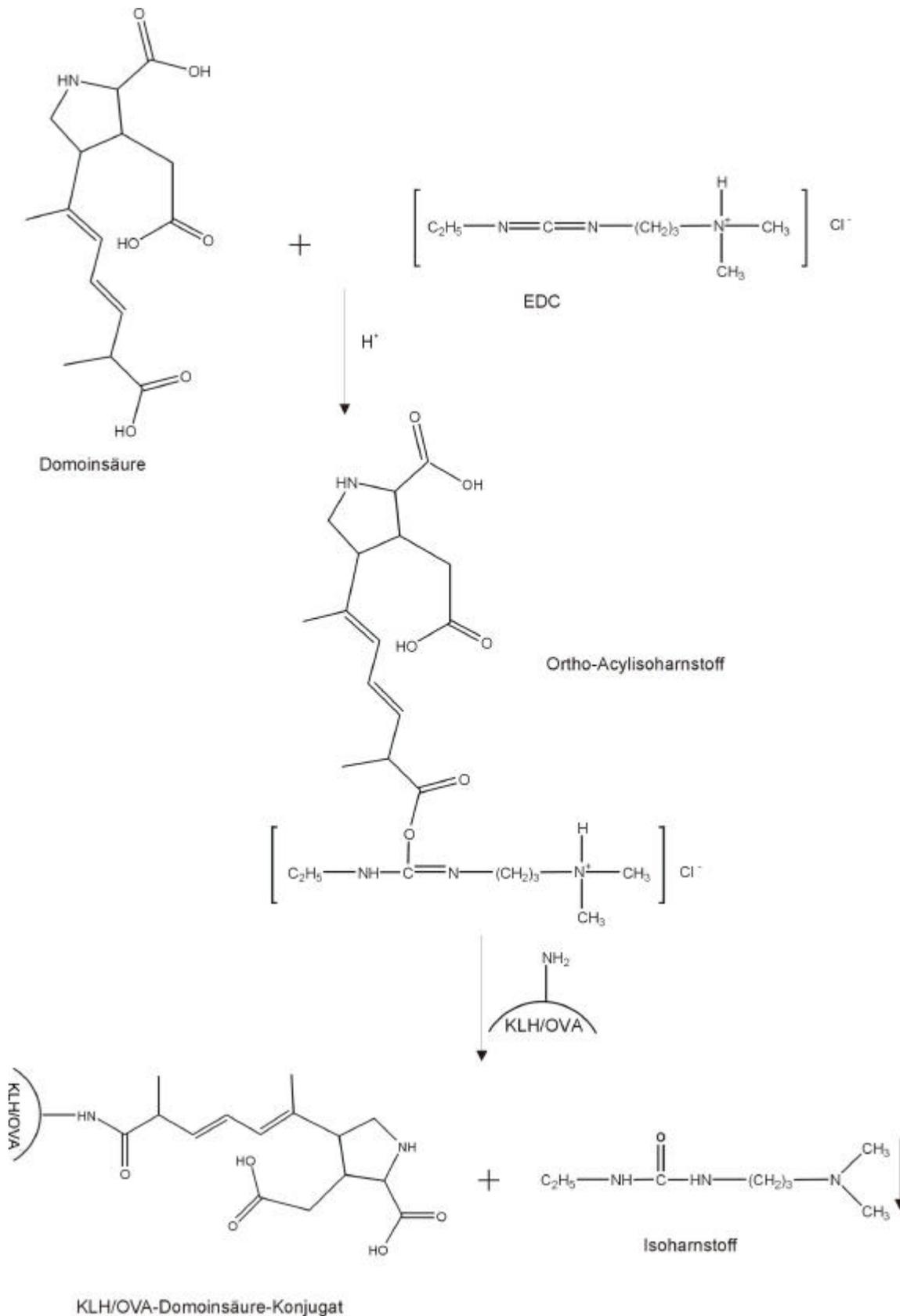


Abbildung 3: Synthese von KLH/OVA-DO-Konjugaten

2.2.1.2 Konjugat-Charakterisierung

Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Konjugate wurde mit Hilfe des BCA-Proteintests (Smith *et al.*, 1985) bestimmt. Im alkalischen Milieu reduzieren Proteine Cu^{2+} zu Cu^{1+} (Biuret-Reaktion). Kupfer (I)-Ionen bilden mit Bicinchoninsäure einen violetten Komplex, der photometrisch bei 562 nm ausgewertet werden kann. Zur Proteingehaltbestimmung wurden KLH- bzw. OVA-Proteinstandards (0,01-10 mg/ml) angesetzt. In die Kavitäten einer Mikrotiterplatte wurden jeweils 50 μl Standard bzw. Probe zusammen mit 200 μl BCA-Reagenz (50 Teile Bicinchoninsäure und 1 Teil CuSO_4 -Lösung) pipettiert. Die Platte inkubierte für 30 min bei 37 °C. Nach dem Abkühlen wurde die Absorption im EIA-Reader gemessen. Die Absorption bei 562 nm ist direkt proportional zur Proteinkonzentration. Die Proteinkonzentration der Konjugate wurde aus der Standardreihe graphisch bestimmt.

Massenspektrometrische Untersuchungen der DO-OVA Konjugate

Die MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) stellt ein wichtiges Instrument in der Analytik hochmolekularer Biomoleküle dar (Hillenkamp und Karas., 1991). Prinzipiell sind alle Polymerstoffe analysierbar. Eine brauchbare MALDI-TOF-MS bestimmt die Masse eines Proteins mit Molekülmassen von 30-40 kDa, aber auch bis zu 1000 kDa schwere Proteine wurden schon gemessen (Rehm, 1997). Es wurden Untersuchungen zu Kopplungsverhältnissen zwischen OVA und Domainsäure durchgeführt. Zur Bestimmung des molaren Bindungsverhältnisses wurden die Massen der Hapten-Protein-Konjugate und des nicht substituierten OVA bestimmt. Das als "mass fingerprinting" bezeichnete Verfahren der Bestimmung von Peptidmassen durch MALDI-TOF-MS dient der Identifizierung von Proteinen anhand des Vergleichs ihrer tryptischen Fragmente mit einem "in silico"-Verdau einer Datenbank bekannter Proteine. Dazu werden die tryptischen Peptide gemeinsam mit einer organischen Matrix (z.B. alpha-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure) auf einer metallischen Oberfläche co-kristallisiert. Die Matrixmoleküle ermöglichen die schonende Ionisierung der Peptide durch gepulsten Laserbeschuss niedriger Energie. Anschließend werden die Peptidionen unter Hochvakuum ($< 10^{-4}$ Pa) in einem elektrischen Feld beschleunigt und nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis getrennt. In der TOF-Einheit wird zu diesem Zweck sehr präzise die Flugzeit der Ionen gemessen. Ionen höherer Masse oder niedrigerer Ladung benötigen für die Flugstrecke länger als Ionen kleiner Masse oder

höherer Ladung. Da nach Laserionisierung häufig nur einfach positiv geladene Ionen entstehen, kann in den meisten Fällen von der Flugzeit direkt auf die Masse eines Peptidions geschlossen werden.

Die MALDI-TOF-MS-Untersuchungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Winkler, Department für Biologische Chemie, TU München, Centre of Life Science Weihenstephan, durchgeführt.

Bestimmung der Hapten-Dichte

Die Berechnung des molaren Verhältnisses von gekoppelter DO zum Trägerprotein, der sogenannten Haptendichte, erfolgte nach folgendem Schema:

$$\text{Haptendichte} = \frac{m(\text{Hapten}) \times \text{MG}(\text{Protein})}{m(\text{Protein}) \times \text{MG}(\text{Hapten})}$$

$m(\text{Hapten})$ = Masse des gekoppelten Haptens

$m(\text{Protein})$ = Masse des Trägerproteins

$\text{MG}(\text{Hapten})$ = Molekularmasse des DO-Hapten

$\text{MG}(\text{Protein})$ = Molekularmasse des Trägerproteins

2.2.2 Herstellung polyklonaler Antikörper

Ein Kaninchen wurde mit den Domainsäure-KLH-Konjugaten immunisiert. Hierfür injizierte man 200 µg Konjugat in 200 µl PBS und 200 µl komplettes Freund's Adjuvans. Die Immunisierung erfolgte dreimal im Abstand von sieben Tagen subkutan in der Nackenregion. Ab der fünften Woche erfolgte im vierwöchigen Abstand jeweils eine intramuskuläre Boosterinjektion mit derselben Immunogenzusammensetzung wie in Woche 1. Eine Woche und zwei Wochen nach jeder Bosterimmunisierung wurden ca. 20-30 ml Blut aus der Ohrvene entnommen (Tab. 3). Das Blut wurde in Bechergläsern aufgefangen und koagulierte bei Raumtemperatur. Das Serum wurde durch Filtration und Zentrifugation (10.000 U/min, 30 min) abgetrennt, aliquotiert, bei Bedarf lyophilisiert und bei -20 °C gelagert. Der Antikörpertiter der Seren wurde im EIA überprüft.

Tabelle 3: Immunisierungs- und Blutabnahmeschema für Kaninchen.

Woche	Arbeitsschritt
1	200 µg KLH-DO in 0,2 ml PBS lösen + 0,2 ml komplettes Freund's Adjuvans, subkutane Immunisierung
2	200 µg KLH-DO in 0,2 ml PBS lösen + 0,2 ml komplettes Freund's Adjuvans, subkutane Immunisierung
3	200 µg KLH-DO in 0,2 ml PBS lösen + 0,2 ml komplettes Freund's Adjuvans, subkutane Immunisierung
5	1. Boosterimmunisierung; intramuskuläre Injektion der Lösung wie in Woche 1
6	1. Blutabnahme
7	2. Blutabnahme
9	2. Boosterimmunisierung
10	3. Blutabnahme
11	4. Blutabnahme
13	3. Boosterimmunisierung
14	5. Blutabnahme
15	6. Blutabnahme

2.2.3 Herstellung monoklonaler Antikörper

Grundlegend für die Produktion von mAK ist die von Köhler und Milstein (1975) entwickelte Hybridomatechnologie, für deren Entwicklung ihnen 1984 der Nobelpreis für Medizin verliehen wurde. Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Werkbänken durchgeführt (Gelaire, Laminair). Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Kultur der Zellen in Normalmedium im Brutschrank (Heraeus) bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Gehalt zur Stabilisierung des pH-Wertes im Kulturmedium. Üblicherweise wurde das Nährmedium alle zwei bis drei Tage gewechselt. Sobald mehr als 2/3 des Ausgangsgefäßes mit Zellen bewachsen war, was einer Zelldichte von 10⁶ Zellen/ml entspricht (Harlow und Lane, 1988), wurden die Zellen auf das nächst größere Kulturgefäß umgesetzt. Zellen wurden als Sicherheitsreserve bei -80° C oder -196° C eingefroren. Eine Lagerung von bis zu einem Jahr wird bei -80° C ermöglicht (Patel und Brown, 1984). Hingegen können Zellen unbegrenzt bei -196° C in flüssigem Stickstoff konserviert werden (Peters und Baumgarten, 1990).

2.2.3.1 Immunisierung

Um die Immunantwort zu verstärken (Peters und Baumgarten, 1990), wurde die Immunisierung mit Adjuvantien durchgeführt. Zur Immunisierung wurden weibliche CD-1 Mäuse ausgewählt, die zum Zeitpunkt der ersten Immunisierung ungefähr 8-12 Wochen alt waren. Das Immunisierungsschema ist in der Tabelle 4 aufgeführt. Hierfür wurde in 4-wöchigem Abstand den Mäusen eine Emulsion bestehend aus 100 µl Immunkonjugat (0,64 mg/ml) und 100 µl Freund's Adjuvans injiziert. Bei der ersten Immunisierung wurde cFA, bei allen weiteren Immunisierungen iFA verwendet. Die Blutabnahme erfolgte jeweils sieben Tage nach der Immunisierung. Hierfür wurden ca. 10-20 µl Blut aus der Schwanzvene entnommen. Anschließend wurde das Blut ca. 1 h bei RT gelagert, das Serum bei 2.600 x g für 10 min bei RT zentrifugiert und in 10 µl-Portionen bei -20 °C für spätere Tests konserviert. Das Serum wurde im EIA auf positive AK getestet. Vier Tage vor der Zellfusion wurden täglich Boosterimmunisierungen mit sechsfacher Immunkonjugatmenge ohne Freund's Adjuvans durchgeführt.

Tabelle 4: Immunisierungs- und Blutabnahmeschema für Mäuse.

Woche	Arbeitsschritte
1	64 µg KLH-DO in 100 µl PBS + 100 µl cFA; intraperitoneale Injektion
3	64 µg KLH-DO in 100 µl PBS + 100 µl iFA; intraperitoneale Injektion
4	1. Blutabnahme
7	64 µg KLH-DO in 100 µl PBS + 100 µl iFA; intraperitoneale Injektion
8	2. Blutabnahme
11	64 µg KLH-DO in 100 µl PBS + 100 µl iFA; intraperitoneale Injektion
12	3. Blutabnahme
14	64 µg KLH-DO in 100 µl PBS + 100 µl iFA; intraperitoneale Injektion
15	4. Blutabnahme
15	4 Boosterimmunisierungen mit 400 µg KLH-DO an 4 aufeinanderfolgenden Tagen
16	Fusion

2.2.3.2 Zellfusion

Die Bauchhöhle der durch cervikale Dislokation getöteten Maus wurde geöffnet, die Milz unter sterilen Bedingungen herauspräpariert, in eine sterile Petrischale überführt und mittels einer Einmalspritze mit 10 ml 37 °C warmem RPMI 1640 abgewaschen. Anschließend wurden anhaftende Gewebereste entfernt und die Milz in eine zweite Petrischale übertragen. Die Milzzellen wurden durch Einspritzen von 20 ml RPMI 1640 mit einer Injektionspritze aus der Milz ausgespült bis ein heller Bindegewebesack zurückblieb. Nach zweimaligem Waschen durch Zentrifugation in 20 ml RPMI 1640 (jeweils 5 min bei 120 x g, RT) standen die Milzzellen zur Fusion bereit.

Myelomzellen vom Stamm PAI-B₃ Ag8I wurden als Fusionspartner hergenommen. Die Zellen wurden ca. 14 Tage vor der Fusion aufgetaut und im Normalmedium kultiviert. Für eine Fusion werden ca. 10⁸ Zellen benötigt, was etwa zwei gut bewachsenen großen Zellkulturflaschen (225 cm²) entspricht. Die Zellkulturflaschen werden vorsichtig abgeklopft, die Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min bei 120 x g, RT). Nach einem weiteren Wasch- und Zentrifugationsschritt wurden sie in 20 ml RPMI 1640 aufgenommen. Die Ermittlung der Lebendzellzahl erfolgte nach Trypanblau-Färbung in einer Neubauerzählkammer (Hämocytometer). Unter dem Mikroskop wurde die Anzahl der goldgelb erscheinenden und somit lebenden Zellen ausgezählt. Lebende Zellen erscheinen goldgelb, da sie kein Trypanblau aufnehmen. Die Gewinnung der Milz- und Myelomzellen erfolgten nach etablierten Standardverfahren (Giersch 1993 a und b).

Die Milz- und Myelomzellen wurden zusammen im Verhältnis 2:1 in ein Zentrifugenröhrchen vereint und 5 min bei 120 x g und RT zentrifugiert. Nach einem weiteren Wasch- und Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und die Restflüssigkeit oberhalb des Rückstands mit einer Pipette abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen im Wasserbad bei 37 °C mit einer Pipettenspitze gut gemischt und unter ständigem Drehen des Zentrifugenröhrchens 1 ml angewärmte PEG 1500-Lösung innerhalb 1 min beigemischt. Nach einer einminütigen Inkubation im Wasserbad wurden über einen Zeitraum von 4 min 4 ml RPMI 1640 tropfenweise hinzugefügt. Anschließend wurden 10 ml RPMI 1640 langsam zugetropft und für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein abermaliger Zentrifugationsschritt und eine Resuspension des Rückstandes in 20 ml NM mit 10 % Condimed. Circa 50 % der Zellsuspension wurde 1:10 mit NM (inklusive 10 % Condimed) verdünnt und auf 96er Zellkulturplatten verteilt (ca. 100 µl/Kavität). Die restliche Zellsuspension wurde für einen Tag im Brutschrank inkubiert und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.3.3 HAZ-Selektion

Bedingt durch das Gemisch aus nicht fusionierten Zellen, Mehrfachfusionsprodukten und Hybridomzellen, welches nach der Fusion vorliegt, ist eine Selektionsphase notwendig, die nur die gewünschten Hybridomzellen überleben lässt. Zur Entfernung nicht gewünschter Fusionsprodukte (z.B. Myelom/Myelom) sowie nicht fusionierter Myelomzellen, die aufgrund ihres schnelleren Wachstums die Hybridomzellen überwuchern würden, wurde eine Positivselektion mit HAZ-Medium durchgeführt. Nicht fusionierte B-Lymphozyten brauchen dagegen nicht speziell selektiert zu werden, da sie nach 10-14 Tagen unter *in vitro*-Bedingungen absterben. Zur Selektion wird ein Enzymdefekt ausgenutzt, den die zur Fusion angesetzte Myelomzelllinie PAI-B₃ Ag8I in der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) besitzt. Da die HGPRT⁽⁻⁾-Myelomzellen den Azaserin-Block des DNA-Hauptsyntheseweges durch den Einbau von supplementiertem Hypoxantin nicht umgehen können, werden die im Selektionsmedium kultivierten unerwünschten Myelomzellen sterben. Überleben können nur die Hybridome, die eine intakte HGPRT durch Fusion mit einer Milzzelle erhalten haben.

Nach 24 h Inkubationszeit wurden in jede Kavität der Aussaatplatte ca. 50 µl 3fach konzentriertes HAZ-Medium und 10 % Condimed zugegeben und die Platten im Brutschrank weiter inkubiert. Je nach Wachstum der Zellen wurde das Medium nach 3-7 Tagen vollständig abgesaugt und durch neues HAZ-Medium und 10 % Condimed ersetzt. Nach drei- bis viermaligem Mediumswechsel wurde das HAZ-Medium zur schonenden Gewöhnung der Zellen an Normalmedium durch Hypoxanthin-Medium und 10 % Condimed ersetzt. Nach zweimaligem Wechsel des H-Mediums, welcher im Abstand von 3 Tagen erfolgte, konnten die Zellen auf NM umgestellt werden. Ab dieser Phase wurden keine Zusatzstoffe mehr dem Medium beigegeben. Die Kulturplatten müssen während der ganzen Zellkultur auf Kontaminationen untersucht werden, um evtl. Schritte wie Zugabe von Antibiotika rechtzeitig einleiten zu können.

2.2.3.4 Klonieren von Hybridomzellen

Nachdem mittels Screeningverfahren Zellpopulationen mit positiven Zellkulturüberständen ermittelt wurden, mussten diese kloniert werden. Um sicherzustellen, dass die produzierten Antikörper von einer Zelllinie stammten und somit Ak mit einheitlichen Eigenschaften (monoklonale Antikörper) sezerniert wurden, wurden die entsprechenden Klone im weiteren Kulturverlauf mehrmals subkloniert. Das Wachstum der Klone wurde durch Zusatz von 10 %

Condimed zum Normalmedium gefördert. Die Klonierung erfolgte sowohl mittels Einzelzellablage als auch mit Endpunktverdünnung (limiting dilution).

Für die Einzelzellablage wurden die ersten 4 Kavitäten mit ca. 100 µl-Tropfen Kulturmedium gefüllt. Die Zellen aus einer positiven Kavität der Aussaatplatte wurden mit einer Pipette gut aufgewirbelt und ca. 50 µl in die erste Kavität der Klonplatte gegeben. Nach Durchmischung wurden hiervon 50 µl entnommen und in die zweite Kavität überführt. Ebenso wurde mit der 3. und 4. Kavität verfahren. Aus der Verdünnungsstufe, in der bei 100facher Vergrößerung unter dem Mikroskop ca. 10 Zellen zu erkennen waren, wurde nach Durchmischen der entsprechenden Zellsuspension ein Aliquot mit der Pipette entnommen und kleine, flache Tropfen auf die leeren Kavitätenböden pipettiert. Die Zellzahl pro Tropfen wurde anschließend unter dem Mikroskop bestimmt. Ziel war es, möglichst viele Kavitäten mit Einzelzellen zu erlangen. Ansonsten muss eine andere Verdünnungsstufe gewählt werden. Anschließend wurde jede Kavität mit 200 µl Kulturmedium befüllt und im Brutschrank inkubiert. Die Ablage der Tropfen erfolgte - ebenso wie das Befüllen mit Medium - reihenweise. Bei gelungener Klonierung sind nach 3-7 d wachsende Klone zu erkennen, welche erneut auf die Produktion von anti-DO Ak im EIA getestet wurden. Positive Kavitäten mit nur einem Klon wurden sowohl rekloniert als auch weiterkultiviert bis sie als Sicherheitsreserve eingefroren werden konnten.

Ebenso wurden im EIA positiv getestete Zellpopulationen mittels der Endpunktverdünnung (limiting dilution) kloniert. Ziel ist es, die Konzentration der Zellen im Kulturmedium so zu senken, dass pro Kavität statistisch gesehen eine Zelle vorkommt (Coller und Coller, 1983). Hierfür wurden die Hybridomzellen in der im EIA positiv getesteten Kavität mit einer Pipette aufgewirbelt, ein Aliquot entnommen und die Lebendzellzahl mittels einer Neubauerzählkammer und Trypanblaufärbung bestimmt. Anschließend wurde aus der Stammsuspension eine Verdünnung hergestellt, die in 20 ml ca. 100 Zellen enthält. Diese Verdünnung wurde auf eine Kulturplatte mit 200 µl/Kavität verteilt und im Brutschrank inkubiert. Die Näpfe mit einem anti-DO Ak produzierenden Klon wurden propagiert und später rekloniert. Von allen Zwischenstadien wurden Aliquots eingefroren.

2.2.3.5 Screening von anti-DO Antikörpern produzierenden Zelllinien

Ungefähr 10 Tage nach der Fusion wurden die Zellkulturüberstände der Aussaatplatten auf das Vorhandensein spezifischer anti-DO Ak im ELISA überprüft. Es handelte sich bei diesen Screeningverfahren um einen heterogenen Assay, so dass nach jedem Inkubationsschritt ein

Waschschrift nötig war. Jeder Zellkulturüberstand wurde hierfür zweimal getestet. Der ELISA wurde in 96er ELISA-Platten durchgeführt. Nach Beschichtung der ELISA-Platten mit 1 µg/ml OVA-DO wurden diese über Nacht bei 4 °C inkubiert. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden die ELISA-Platten daraufhin mit 1 % OVA (w/v) (300 µl/Kavität) für 1 h bei RT blockiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl PBS bzw. 100 µl Domoinsäure in einer Konzentration von 10 µg/ml in die Kavitäten einpipettiert, 100 µl ZKÜ hinzugefügt und für 1,5 h bei RT inkubiert. Im Falle, dass spezifische Ak im ZKÜ vorhanden waren, konnten diese in den Kontrollkavitäten am Beschichtungskonjugat binden, während dessen sie von der Domoinsäure in den Kavitäten mit DO-Überschuss von der freien DO verdrängt werden konnten (Abb. 4). Man pipettierte nun 200 µl/ Kavität eines Zg<ms>POD Sekundärantikörpers (1:20.000) und inkubierte die Platte für 1 h bei RT. Anschließend folgte die Zugabe von Substrat (200 µl /Kavität). Zeigte die Kontrolle eine Blaufärbung, die Kavität mit DO-Überschuss dagegen keine Enzymreaktion, deutete dies auf die gewünschten Ak hin. Durch die Aktivität der Peroxidase wurde H₂O₂ gespalten und das farblose 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin zum blaugefärbten Radikalkation oxidiert. Die Enzymreaktion stoppte man nach 20-30 min ohne vorherigen Waschschrift durch Zugabe von 50 µl 1M H₂SO₄ ab. Die Farbänderung von blau nach gelb erfolgte durch die Bildung von lichtstabilem 3,3', 5,5' Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diimoniumionen (Galatti und Pracht, 1985), deren Absorption im EIA-Photometer bei 450 nm bestimmt wurde.

Der Screening-ELISA wurde mindestens sechs Mal über einen Zeitraum von drei Wochen durchgeführt.

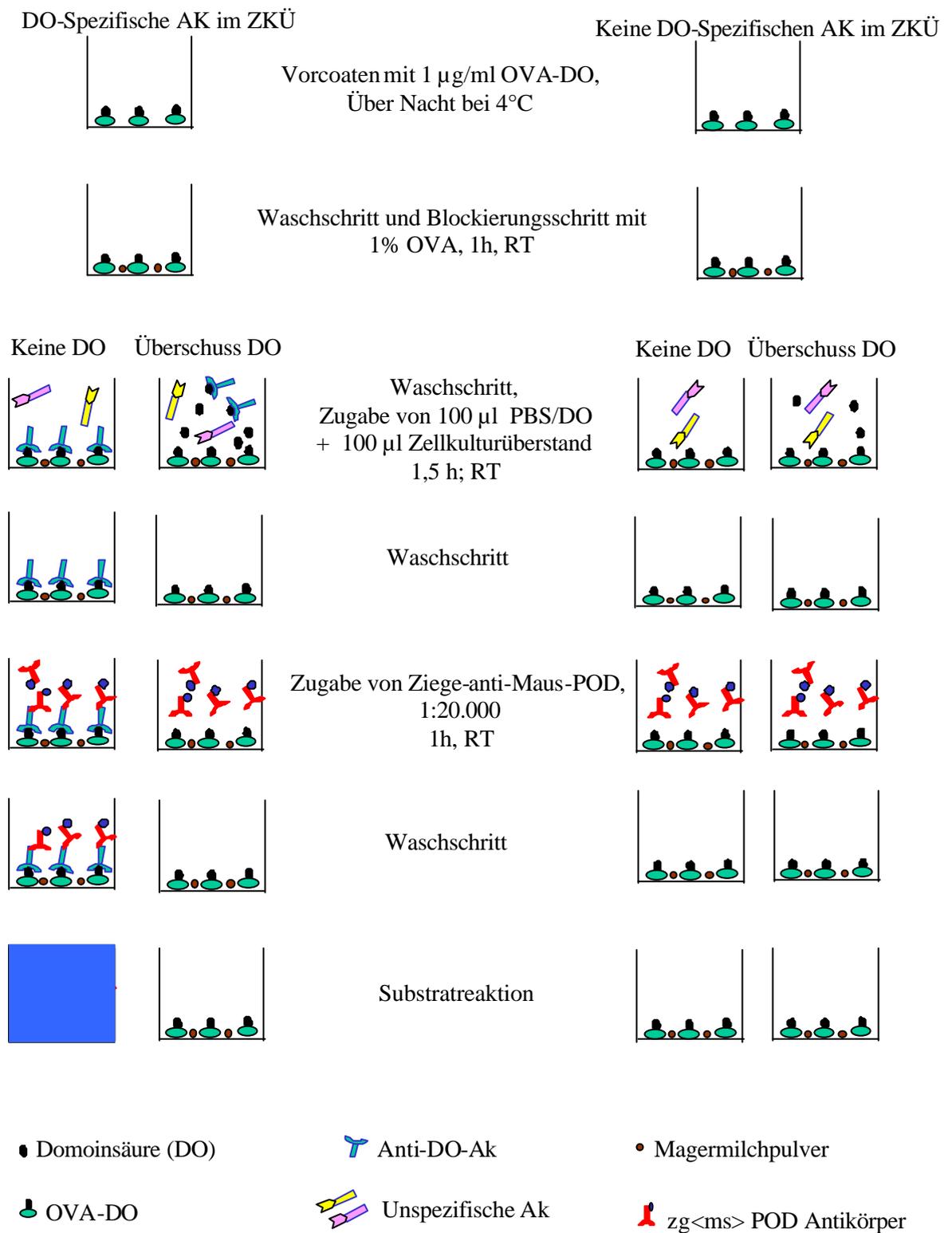


Abbildung 4: Screeningverfahren von Zellkulturüberständen

2.2.3.6 Cryokonservierung und Auftauen von Zellen

Es wurden zur Absicherung und für spätere Verwendung stets Aliquote Milzzellen immunisierter Mäuse, frisch fusionierten Zellen und Zellklonen, die im ELISA positiv reagierten, im flüssigem Stickstoff oder falls nötig direkt in die Zellkulturplatten bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Um eine Schädigung der Hybridomzellen durch Bildung von intrazellulären Eiskristallen zu verhindern, wurden die Zellen in spezielles Einfriermedium, welches DMSO enthält, aufgenommen. Das Einfriermedium sollte immer eiskalt sein, da DMSO bei höheren Temperaturen zelltoxisch wirkt.

Cryokonservierung in flüssigem Stickstoff

Zellsuspensionen aus den Zellkulturplatten oder -flaschen wurden gründlich aufgewirbelt bzw. abgeklopft, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei $120 \times g$ zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen in eiskaltem Einfriermedium resuspendiert und davon je 1,5 ml in Kryoröhrchen überführt. Für die Vitalität der Zellen ist es nun wichtig, dass sie nur ca. $1-2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ abkühlen, damit diese langsam ihr intrazelluläres Wasser über Osmose verlieren können. Die Röhrchen wurden deshalb in eine Einfrierbox mit Isopropanolfüllung, welche die genannten Bedingungen erfüllt, überführt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Nach ca. 24 h wurden die Kryoröhrchen in einen Kryobehälter mit flüssigem Stickstoff zur Endlagerung überführt.

Cryokonservierung in Zellkulturplatten

Hybridomzellen wurden neben oben erwähnter Einfriertechnik auch direkt in bewachsenen Zellkulturplatten eingefroren. Bei Bedarf konnte so immer auf die zuletzt erreichte Stufe zurückgegriffen werden. Das Medium der gut bewachsenen Kavität wurde abgesaugt und durch Einfriermedium ersetzt. Anschließend wurden die Platten mit einem Klebeband verklebt, in eine Styroporbox überführt, welche eine Abkühlung von $1-2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ gewährleistete und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Zellen wurden maximal 2-3 Monate gelagert, wobei eine Lagerung von bis zu einem Jahr möglich wäre (Patel und Brown, 1984).

Auftauen von Hybridomzellen

Die in Kryoröhrchen eingefrorenen Zellen wurden unter fließend warmem Wasser so lange aufgetaut, bis nur noch ein kleines Eisklumpchen im Röhrchen sichtbar war. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml NM überführt und für 10 min darin inkubiert, damit das DMSO aus den Zellen diffundieren konnte. Nach einem fünfminütigen Zentrifugationsschritt (120 x g, RT) wurde das Pellet in entsprechenden Volumen an NM aufgenommen und in Kulturgefäße überführt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumswechsel.

Zum Auftauen der in Zellkulturplatten eingefrorenen Zellen wurden die entsprechenden Kavitäten mit 37 °C warmem NM befüllt. Nach vollständigem Auftauen wurde das DMSO-haltige Medium abgesaugt und durch frisches NM ersetzt. Die Platten wurden im Brutschrank inkubiert, wobei am darauf folgenden Tag abermals ein Mediumswechsel stattfand.

2.2.3.7 Massenproduktion von monoklonalen Antikörpern

Die Produktion größerer Mengen monoklonaler Antikörper erfolgte in einem Miniperm-Minibioreaktor (Vivascience) und im Minibioreaktor CL 350 (Integra) (Abb.5). Der Miniperm-Bioreaktor besteht aus zwei Modulen, einem wiederverwendbaren Versorgungs- und einem einmal verwendbaren Produktionsmodul. Das Produktionsmodul ist vom Versorgungsmodul durch eine Dialysemembran mit einer Ausschlussgröße von 12,5 kDa abgetrennt und wird nach außen durch eine gasdurchlässige Silikonmembran begrenzt. Zellen und hochmolekulare Produkte werden durch diese zurückgehalten, Nährstoffe, physikalisch gelöste Gase und Metabolite können jedoch passieren. Hierdurch ist eine starke Anreicherung von Zellen und Zellprodukten möglich. Der Minibioreaktor wird auf einer Rollstation bei 4 U/min im Brutschrank inkubiert und ermöglicht dadurch einen guten Nährstoff- und Gasaustausch. Der Biofermenter CL 350 ist ebenfalls durch eine Dialysemembran mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa in ein Versorgungs- und Produktionsmodul unterteilt. Der wesentliche Unterschied zwischen beiden Systemen besteht darin, dass es sich beim Biofermenter CL350 um ein stationäres System handelt.

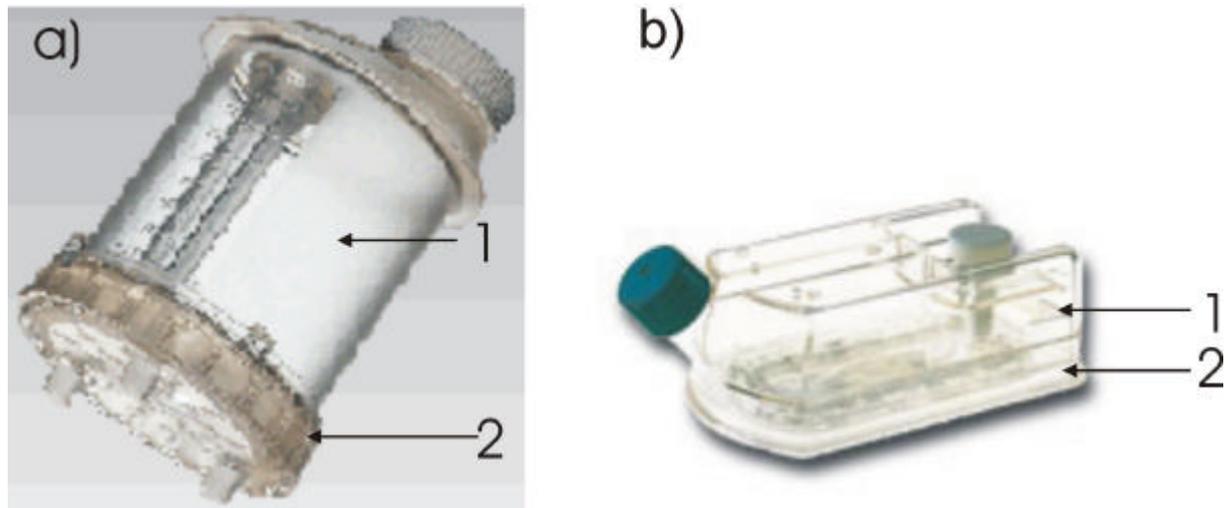


Abbildung 5: Biofermenter Miniperm (a) und CL 350 (b); 1. Versorgungsmodul, 2. Produktionsmodul

Für die Inokulation des Miniperm-Bioreaktors bzw. des Biofermenters CL350 wurden ca. $1-2 \times 10^6$ Zellen benötigt. Es war zuerst eine Umstellung der Hybridomzellen von NM auf serumfreies Medium (SFM) notwendig. Hierfür wurde der Anteil von serumfreiem Medium in einer Adaptionsphase von 3 Schritten kontinuierlich gesteigert. Zu Beginn wurden 25 % SFM zugefügt, dann wurde alle 2-3 Tage der Anteil um 25 % erhöht, bis schließlich nach 3 Mediumswechseln die Zellen an 100 % SFM adaptiert waren. Nun konnten die Zellen von den Zellkulturflaschen abgeklopft, bei $120 \times g$ abzentrifugiert, und in den entsprechenden Volumina SFM resuspendiert werden. Die Zellen wurden nun mit Trypanblau angefärbt und mit einer Neubauerzählkammer gezählt.

Die Antikörperproduktion im Miniperm-System wurde gestartet, indem der Zellrückstand in 35 ml resuspendiert wurde und diese Zellsuspension in das Produktionsmodul inokuliert wurde. Das Versorgungsmodul wurde anschließend mit 400 ml SFM befüllt. Alle 3 Tage wurden ca. 100 μ l Probe steril entnommen und die Lebendzellzahl bestimmt. Je nach Zellwachstum konnten so alle 2-3 Tage 5-15 ml geerntet werden. Dafür wurde die Zellsuspension dem Produktionsmodul entnommen, bei $120 \times g$ (5 min, RT) zentrifugiert und der Überstand gewonnen. Der Überstand wurde zur späteren Aufreinigung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Die abzentrifugierten Zellen wurden entweder verworfen oder bei ausreichender Lebendzellzahl als Miniperm-adaptierte Zellen kryokonserviert. Zu Beginn der Kultur wurde jeden dritten Tag das Medium im Versorgungsmodul durch frisches Medium ersetzt. Ab einer Zellkonzentration von ca. 10^7 Zellen/ml war ein 1-2 tägiger Mediumwechsel erforderlich. Die Kultur wurde beendet, wenn die Lebendzellzahl auf ca. 30 % gesunken war.

Zum Start des Biofermenters CL350 wurde die Zellen in 15 ml resuspendiert und in das Produktionsmodul einpipettiert. Die dabei im Zellraum entstehende Luftblase musste direkt wieder mit einer Pipette entfernt werden. Anschließend befüllte man den Nährstoffversorgungsraum mit 340 ml warmem SFM. Das Medium des Versorgungsmodul wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Zur Ernte der Ak musste der ganze Inhalt des Produktionsmoduls entfernt werden. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (120 x g, 5 min, RT), der Überstand gewonnen und die Zellen in 15 ml neuem SFM resuspendiert. Anschließend wurde das Produktionsmodul mit der Zellsuspension wieder befüllt. Der Überstand wurde bis zur Aufreinigung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.3.8 Subklassenbestimmung

Die Bestimmung der Subklasse erfolgte mit Hilfe eines Sandwich-ELISA mit subklassenspezifischen Antimaus-Antikörpern. Die Kenntnis der Subklasse ist für die Wahl des Reinigungsverfahrens von Bedeutung. Da bereits im Screening (Kap. 2.2.3.5) mit einem IgG-spezifischen Sekundärantikörper gescreent wurde, konnte es sich bei den gewonnenen Anti-DO AK nur um die IgG-Klasse handeln. Gleichzeitig wurde der Leichtkettentyp (λ oder κ) bestimmt. Folgende Arbeitsschritte wurden durchgeführt:

Coaten	250 μl Ziege-anti-Maus-IgG (5 $\mu\text{g/ml}$) in Carbonatpuffer, über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
Waschen	dreimal mit 350 μl PBS-Waschpuffer je Kavität im Mikrotiterplatten- Waschautomat
1. Immunreaktion	200 μl Zellkulturüberstand, $\frac{1}{2}\text{h}$ bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$
Waschen	s.o.
2. Immunreaktion	200 μl Kaninchen-anti-Maus-IgG subklassenspezifische Ak, 1:5 in PBS verdünnt, $\frac{1}{2}\text{h}$ bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
Waschen	s.o.
3. Immunreaktion	200 μl Ziege-anti-Kaninchen-IgG-POD 1:10.000 in PBS, $\frac{1}{2}\text{h}$ bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$
Waschen	s.o.

Substratreaktion	200 µl Substrat und Chromogen, ¼ h bei RT
Abstoppen	50 µl 2 N H ₂ SO ₄
Messung	Photometer 450 nm

Nach dem Vorcoaten konnten die Platten bei -20 °C mehrere Wochen gelagert werden.

2.2.3.9 Aufreinigung und Konzentrierung von monoklonalen Antikörpern.

Immunglobuline verschiedener Spezies (murin, human) und unterschiedlicher Isotypen binden mit ihrem Fc-Teil spezifisch an Protein A, einem von *Staphylococcus aureus* exprimierten Oberflächenprotein. Die Protein A-Affinitätschromatographie stellt eine geeignete Methode zur säulenchromatographischen Isolierung der Immunglobuline des Isotyps G dar (Forsgren und Sjöquist, 1966). Die Bindung der verschiedenen Maus-IgG-Subklassen erfolgt dabei pH-abhängig. Die gebundenen Ak lassen sich über pH-Stufengradienten eluieren: IgG₁ bei pH 6-8, IgG_{2a} bei pH 4,5-6, IgG_{2b} bei pH 3,5-4,5 und IgG₃ bei pH 4,5-6. Zur Vereinfachung wird aber oft bei pH 3 eluiert (Seppälä *et al.*, 1981).

Vor der Aufreinigung wurden die Zellkulturüberstände bei 3000 x g, 10 min bei RT zentrifugiert und anschließend sterilfiltriert (0,2 µm). Dadurch wurden partikuläre Bestandteile wie Zellen, Zellenabrieb etc. entfernt. Aufgereinigt wurde sowohl über eine Prosep A-Säule bei der Protein A an Glasperlen immobilisiert ist, als auch über eine Protein A-Agarose-Säule. Die Säulen wurden jeweils mit 2 ml Prosep A bzw. Protein A-Agarose befüllt. Prosep A verfügt über eine IgG₁-Bindungskapazität von ca. 13 mg/ml, Protein A-Agarose über 10-14 mg/ml. Vor jeder Aufreinigung wurde die IgG-Konzentration des ZKÜ bestimmt, um eine Überladung der Säule zu verhindern.

Aufreinigung über Prosep A

Äquibriert wurde die Prosep A-Säule mit dem 10fachen Säulenvolumen an Boratpuffer (pH 8,5). Der Kulturüberstand wurde mit 5 mol/l NaOH auf einen pH von 8,0-8,5 eingestellt und mit 4 ml/min über die Säule gepumpt. Anschließend wurde die Säule mit Boratpuffer solange gewaschen, bis der Schreiber wieder die Basislinie zeichnete. Das immobilisierte IgG wurde durch Citratpuffer (pH 3,0) eluiert. Die proteinhaltige Fraktion wurde durch Zugabe von Tris-

Puffer (2 mol/l) neutralisiert. Die schnelle Neutralisation des Elutionspuffer ist nötig, da aufgrund des sauren pH-Wertes die IgG-Moleküle irreversibel denaturieren würden. Es wurde deshalb bereits Tris-Puffer in die Auffanggefäße vorgelegt. Die Antikörperkonzentration des Eluates wurde im Photometer bei 280 nm Wellenlänge und im ELISA bestimmt. Nach einem Reinigungsschritt mit HCl (pH 1,5) wurde die Protein A-Säule für die Lagerung abschließend mit 10fachem Säulenvolumen PBS + 0,02 % NaN₃ gespült und bei 4 °C aufbewahrt.

Aufreinigung über Protein A-Agarose

Zuerst erfolgte die Äquilibration der Säule mit dem 5fachen Säulenvolumen von Waschpuffer (I). Der Zellkulturüberstand wurde mit Neutralisationspuffer auf pH 7,5 eingestellt und über die Säule gepumpt. Im Anschluss wurde die Säule bei ständiger Kontrolle im Durchflußphotometer bis zum Erreichen der Nulllinie mit Waschpuffer (II) gewaschen. Die Elution erfolgte anschließend mit Elutionspuffer. Die antikörperhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und mit Neutralisationspuffer in den neutralen pH-Bereich titriert. HCl (pH 1,5) wurde für die Reinigung der Säule nicht mehr benötigt. Die IgG-Konzentrationsbestimmung erfolgte entweder photometrisch bei 280 nm oder im EIA.

Konzentrierung gereinigter Antikörper

Die Konzentration der Eluate erfolgte mittels Ultrafiltration. Die aufzukonzentrierende Probe wurde in eine Rührzelle mit einer 30 kDa Membran gegeben und unter Druck von 2,5 bar durch die Membran gedrückt. Moleküle über 30 kDa wie IgG Moleküle (150 kDa) wurden dabei im Konzentrat zurückgehalten. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationschritt (3000 x g, 10 min), um partikuläre Substanzen zu entfernen. Die Antikörperkonzentration wurde im ELISA bestimmt. Die Ak-Lösung wurde anschließend in 1 mg-Portionen aliquotiert, lyophilisiert und bei -20 °C gelagert. Bei Bedarf wurden die Ak in PBS rekonstituiert.

Überprüfung der Reinheit der Antikörper mittels SDS-PAGE

Die Ak-Fraktionen wurden mit einer SDS-Page auf ihre Reinheit überprüft. Durch die Beladung mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Eigenladungen z.B. von Antikörpern so effektiv überdeckt, dass anionische Mizellen mit konstanter Nettola-

dung pro Masseneinheit entstehen. Desweiteren werden die unterschiedlichen Molekülformen ausgeglichen, indem die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst werden. So wandern in einem elektrischen Gleichstromfeld die durch die SDS-Beladung negativ geladenen Moleküle und Partikel jeweils in die Richtung der Anode (Wilson und Goulding, 1991). Zur Probenvorbereitung wurden die Antikörperfraktionen 1:10 mit Elektrophoresepuffer verdünnt. Vor Beginn der Elektrophorese wurde die Kühlplatte auf 5 °C gekühlt. Anschließend wurde 1-2 ml H₂O dest. als Kühlkontaktflüssigkeit auf die Kühlplatte aufgetragen. Das verwendete Gel mit einem Polyacrylamidgradienten von 8-18% wurde mit dem Gel-Bond PAG-Film nach unten und der Slot-Seite zur Kathode hin orientiert, auf den Kühlblock gelegt. Darauf wurde die Schutzfolie auf dem Gel mit einer Pinzette entfernt und die Pufferstreifen auf die entsprechende Seite des Gels platziert. Ca. 5-10 µl der vorbereiteten Proben wurden nun in die Slots pipettiert und bei 600 V Spannung (25 mA) elektrophoretisch aufgetrennt. Gestoppt wurde die Elektrophorese sobald der im Probenpuffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau die Anode der Elektrophoresekammer erreichte.

Die Färbung des Gels erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue. Hierfür wurde das Gel zuvor eine Stunde in 12% Trichloressigsäure fixiert und anschließend in 200 ml Färbelösung (160 ml Coomassie Brilliant Blue + 40 ml Methanol) über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Gel mit 25%igen Methanol entfärbt, für 1-3 h in 10 % Glycerin gelegt und anschließend in Folie verschweißt.

2.2.3.10 Bestimmung der Immunglobulinkonzentration

Photometrische Bestimmung

Unter den Voraussetzungen von Livingston (1974), dass eine Antikörperlösung von 1 mg/ml bei einer Küvettendurchmesser von $d = 1$ cm eine Absorption ($\lambda = 280$ nm) von 1,46 aufweist, konnte die IgG-Konzentration im Photometer recht einfach bestimmt werden. Mit dieser Methode konnten nur Antikörperfraktionen ohne Fremdproteinanteil gemessen werden. Sollten jedoch Zellkulturüberstände gemessen werden, die BSA, FKS o.ä. enthielten, musste folgender ELISA angewandt werden:

Sandwich-ELISA

Zur Messung unbekannter Proben im ELISA mussten IgG-Standards bekannter Konzentrationen hergestellt werden. Die Sensitivität ist gegenüber der photometrischen Bestimmung deutlich besser. Somit konnten auch Proben sehr geringer IgG-Konzentrationen gemessen werden. Die einzelnen Arbeitsschritte im Folgenden:

Vorcoaten	250 μ l Zg<ms>IgG (5 μ g/ml) in Carbonatpuffer über Nacht bei 4 °C
Waschen	3 mal mit 350 μ l PBS-Waschpuffer/Kavität
1. Immunreaktion	200 μ l Maus-IgG-Standards bzw. 200 μ l Zellüberstand in verschiedenen Verdünnungen, 1 h; RT
Waschen	s.o.
2. Immunreaktion	200 μ l Zg<ms>IgG-POD (1:10.000) in PBS, 1 h, RT, Schüttler
Waschen	s.o.
Farbreaktion	200 μ l Substrat und Chromogen, ca. 20-30 min, RT
Abstoppen	50 μ l H ₂ SO ₄ (2 mol/l)
Messung	Photometer λ = 450 nm

Die Platten konnten nach dem Beschichten bei -20 °C eingefroren und je nach Bedarf bei 4 °C für ca. 10 min wieder aufgetaut werden.

2.2.4 Entwicklung eines kompetitiven ELISA

Beim indirekten, kompetitiven Enzymimmunoassay ist ein Coatingkonjugat an eine Festphase immobilisiert. Die Menge der an das Coatingkonjugat gebundenen Antikörper lässt sich indirekt über einen enzymmarkierten Sekundärantikörper nachweisen. Die Enzymaktivität wird bestimmt, indem ein Substrat zugesetzt und die Absorption des gebildeten Produkts im Photometer gemessen wird. Die Höhe der Absorption ist indirekt proportional zur Konzentration des Analyten. Durchgeführt wurde der heterogene, kompetitive ELISA in Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten. Die äußeren Reihen und Spalten wurden nicht zur Messung verwendet, da diese Kavitäten stärkere Schwankungen aufweisen als die inneren Reihen und Spalten. Die Platten wurden nach jedem Inkubationsschritt mit 350 µl PBS-Waschpuffer pro Kavität in einem EIA-Waschautomaten gewaschen, um ungebundene Reaktionspartner zu entfernen. Nach der Enzymreaktion entfiel der Waschschrift und die Reaktion wurde mit 1 M H₂SO₄ gestoppt, wobei jeder Kavität dieselbe Zeit zur Farbentwicklung gegeben wurde. Die Auswertung erfolgte im Photometer bei 450 nm.

Nach Testen verschiedener Coatingkonjugatkonzentrationen, Antikörperkonzentrationen und verschiedener Blockierungsmittel wurde folgender optimierter Assay für monoklonale und polyklonale Antikörper entwickelt (Abb. 6).

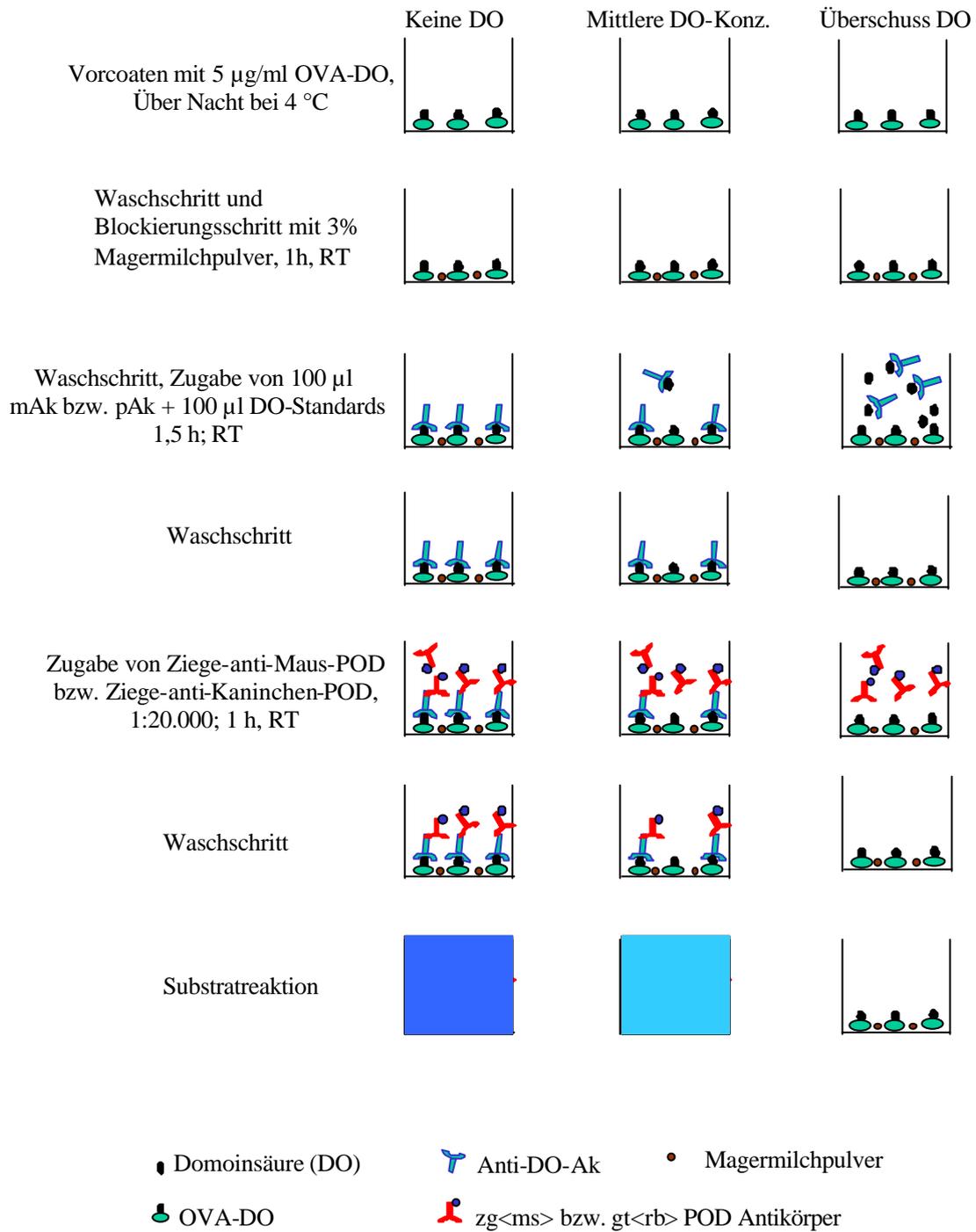


Abbildung 6: Schematischer Aufbau des Standard-ELISA zum Nachweis von DO

Coaten	200 µl OVA-DO (5 µg/ml) in Carbonatpuffer, über Nacht bei 4 °C
Blockieren	300 µl 3 % Magermilch (w/v) in PBS, 1 h, RT
1. Immunreaktion	100 µl DO-Standards (0-10.000 µg/l) + 100 µl mAk bzw. pAk; 1,5 h, RT
2. Immunreaktion	200 µl Zg<ms> bzw. Zg<rb>IgG-POD 1:20.000 in PBS; 1 h, RT
Enzymreaktion	200 µl Substrat/Chromogen, ca. 20-30 min, RT
Abstoppen	50 µl H ₂ SO ₄
Messung	Photometer bei $\lambda = 450$ nm

2.2.5 Entwicklung eines kompetitiven ELISA mit Verstärkersystem

Bei diesem ELISA ist der zweite Antikörper mit Biotin markiert. Im nächsten Schritt reagierte das Biotin mit einem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat. Durch Ausnutzung dieser spezifischen Biotin/Streptavidin-Bindung (Streptavidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin) mit anschließender Signalgebung via Streptavidin-gekoppelter Peroxidase, kam es durch den größeren Substratumsatz zu einer Signalverstärkung (Abb.7). Der ELISA mit Verstärkersystem wurde mit polyklonalen Antikörpern und mit dem monoklonalen Antikörper 4D1D nach folgendem Schema durchgeführt:

Coaten	200 µl OVA-DO (5 µg/ml) in Carbonatpuffer, über Nacht bei 4 °C
Blockieren	300 µl 3 % Magermilch (w/v) in PBS, 1 h, RT
1. Immunreaktion	100 µl DO-Standards (0-10.000 µg/l) + 100 µl mAK (1:100.000) bzw. pAK (1: 15.000); 1,5 h, RT
2. Immunreaktion	200 µl Zg<ms> bzw. Zg<rb>IgG-Biotin 1:40.000 bzw. 1:20.000 in 0,5 % BSA-PBS; 1 h, RT
Streptavidinkopplung	200 µl Streptavidin-POD Konjugat, 1:50.000 in 0,5 % BSA-PBS, 30 min, RT
Enzymreaktion	200 µl Substrat/Chromogen, ca. 20-30 min, RT
Abstoppen	50 µl H ₂ SO ₄
Messung	Photometer bei $\lambda = 450$ nm

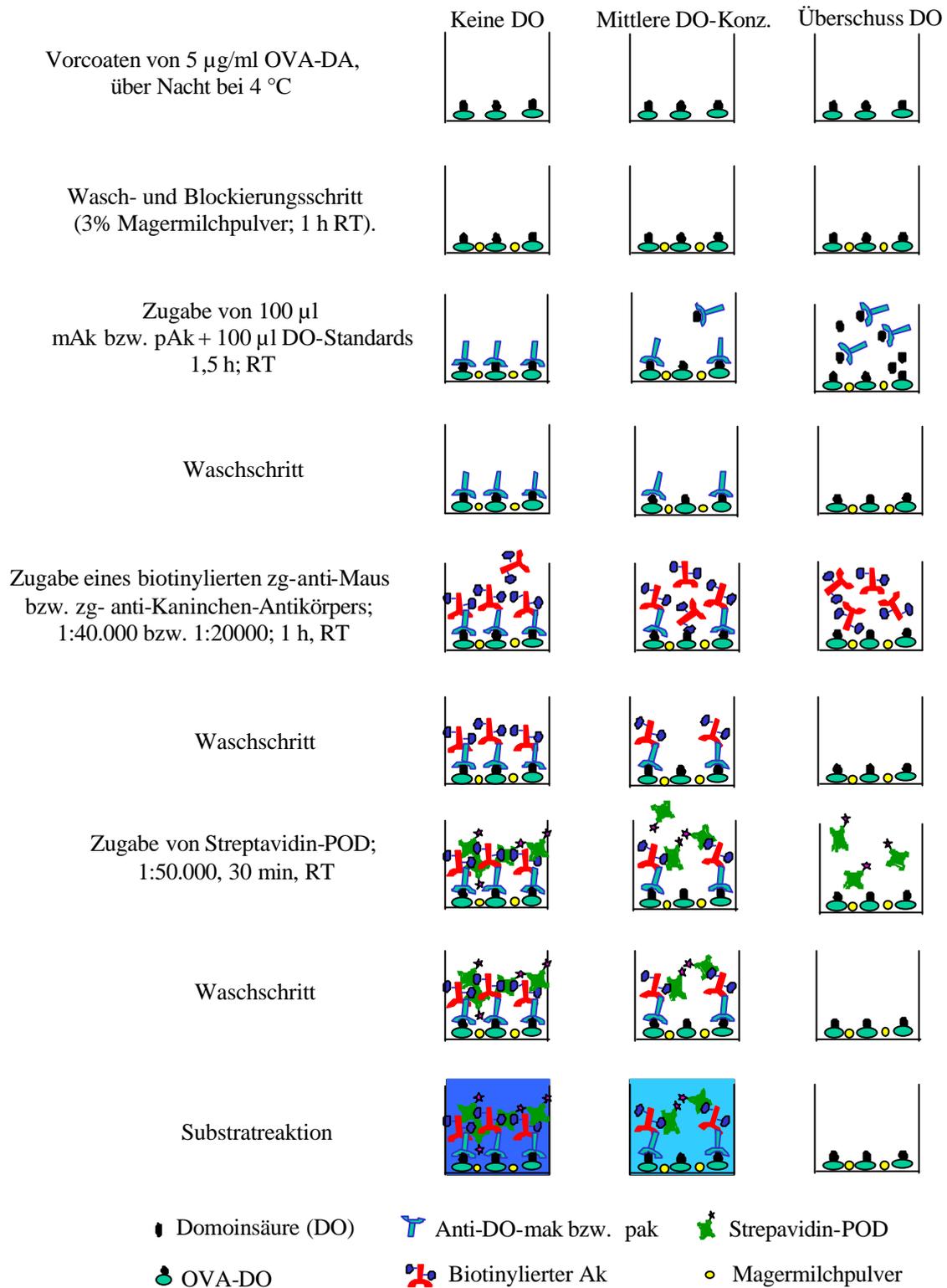


Abbildung 7: Schematische Darstellung des ABC-ELISAs

2.2.6 Berechnung der Domoinsäurekonzentrationen

Anhand der DO-Standardkurve ließen sich Proben unbekannter Konzentration bestimmen. Beim kompetitiven Assay wurden die durch den Analyten nicht belegten Bindungsstellen gemessen, der Nachweis erfolgte also indirekt. Hohe Absorptionswerte bedeuteten niedrige DO-Gehalte und umgekehrt. Die Auftragung der Absorptionswerte über der logarithmischen DO-Konzentration ergab einen sigmoiden Kurvenverlauf. Zum Anpassen der Kurve wurde das 4-Parameter-logistische Modell (Rodbard und Hutt, 1974; Dudley *et al.*, 1985) verwendet. Diese vierparametrig Gleichung, auch logistische Funktion genannt, ist in kommerziell erhältlicher Datenauswertesoftware wie Origin[®] enthalten.

$$y = \frac{(a - d)}{1,0 + e^{bx - bc}} + d$$

wobei y = Absorption

x = Analytkonzentration

a = maximale Absorption (obere Asymptote)

d = minimale Absorption (untere Asymptote)

c = Konzentration am Testmittelpunkt

b = Steigung am Testmittelpunkt

Um verschiedene ELISA-Kurven miteinander vergleichen zu können, wurden die Daten zur Normierung nach folgender Formel in % B/B₀-Werte transformiert:

$$\% B/B_0 = \frac{A - A_{\min}}{A_{\max} - A_{\min}} * 100$$

wobei A = Absorptionswert eines Standards bzw. einer Probe

A_{\max} = Absorptionswert des Nullwertes (PBS)

A_{\min} = Absorptionswert des Überschusses (maximale DO-Konzentration)

Die Empfindlichkeit eines Enzymimmunoassays wird durch seinen Testmittelpunkt und seine Nachweisgrenzen bestimmt. Dabei entspricht der Testmittelpunkt der Konzentration des Haptens, bei der 50 % der Antikörperbindungsstellen durch den Analyten belegt sind. Der Testmittelpunkt (50 % B/B_0) stellt den Wendepunkt der sigmoiden Kurve dar, welche in diesem Bereich nahezu linear ist. Im Bereich des 50 % B/B_0 -Wertes ist die Messgenauigkeit am größten. Je mehr man sich bei Probenmessungen davon entfernt, desto größer wird der Messfehler. Der 80 % B/B_0 -Wert stellt die untere Nachweisgrenze, der 20 % B/B_0 -Wert die obere Nachweisgrenze des EIA dar (Rodbard, 1971). Die Nachweisgrenzen definieren sich als untere bzw. obere Grenzkonzentrationen, die noch quantitativ erfasst werden können und sich signifikant vom Nullwert bzw. Überschusswert unterscheiden (Ebel und Kamm, 1983). Interessanter für die Charakterisierung eines EIA ist aber der 80% B/B_0 -Wert, da dieser der geringsten Konzentration entspricht, die gemessen werden kann.

Zur Berechnung der Bestimmungsgrenzen gibt es allerdings noch andere mathematische Verfahren: So ist es auch möglich die Nachweisgrenzen zu ermitteln, indem die durchschnittliche Standardabweichung aller Messwerte mit drei multipliziert und von der maximalen Absorption abgezogen wird. Diese Berechnungsart wird als 3s-Definition bezeichnet (Niessner, 1994; Bruun *et al.*, 2000).

Die Konzentrationsbestimmung unbekannter Muschelproben erfolgte mittels der sigmoiden Ausgleichskurve und mit der B/B_0 -Kurve. Durch Verdünnung bzw. Aufstockung der Proben wurde versucht, Werte möglichst nahe des Testmittelpunktes zu erhalten.

2.2.7 Bestimmung von Kreuzreaktivitäten

Unter Kreuzreaktivität (KR) versteht man die Fähigkeit eines Antikörpers, mit anderen, dem Hapten strukturell ähnlichen Molekülen zu reagieren. Je ähnlicher die kreuzreagierende Substanz dem Analyten ist, desto besser wird sie von dem Antikörper gebunden. Die KR wurde für anti-DO pAk und dem mAK 4D1D bestimmt. Hierfür wurden Standardreihen (0-10.000 $\mu\text{g/l}$) mit Domoin-, Kainin-, Asparagin-, Glutamin-, Geranyl- und 2-Methyl-3-butensäure angesetzt und im ELISA (Kap. 2.2.5) getestet (Abb. 8).

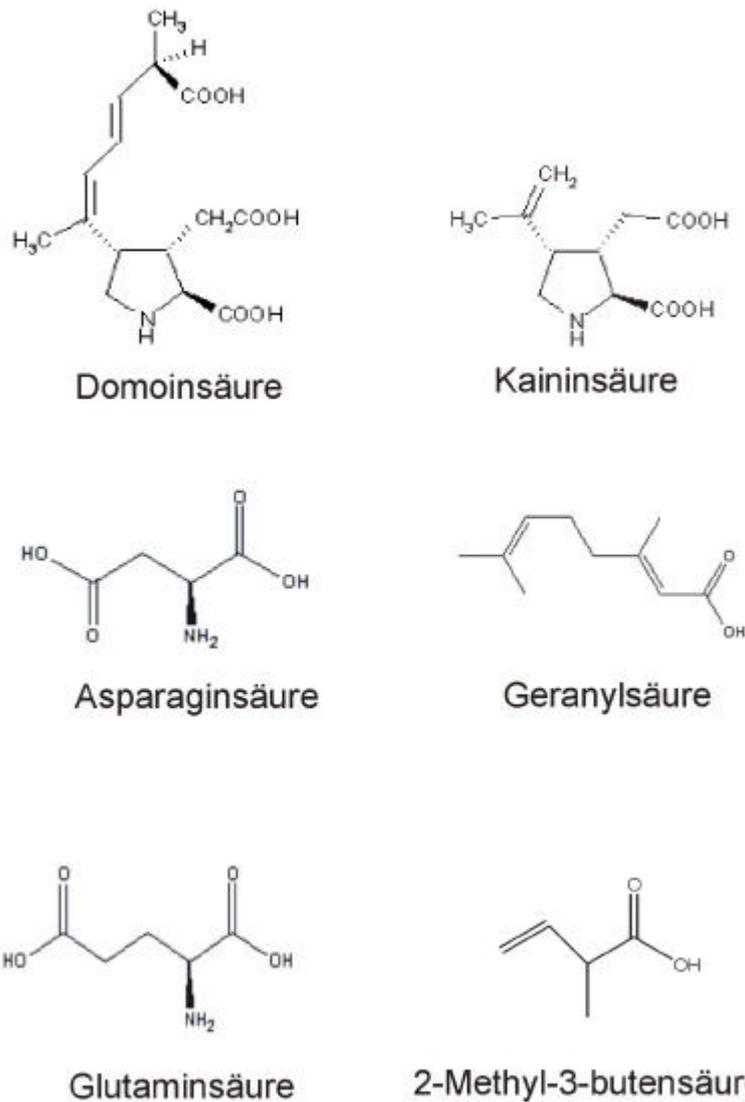


Abbildung 8: Strukturen der zum Kreuzreaktivitätstest eingesetzten Verbindungen

Anschließend wurden die Testmittelpunkte (50 % B/B₀) der Standardreihen ermittelt und folgendermaßen in Beziehung gesetzt:

$$\% \text{ KR} = \frac{[H]}{[K]} * 100$$

wobei [H] = Konzentration des Analyten bei 50 % B/B₀

[K] = Konzentration des kreuzreagierenden Analyten bei 50 % B/B₀

Die Reaktion der Antikörper mit DO wurde mit 100 % festgelegt. Alle genannten Verbindungen wurden dazu in Relation gesetzt. Der reziproke Wert der oben aufgeführten Gleichung wurde von Johnston und Eisen (1976) als Selektivität eines Ak eingeführt.

Es ist erforderlich, die Querempfindlichkeit eines AK zu kennen, da kreuzreagierende Substanzen zu Verfälschungen im Testergebnis führen können.

2.2.8 Probenmessung

Zur Probenmessung wurden exponierte und nicht exponierte Miesmuscheln (*Mytilus edulis*) und Teichmuscheln (*Anadonta cygnea*) herangezogen. Die Muscheln wurde freundlicherweise von Prof. P.-D. Hansen und Dr. H. Dizer, TU Berlin, kultiviert. Zur Exposition wurden die Muscheln mit 1 µg DO/g Muschelnasskörpergewicht (inklusive Schale) dreimal in Intervallen von 12 h injiziert. Nach jeder Injektion wurden die Muscheln zuerst 20 min bei 15 °C in der Luftatmosphäre gelassen, um die Diffusion der injizierten Lösung in das Gewebe zu optimieren. Nach dreimaliger Injektion von DO wurden die Gewebearten Kiemen, Hepatopankreas, Mantel, Gonaden und hinterer Schließmuskel getrennt präpariert, gewogen in flüssigen Stickstoff schockgefroren und zur Analyse im EIA verschickt.

Um ausreichend Muschelgewebe zu besitzen, wurden lebende Miesmuscheln (*Mytilus edulis*) von der Biologischen Anstalt Helgoland bezogen.

Desweiteren wurden drei bereits homogenisierte Miesmuschelproben aus der Nordsee von Prof. Lukas aus Jena bezogen und im ELISA gemessen.

2.2.8.1 Probenaufbereitung

Die aus Helgoland bezogenen Muscheln wurden aus dem Wasser entnommen und für ca. 20 min an der Luft getrocknet. Anschließend wurde das Muschelgewebe präpariert. Die Extraktion von DO aus dem Muschelgewebe erfolgte analog der Methode nach Quilliam *et al.* (1998). Hierfür wurden 1 g des Muschelgewebes mit 4 ml eines Gemisches aus Methanol/Wasser (50 %/50 %) für 10 min mit einem Sonikator auf Eis homogenisiert.

Das Homogenat wurde bei 5000 x g für 10 min bei 3°C zentrifugiert und der Überstand mit einer 0,45 µm Filtereinheit filtriert. Der Überstand wurde in Reaktionsgefäße überführt, entweder bei -80 °C gelagert oder für eine Messung im ELISA weiter behandelt. Die Muschelproben aus Jena wurden analog der oben beschriebenen Methode extrahiert. Die Extraktion der aus Berlin bezogenen Muschelgewebeproben erfolgte in ähnlicher Weise, aber unabhängig vom Gewebegewicht mit 1,5 ml Methanol/Wasser (50%/50%).

2.2.8.2 *Methanol-Kompatibilität des mAk 4D1D*

Zur Probenmessung mit ELISA wurde der monoklonale Antikörper 4D1D verwendet. Da DO mit Methanol aus dem Muschelgewebe extrahiert wurde, musste die Methanoltoleranz des mAK 4D1D festgestellt werden. Um die niedrigste Extraktverdünnung, bei der keine Matrixeffekte mehr auftraten, herauszufinden, wurde ein ELISA mit unterschiedlichen Extraktverdünnungen durchgeführt. Hierfür wurden Standardreihen von DO in PBS, in 50 % Methanol/Wasser, in 25 % Methanol/Wasser und in 12,5 % Methanol/Wasser erstellt und wie unter Punkt 2.2.5 beschrieben im ELISA appliziert.

2.2.8.3 *Wiederfindungsraten von DO im ELISA*

Um die Wiederfindungsraten von Domoinsäure zu bestimmen, wurde 1g Muschelgewebe mit 20 µg DO (Grenzwert WHO) und 10 µg DO (halber Grenzwert WHO) dotiert. Anschließend erfolgte die oben beschriebene Extraktion. Um Matrixeffekte zu detektieren, wurde als Kontrolle eine Probe ohne DO parallel extrahiert. Die Extrakte wurden 1:100 und 1:200 mit PBS verdünnt. Die Messung der Proben erfolgte in Triplikaten mit dem entwickelten kompetitiven ABC-ELISA.

2.2.8.4 *Probenaufstockung*

Real-Proben bzw. Gewebeproben von exponierten Muscheln wurden bei Bedarf mit 40 µg DO pro g Muschelgewebe aufgestockt. Nach der Extraktion wurden die Proben 1:4 mit PBS verdünnt und neben den nicht aufgestockten Proben in Triplikaten im ABC-ELISA gemessen (siehe Punkt 2.2.5). Die Gegenmessung der Realproben erfolgte an der Universität Jena mittels HPLC.

2.2.9 Messung im BIAcore

2.2.9.1 Grundlagen

81 Jahre nach der Entdeckung des Effektes der Oberflächenplasmonenresonanz (Surface Plasmon Resonance, SPR) durch Wood (1902) wurde 1983 erstmalig von Liedberg *et al.* (1983) vorgeschlagen, das Phänomen zu verwenden, um eine sensorisch aktive Oberfläche zu erzeugen. Der SPR-Aufbau gestattete die Analyse von Gasen, die mit der Oberfläche wechselwirkten. Pharmacia (Uppsala, Schweden) vertreibt als Marktführer und erster Anbieter seit 1990 das BIAcore-Gerät (Löfås und Johnson, 1990), das zur Untersuchung und Charakterisierung von Affinitätsreaktionen weitverbreitete Anwendung fand (Malmqvist, 1993; Mani *et al.*, 1994).

Grundprinzip aller SPR-Sensoren ist das Phänomen der optischen Schwingungsanregung von Elektronen in einem dünnen Metallfilm (Kretschmann und Raether, 1968). Die durch Wechselwirkung mit Photonen entstandenen Schwingungen, sog. Polaritone oder Plasmone, breiten sich über einige Mikrometer wellenförmig in der Metallschicht aus (Lawrence *et al.*, 1992). Vergleichbar den durch Totalreflexion geführten Wellen bei Gitterkopplern sind die Schwingungen verbunden mit einem evaneszenten Feld, das über die Phasengrenze in die Umgebung hineinreicht. Wechselwirkungen von Molekülen mit dem evaneszenten Feld können hochsensitiv detektiert werden.

Der SPR-Effekt tritt bei Verwendung von ca. 50 nm dünnen Metallschichten auf (z. B. Ag, Au, Al, Pt), wobei häufig Goldschichten wegen gute Kopplungseigenschaften zum Einsatz kommen. Über ein Prisma, das von der Rückseite des Chips gegen ein Glassubstrat drückt, wird monochromatisches Licht eingestrahlt und das Winkelspektrum des reflektierten Lichts über eine CCD-Zeile (charge coupled device) ausgelesen (Abb. 9). Da Licht einer bestimmten Wellenlänge und eines bestimmten Einstrahlwinkels zur Anregung des SPR-Effektes absorbiert wird, erscheint in der Reflexion ein Intensitätsminimum. Kommt es nun auf der Goldoberfläche zu geringen Änderungen der Massebeladung, z. B. durch Anlagerung von Proteinen, so wechselwirken diese Moleküle mit dem elektromagnetischen evaneszierenden Feld. Ergebnis dieser Wechselwirkung ist eine detektierbare Veränderung des Intensitätsminimums im Reflexionswinkelspektrum, die mit der Massezunahme korreliert.

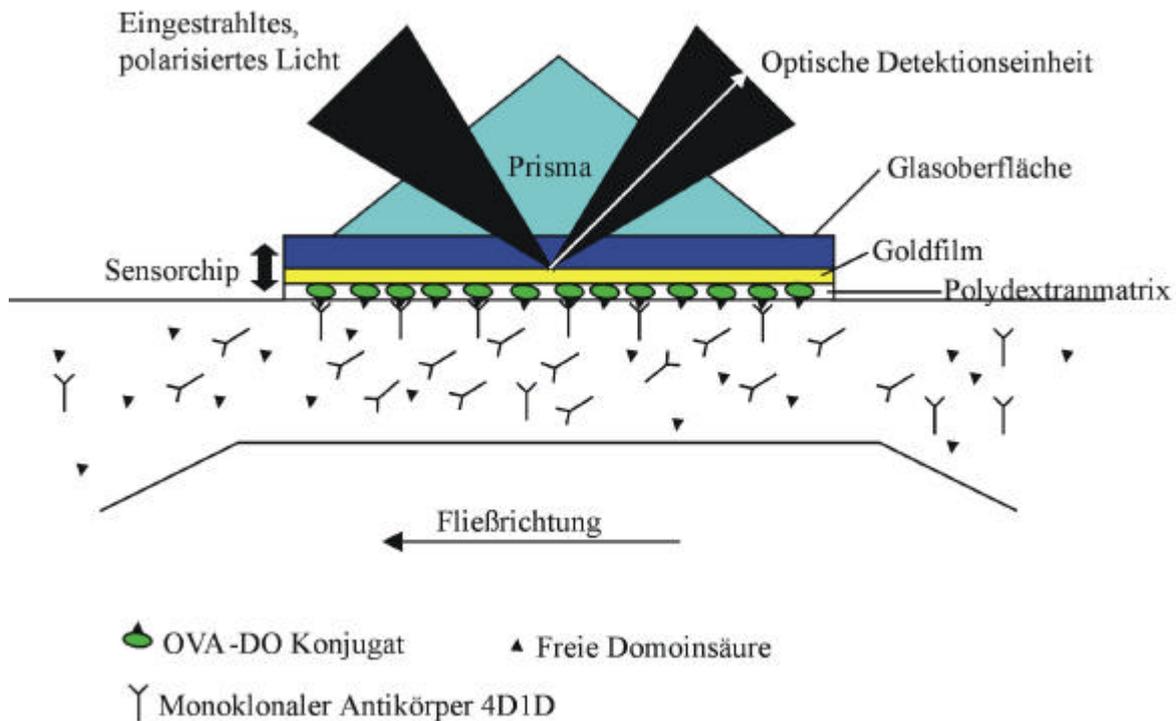


Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines SPR-Systems

Das BIAcore gibt das Sensorsignal in Resonance Units (RU) an, wobei 1000 RU einer Anlagerung von 1 ng/mm^2 Protein entspricht (Stenberg *et al.*, 1991; Fagerstam *et al.*, 1992). 1000 RU entsprechen ebenfalls einer Ablenkung des Reflexionswinkels (s. Abb. 9: weißer Pfeil) von 0.1° . Dargestellt werden die Daten in einem Diagramm mit Ordinate [RU] und Abszisse [Zeit].

2.2.9.2 Messablauf

Für die Versuche wurden CM5-Sensorchips benutzt, welche mit vier Fließzellen ausgestattet sind. Jene besitzen auf der Goldoberfläche (Dicke ca. 50 nm) eine Dextranmatrix (Hydrogel), die carboxymethyliert ist. Das über Thiolgruppen an das Gold gekoppelte Hydrogel bestand aus linearen, hydrophilen Dextranmolekülen, die eine Schichtdicke von ca. 100 nm ausmachten. Carboxylgruppen, deren pK_a -Wert bei 4 liegt, waren bei neutralem pH der verwendeten Laufpuffer vollständig ionisiert, so dass die Abstoßungskräfte der Matrixmoleküle stark waren.

Die Software BIAcore-Control ermöglichte eine gezielte Steuerung der Temperatur in der Fließzelle (20°C) und der Fließrate, die in der Regel zwischen $1\text{--}10 \mu\text{l/min}$ variierte. Nach

dem Einbau des Sensorchips wurde das Fließsystem für ca. 7 min mit entgastem HBS-Puffer gespült. Ein anschließender Messzyklus erfolgte nach dem folgenden Schema:

- 5 min Spülen der Oberfläche mit HBS-Puffer zum Erhalt einer Grundlinie.
- Aktivierung der Oberfläche mit EDC/NHS (35 μ l, 50 % Mischung, 5 μ l/min).
- Spülen der Oberfläche und des Schlauchsystems mit HBS-Puffer zur Entfernung unspezifisch gebundener Bestandteile für 2–10 min.
- Injektion von Coatingkonjugat OVA-DO (150 μ g/ml, 35 μ l, 5 μ l/min), als Referenz wurde eine Fließzelle mit OVA vorgecoatet.
- Blockierung der Sensoroberfläche mit 1 M Ethanolamin-Lösung, pH 8,5, um nicht reagierte, aktive Ester abzusättigen (35 μ l, 5 μ l/min).
- Injektion von 150 μ l mAK 4D1D (10 nM, 10 μ l/min). Im Falle eines kompetitiven Assays wurde DO in Konzentrationen von 5000 μ g/l, 50 μ g/l, 5 μ g/l, 2.5 μ g/l, 1 μ g/l, 0.5 μ g/l, 0.01 μ g/l hinzugefügt. Für Kreuzreaktivitätsstudien wurde zusätzlich zu Do-moinsäure noch Glutamin-, Asparagin- und Kaininsäure in Konzentrationen von 5000 μ g/l verwendet.
- Regenerierung der Sensoroberfläche durch 3 min Spülen mit SDS 0.2 % HCl 10 mM
- Spülen der Oberfläche und des Schlauchsystems mit HBS-Puffer für 2–10 min, um den Sensorchip für eine erneute Probenaufnahme bereitzustellen.

Die Aktivierung der Oberfläche erfolgte für 7 min bei RT mit einer Mischung aus 50 mM NHS und 200 mM EDC. Nach einer Spülung mit HBS-Puffer erfolgte die Kopplung des Liganden über dessen Aminofunktionen in 10 mM Natrium-Acetatpuffer (pH 4.5) durch siebenminütige Inkubation und anschließendem wiederholtem Spülen. Um nicht reagierte, aktive Ester abzusättigen, wurde die Sensoroberfläche für 7 min mit einer 1 M Ethanolamin-Lösung, pH 8.5, inkubiert.

Die Berechnung der Assoziations- und Dissoziationskonstanten erfolgte mit der BioEvaluation software. Um unspezifische Bindungen zu eliminieren, wurde das Referenzsensogramm jeweils von den anderen 3 Sensogrammen subtrahiert.

3 Ergebnisse

3.1 Konjugatsynthese und Charakterisierung

Bei der Gewinnung monoklonaler Antikörper zum Nachweis von Domoinsäure steht an erster Stelle die Synthese von Immun- bzw. Beschichtungskonjugaten, d.h. die kovalente Kopplung von DO an ein immunogenes Trägerprotein. Die Kopplung an ein Trägerprotein ist von immenser Bedeutung, da Substanzen mit einem Molekulargewicht kleiner 1000 Da wie DO (311,3 Da) nicht immunogen wirken. Weiterhin hat freie Domoinsäure eine LD₅₀ von ca. 3 mg/kg Körpergewicht und könnte bereits aufgrund ihrer Toxizität nicht ohne Kopplung appliziert werden. Zur Synthese von DO- Immunkonjugaten wurde das Hapten an Hämocyanin (KLH) gekoppelt. Dabei handelt es sich um ein Napfschneckenprotein, das aufgrund seiner Größe von $3,9 \cdot 10^5$ - $1,3 \cdot 10^7$ Da und seiner Verschiedenheit von Säugerproteinen sehr immunogen wirkt. Für die Synthese von Beschichtungskonjugaten wurde DO an OVA gekoppelt. In beiden Fällen wurde mit Carbodiimid gekoppelt. Die genauen Syntheseschritte sind unter Kap. 2.2.1. beschrieben. Da es sich bei DO um eine Tricarbonsäure handelt, kann davon ausgegangen werden, dass alle drei Carboxylgruppen durch Carbodiimide zu aktiven Estern umgesetzt werden. Bei den Immun- und Beschichtungskonjugaten handelt es sich folglich um „Mischkonjugate“ unterschiedlicher Kopplungsvarianten.

Die Proteinkonzentration der Immun- und Coatkonjugate wurde mittels eines BCA-Testes bestimmt. Die Kenntnis des Proteingehaltes ist für den Einsatz des Beschichtungskonjugates im ELISA bzw. des Immunkonjugates zur Immunisierung wichtig. Tab. 5 zeigt die Proteinkonzentration der einzelnen Konjugate:

Tabelle 5: Konzentration der Immun- und Beschichtungskonjugate

Konjugat (Kopplungsrate)	Konzentration [mg/ml]
KLH-DO	0,6
OVA-DO (1:18)	1
OVA-DO (1:3)	2,6

Zur Charakterisierung der Konjugate in Bezug auf die kovalente Anbindung von DO an die Trägerproteine und zur Bestimmung des Konjugationsverhältnisses dienten MALDI-TOF-Messungen. Da nur Proteine bis zu einer Molekülgröße von ca. 1000 kDa mit MALDI-TOF gemessen werden können, konnte nur der Kopplungserfolg des OVA-Konjugates überprüft werden.

Anfangs wurde mit einem 72 molaren DO-Überschuss an OVA gekoppelt. Der OVA-Peak mit einem Molekulargewicht von 44629 Da vergrößerte sich beim OVA-DO Konjugat auf 50232 Da, was bedeutet, dass pro mol OVA ca. 18 mol DO Moleküle kovalent gebunden haben. Somit konnte von einem maximalen Kopplungsverhältnis am OVA ausgegangen werden, da OVA nur ca. 18-20 freie und damit koppelbare Lysinreste enthält. Da die Konjugation mit KLH analog erfolgte, konnte auch hier von einem Kopplungserfolg ausgegangen werden. Die Kopplungsrate sollte aber aufgrund der Größe des Moleküls wesentlich größer sein. Durchschnittliche Haptendichten zwischen 700 und 1000 (Rittenberg und Amkraut, 1966) sind bei KLH-Konjugaten zu verzeichnen.

Für den Einsatz der Beschichtungskonjugate im ELISA wurden Beschichtungskonjugate mit geringerem Kopplungsverhältnis hergestellt. Es wurde eine erneute Synthese mit einer 24fach geringeren DO-Menge durchgeführt. Abbildung 10 zeigt die mit MALDI-TOF ermittelten Massenspektren von OVA und OVA-DO. Für OVA konnte eine Masse von 44912 Da ermittelt werden, währenddessen für das OVA-DO-Konjugat eine Masse von 45844 Da detektiert werden konnte. Somit koppelten 3 mol DO-Moleküle pro mol OVA.

3.2 Polyklonale Antikörper

3.2.1 Immunisierung und Serumgewinnung

Ein Kaninchen wurde mit KLH-DO immunisiert. Die Blutabnahme erfolgte 7 und 14 Tage nach jeder Boosterimmunisierung. Gewonnen wurden pro Blutabnahme ca. 20-30 ml Blut, was ca. 10-15 ml Antiserum entsprach. Das erste Serum konnte nach ca. 6 Wochen gewonnen werden. Ein erstes Screeningverfahren zur Suche nach Antikörpern war die zweidimensionale Titerbestimmung. Damit konnte die kleinste Konzentration an Beschichtungskonjugat und höchste Verdünnung an Antiserum festgestellt werden, bei der die Absorption bei 450 nm ungefähr 1 ergibt. Wie in Abbildung 11 zu erkennen ist, war dies der Fall bei 5 µg/ml OVA-DO und 1:120.000 Antiserumverdünnung. Im nächsten Schritt wurde das Serum mittels eines kompetitiven ELISA (Kapitel 2.2.4) auf spezifische Ak getestet. Hierzu wurden je 100 µl DO-Standards und 100 µl Antiserum in mit OVA-DO vorgecoateten Platten inkubiert. Die DO-Standardreihe reichte von 0–100 µg/ml DO, das Antiserum wurde, wie in der 2-dimensionalen Titerbestimmung festgestellt, in einer Verdünnung, von 1:120.000 eingesetzt. Abb. 12 zeigt einen kompetitiven ELISA mit dem Antiserum KDO 1/1. Mit zunehmender DO-Konzentration konnte zwar eine Verdrängung von Antikörpern verzeichnet werden, die Nachweisgrenze mit ca. 1,18 µg/ml war jedoch noch sehr hoch. Somit wurde die Immunisierung fortgeführt. Jedes weitere gewonnene Serum wurde wie oben beschrieben mit einer zweidimensionalen Titerbestimmung und mit einem kompetitiven ELISA getestet.

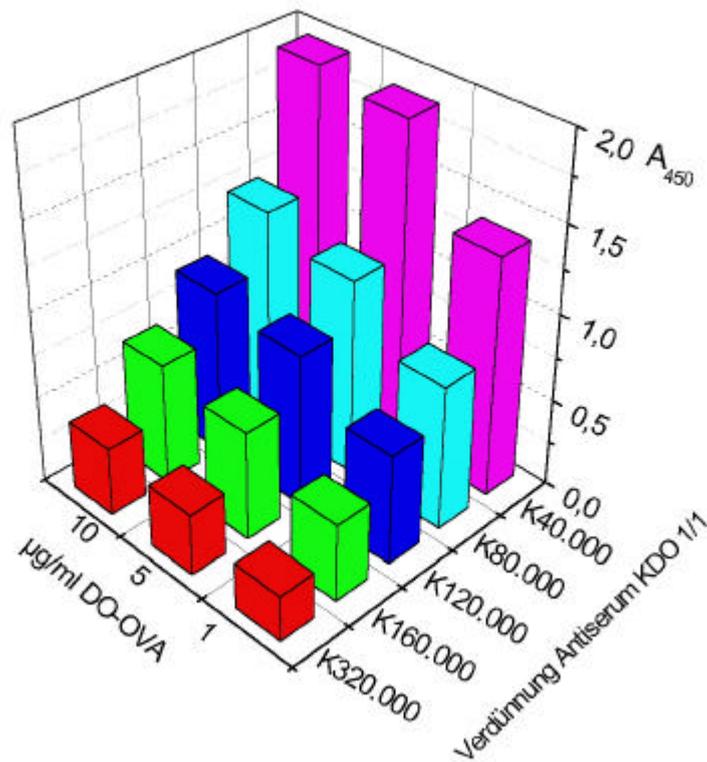


Abbildung 11: Checkerboardtitration des polyklonalen Antikörpers KDO 1/1

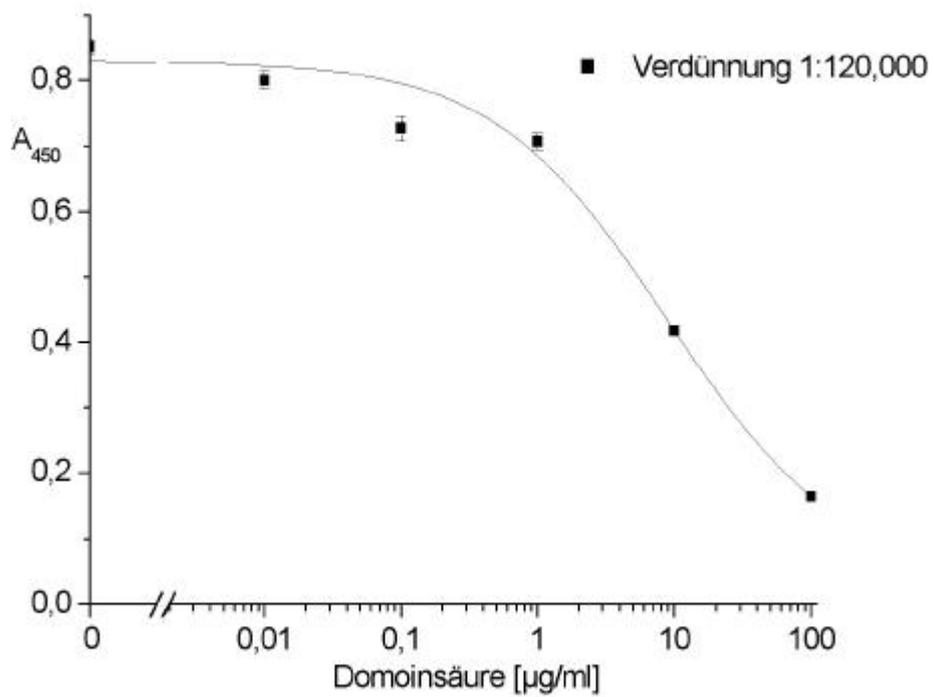


Abbildung 12: Kompetitiver ELISA des polyklonalen Antikörpers KDO 1/1

3.2.2 DO-Enzymimmunoassay mit polyklonalen Antikörpern

3.2.2.1 Entwicklung eines Standard-ELISA

14 Wochen nach der 1. Immunisierung konnte bei dem Kaninchen ein hoher Antikörpertiter festgestellt werden. Es wurden in 2 Blutabnahmen (5. und 6. Blutabnahme) jeweils etwa 15 ml Antiserum gewonnen. Die Antikörper der Seren erwiesen sich als recht sensitiv. Das Serum wurde im ELISA 1:1.500 verdünnt und mit DO-Standards (0–100 µg/ml) inkubiert. Der Assay wurde wie unter Kapitel 2.2.4 beschrieben durchgeführt. Es wurden verschiedene Blockierungsmittel untersucht, von dem sich 3 % Magermilchpulver als das Beste erwies. Die Nachweisgrenze für den nicht optimierten Test lag bei ca. 5 µg/l, der Testmittelpunkt bei ca. 100 µg/l. Es wurden sehr geringe Standardabweichungen erreicht, welche im Durchschnitt zwischen 1 und 6 % der Absorptionswerte lagen. Die Abbildung 13 zeigt eine DO-Standardkurve mit dem Serum KDO 1/5.

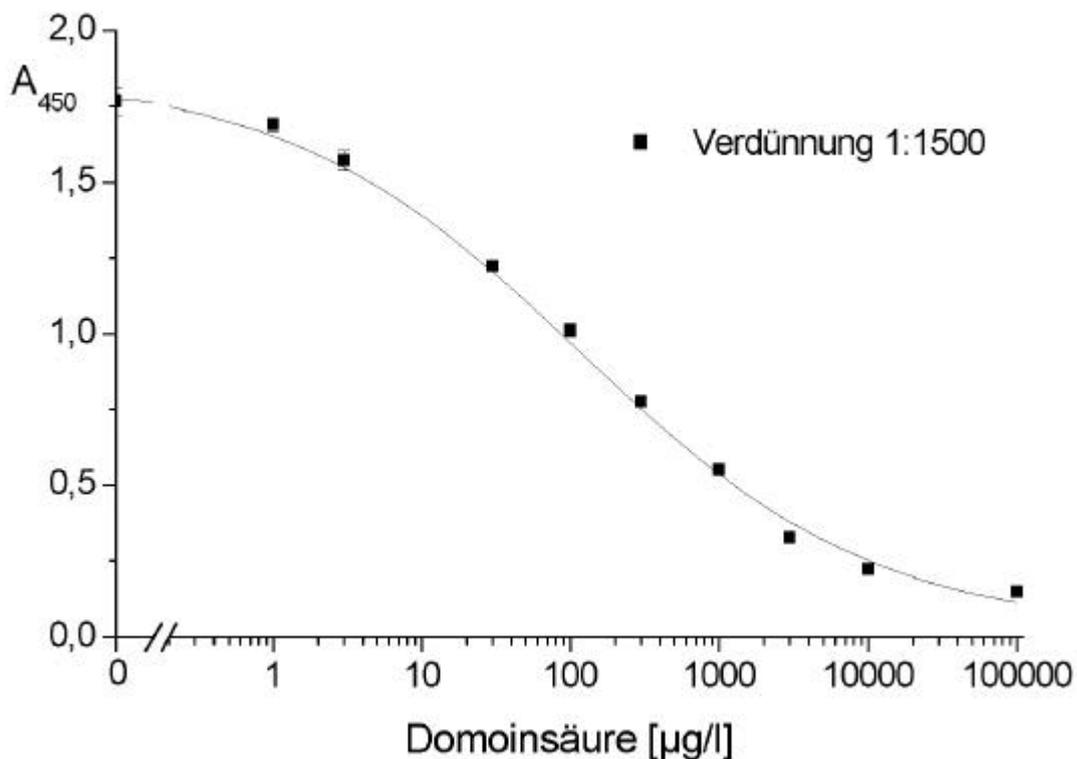


Abbildung 13: Kompetitiver ELISA des polyklonalen Antikörpers KDO 1/5

3.2.2.2 DO-Enzymimmunoassay mit Amplifizierungssystem

Eine Verbesserung der Sensitivität des DO-ELISA erreichte man mit einem Amplifizierungssystem, dem sogenannten ABC-System. Hierbei wird ein biotinylierter Sekundärantikörper verwendet, der an die polyklonalen Kaninchen-Ak binden kann. Anschließend erfolgte die Zugabe eines Streptavidin-POD-Komplexes. Somit konnten im Vergleich zum POD-markierten Sekundärantikörper mehr POD Moleküle immobilisiert werden. Leider gab es bei Verwendung des Amplifizierungssystems stets ein hohes Hintergrundrauschen. Dieses Problem konnte durch Inkubation des biotinylierten Sekundärantikörpers und des Streptavidin-POD-Komplexes in 1% BSA-PBS-Lösung behoben werden. Durch den Einsatz des ABC-Amplifizierungssystems konnte die Nachweisgrenze von 5 $\mu\text{g/l}$ auf 0,8 $\mu\text{g/l}$ verbessert werden (Abb. 14). Der Testmittelpunkt lag bei diesem System bei ca. 15 $\mu\text{g/l}$.

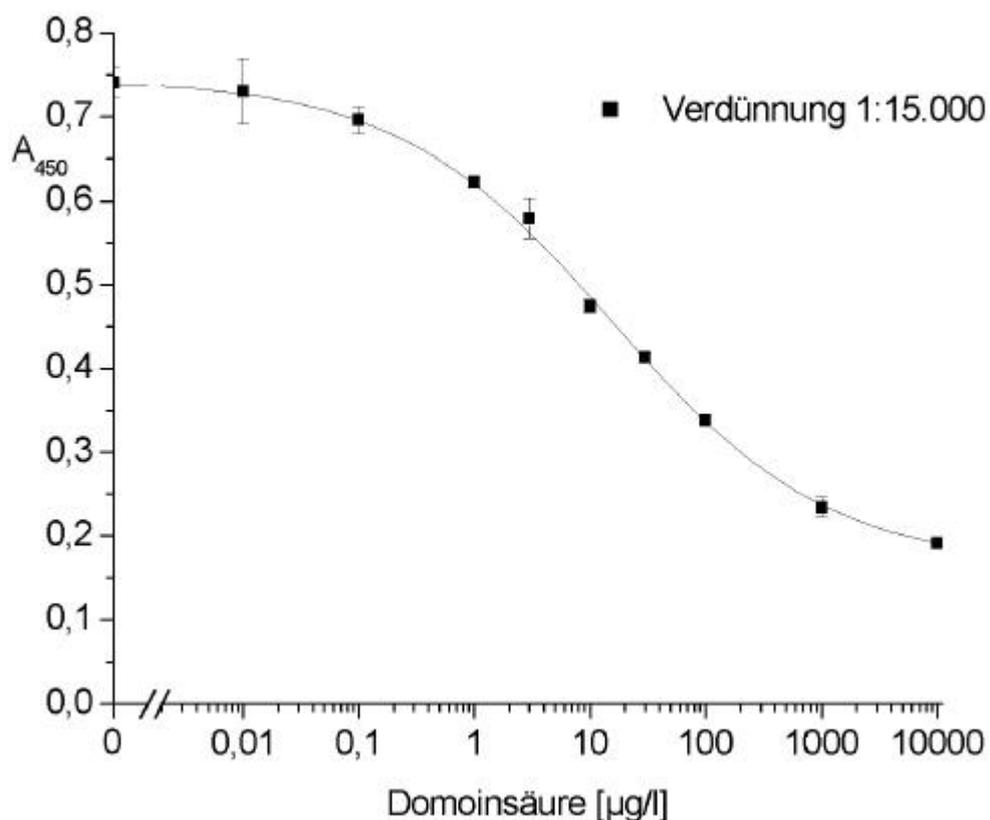


Abbildung 14: ABC-ELISA mit polyklonalen Antikörper KDO 1/5

3.2.3 Bestimmung von Kreuzreaktivitäten

Die Selektivität eines Antiserums gibt Auskunft über die Bindung anderer Analyten neben DO. Gewünscht ist eine hohe selektive Erkennung von DO. Deshalb wurde mit dem optimierten Assay ein Kreuzreaktivitätstest durchgeführt. Standards (0-10.000 $\mu\text{g/l}$) von strukturell der Domoinsäure ähnlichen Substanzen wie Kainin-, Glutamin, Asparagin-, Geranyl- und 2-Methyl-3-Butensäure, wurden hierfür hergestellt und mit dem Antiserum KDO 1/5 im ELISA inkubiert. Die weiteren ELISA-Schritte sind unter Kapitel 2.2.5 beschrieben. Es konnte festgestellt werden, dass keine der oben aufgeführten Substanzen im untersuchten Konzentrationsbereich die pAk verdrängen konnte (Abb. 15). Es standen somit hoch sensitive Ak zur Verfügung.

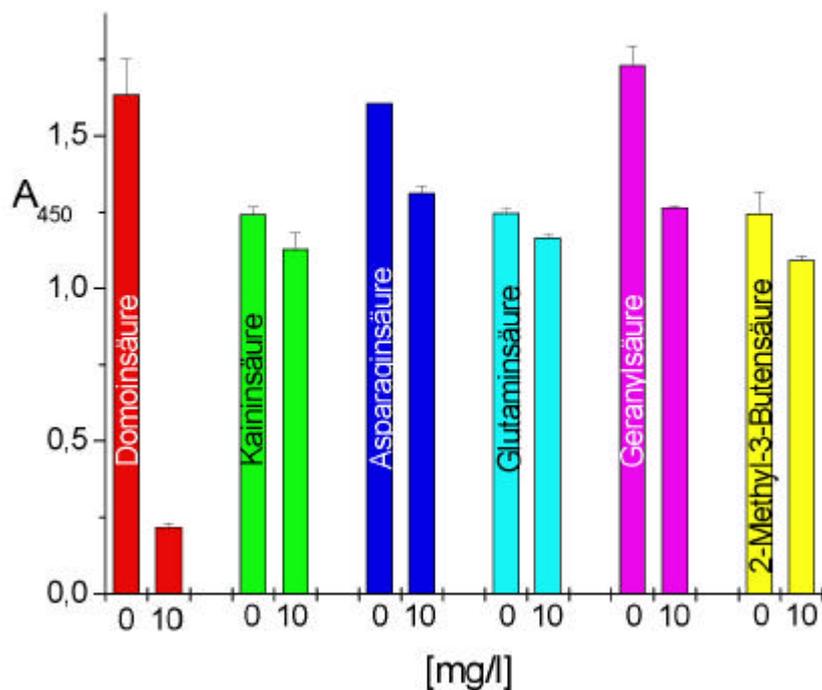


Abbildung 15: Kreuzreaktivitäten des polyklonalen Antikörpers KDO 1/5

Realprobenmessungen wurden mit den pAk nicht durchgeführt, da das Ziel die Entwicklung monoklonaler Antikörper und deren Einsatz zur Realprobenmessung war. Polyklonale Antikörper wurden entwickelt, um die mit Biosensoren arbeitenden Projektpartner während der Entwicklung von monoklonalen Antikörpern bereits mit ausreichenden Mengen an Antikörpern versorgen zu können. Ferner eigneten sich diese aufgrund der großen Volumina an Antiserum hervorragend dazu, Screeningverfahren für mAk zu entwickeln.

3.3 Entwicklung von monoklonalen Antikörpern gegen Domoinsäure

3.3.1 Immunisierung von Mäusen mit KLH-DO

Insgesamt wurden 12 Mäuse mit KLH-DO immunisiert. Es wurden immer eine Gruppe von 3-4 Tieren mit dem gleichen Konjugat immunisiert, da selbst innerhalb einer genetisch homogenen Versuchstiergruppe die Immunantwort auf ein injiziertes Konjugat recht unterschiedlich ausfallen kann. Der Erfolg der Immunisierung wurde ab der 2. Immunisierung in den Mauseren mit einem zweidimensionalen Titertest und anschließendem kompetitiven ELISA überprüft (Kap. 2.2.4). Zuerst wurde mit der zweidimensionalen Titerbestimmung die kleinste Konzentration an Coatkonjugat und höchste Verdünnung an Antiserum festgestellt, bei der noch ausreichende Absorptionen zu erreichen waren. Abbildung 16 zeigt beispielhaft die zweidimensionale Titerbestimmung eines polyklonalen Serums einer immunisierten Maus. Für einen anschließenden ELISA wurden die Platten folglich mit 1 µg/ml OVA-DO vorgecoatet. Das Serum wurde 1:30.000 verdünnt und zusammen mit DO-Standards auf der Platte inkubiert. Zur Detektion der belegten Bindungsstellen wurde ein POD-markierter Zg<ms>IgG Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:20000 eingesetzt (Abb. 17). Die angegebenen Werte beziehen sich auf Seren, denen die letzte Blutabnahme vor der Fusion zugrunde liegt.

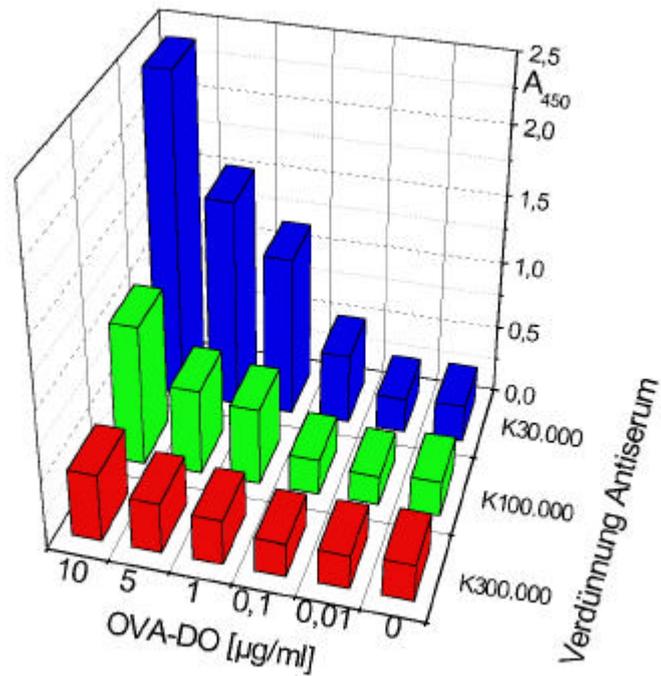


Abbildung 16: Checkerboardtitration des polyklonalen Mausentiserums M9

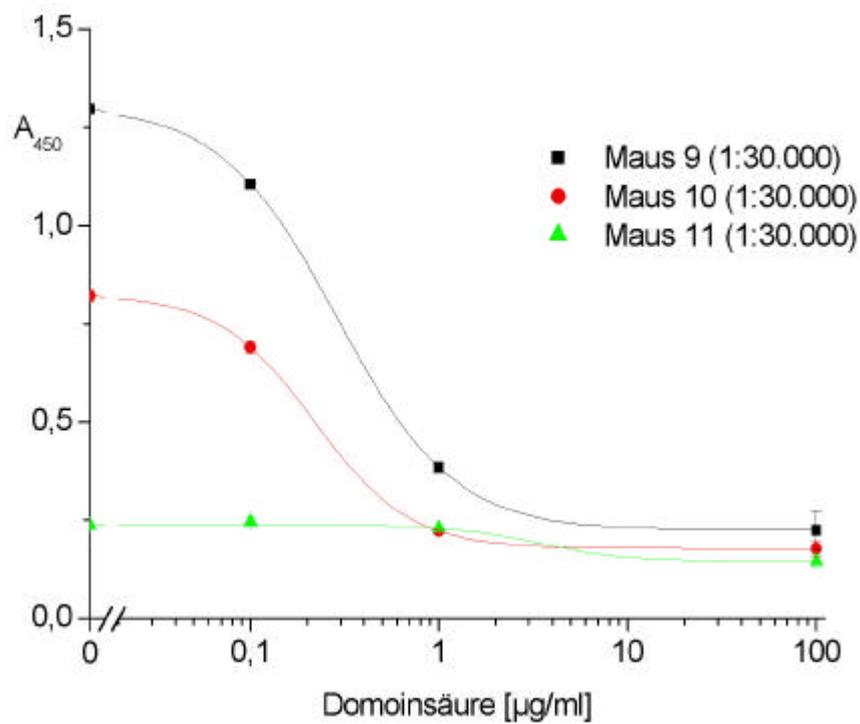


Abbildung 17: Kompetitiver ELISA mit polyklonalen Mausentisera

Alle mit KLH-DO immunisierten Mäuse wiesen spezifische Antikörper in ihren Serum auf. Wie in Abbildung 17 zu erkennen ist, unterlagen die Seren innerhalb einer Tiergruppe oft großen Schwankungen in der Immunantwort. So konnte z.B. mit den Seren der Mäuse 9 und 10 eine Nachweisgrenze von ca. 90 $\mu\text{g/l}$ mit einem Testmittelpunkt von ungefähr 200 $\mu\text{g/l}$ erreicht werden. Das Serum der Maus 11 zeigte dagegen keine Immunantwort (Abb. 17). Bei manchen Tieren waren deutliche Reaktionen im Serum erst nach der 5. Immunisierung zu verzeichnen. In Abbildung 18 ist der Anstieg des Antikörpertiters während eines Immunisierungsverlaufs innerhalb einer Mäusecharge schematisch dargestellt. Dabei wurden Seren eines einzelnen Tieres während der Immunisierung mit einem nicht kompetitiven ELISA miteinander verglichen. Die Seren wurden 1:30000 verdünnt und auf den mit OVA-DO vorgecoateten Platten inkubiert. Es sind deutlich die unterschiedlichen Reaktionen der Immunantworten der einzelnen Mäuse auf KLH-DO zu erkennen. Dies spiegelt sich in unterschiedlichen Antikörpertitern wider. Zur Fusionierung kamen nur Tiere in Frage, die sowohl einen hohen Antikörpertiter als auch eine gute Verdrängung von DO aufwiesen.

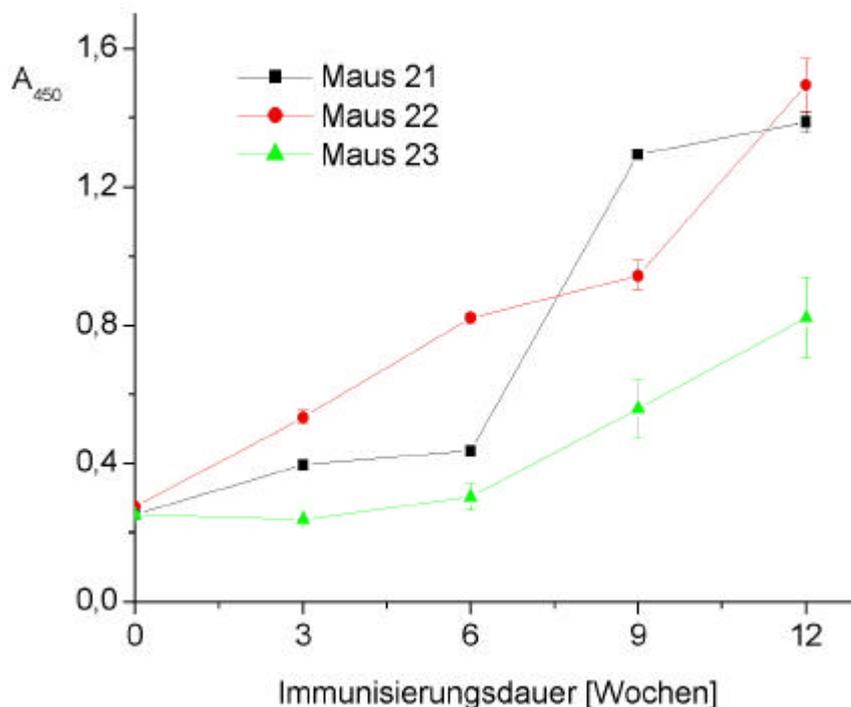


Abbildung 18: Titeranstieg von Mausentseren während einer Immunisierungsphase

3.3.2 Zellfusion

IgG produzierende Lymphozyten aus der Mäusemilz sind in der Zellkultur nicht überlebensfähig. Deshalb werden sie mit Permanentlinien von Maus-Myelomen fusioniert. Es wurden insgesamt 7 Fusionen durchgeführt. Um die Anzahl spezifischer B-Zellen und damit die Fusionsausbeute zu erhöhen, erfolgte vier Tage vor der Fusion täglich eine Boosterung mit 400 µg Konjugat. Als Fusionsmittel wurde PEG 1500 eingesetzt, welches auf eine hohe Fusions-effizienz getestet (Boehringer Mannheim, Herstellerangabe) wurde. Nach der Fusion wurden ca. 50 % auf 96er Zellkulturplatten ausgesät, während die restliche Fusion für eine spätere Verwendung eingefroren wurde. Mit PEG 1500 waren im Durchschnitt ca. 80 % aller Kavitäten mit Hybridomzellen bewachsen. Der erste Mediumswechsel wurde mit Beginn der HAZ-Selektion durchgeführt. Eine Bestimmung wachsender Klone entfiel, da diese vor dem ersten Mediumswechsel erfolgen müsste, um sicher zu gehen, dass keine Klone durchwirbelt werden. Eine Unterscheidung von Myelom- und Hybridomzellen ist außerdem vor der HAZ-Selektion nur schwer möglich. Somit wäre die Anzahl von wachsenden Klone zu hoch angesetzt, was zu falschen Fusionsraten führt. Viel interessanter erscheint die Bestimmung der Anzahl von Klonen, die eine Affinität zum Hapten aufweisen (s. Kap. 3.3.3).

3.3.3 Screening der Zellkulturüberstände

Das Screening der Zellkulturüberstände auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper erfolgte nach der HAZ-Selektion (ca. 14 Tage nach der Aussaat). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass nicht fusionierte B-Lymphozyten noch am Leben waren. Diese sind ebenso in der Lage, spezifische Ak zu produzieren und somit ein positives Signal im EIA zu erzeugen. Als Screeningassay wurde der unter Kapitel 2.2.3 beschriebene EIA durchgeführt. Um bei der begrenzten Menge an ZKÜ (ca. 200 µl/Kavität) viel Information aus dem Test zu gewinnen, wird neben der Bindung des Antikörpers an das Antigen OVA-DO (PBS-Puffer-Kontrolle) auch die Verdrängung der Ak mit freier Domainsäure (10000 µg/l DO) untersucht. Mit dem Assay konnten nach jeder Fusion positive Kavitäten auf den Platten identifiziert werden. Die Kavitäten 21/6 4D, 21/6 7D, 21/3 9B zeigten im Screening eine Verdrängung von freier Domainsäure von 40 - 90 % (Abb.19).

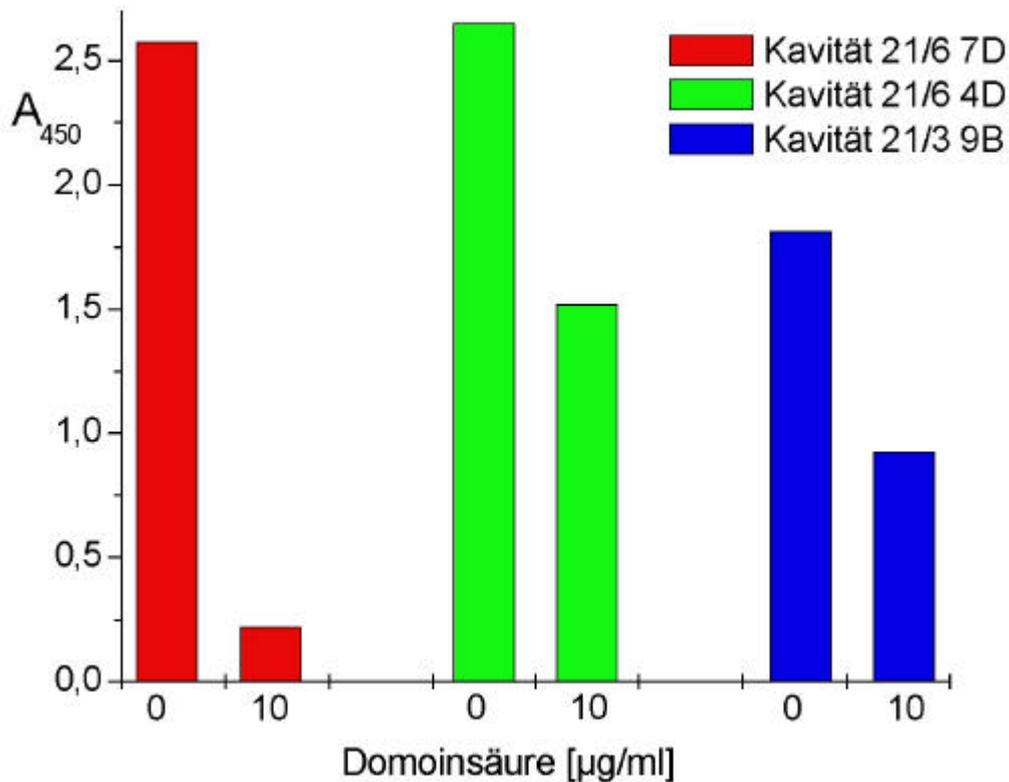


Abbildung 19: Screening verschiedener Zellkulturüberstände

Die Anzahl der Klone mit stabiler Antikörperproduktion nahm aber kontinuierlich während des Screenings ab. Oftmals stellen Hybridomlinien die Ak-Produktion nach einiger Zeit ein bzw. sehr schwach wachsende Linien sterben ab. Im Falle, dass die Antikörperproduktion einer Hybridomlinie über Wochen anhält, kann von einer stabilen Hybridomlinie gesprochen werden. Das Screeningverfahren wurde 6-8 mal wiederholt. Positive Kavitäten wurden durch Einzelzellablage und mittels der „Limiting Dilution Method“ kloniert. Deren Kavitäten wurden wiederum mit dem Screeningassay mindestens 4 mal überprüft. Positive Einzelklone wurden weitervermehrt, indem sie sowohl rekloniert als auch in größere Zellkulturgefäße umgesetzt wurden. Wenn möglich, wurden immer einige Aliquots kryokonserviert. Im Folgenden wird eine Fusion näher besprochen.

Hier zeigten acht Kavitäten von 576 Zellkulturüberständen eine positive Bindung an das Coatkonjugat (1,3%). Deutliche Verdrängung von DO zeigten davon 4 Kavitäten (0,7%). Insgesamt konnten von sieben durchgeführten Fusionen drei stabile Klone isoliert werden. Diese anscheinend geringe Anzahl von Klonen ist durch folgende Faktoren bedingt. Neben der häufig vorkommenden Einstellung der Antikörperproduktion von Hybridomlinien konn-

ten oft Hybridomlinien mit einer unzureichenden Affinität gegenüber Domoinsäure festgestellt werden. Die Ak jener Linien konnten sehr gut an das Coatkonjugat OVA-DO binden, ließen sich aber nicht oder nur sehr schlecht durch freie DO verdrängen. Solche Antikörper sind gegen antigene Determinanten gerichtet, die nur das Coatkonjugat aufweist und sind somit für die Entwicklung eines anti-DO ELISA ungeeignet.

Nach zweimaliger Klonierung mittels Einzelzellablage und der „Limiting Dilution Method“ konnten drei Hybridomklone isoliert werden, welche die monoklonalen Antikörper 4D1D, 7D6C und 9B10D produzierten. Die Einzelzellablage war der „Limiting Dilution Method“ vorzuziehen, da man mit dieser mehr Einzelzellen/Kavität erzielen konnte. Die Klone wurden auf größere Zellkulturplatten übertragen, so dass größere Mengen an ZKÜ gewonnen werden konnten.

3.4 Entwicklung eines Enzymimmunoassays zum Nachweis von Domoinsäure

Mit den Zellkulturüberständen von den Klonen 7D6C, 9B10D und 4D1D wurden daraufhin indirekte kompetitive ELISA durchgeführt, um die Sensitivität gegenüber den Analyten zu ermitteln. Nach jeder Zellkulturüberstandsernte musste die für den EIA optimale ZKÜ-Verdünnung mittels einer zweidimensionalen Titerbestimmung erneut ermittelt werden. Zur Durchführung eines indirekt kompetitiven ELISAs wurden 100 µl DO-Standards (0-10.000 µg/l) und 100 µl mit PBS verdünnter Zellkulturüberstand (1:10.000–1:25.000) auf der Platte inkubiert. Dabei ergaben sich Nachweisgrenzen von 45 µg/l für mAk 7D6C, 25 µg/l für mAk 9B10D und 20 µg/l für mAk 4D1D (Abbildungen 20-22).

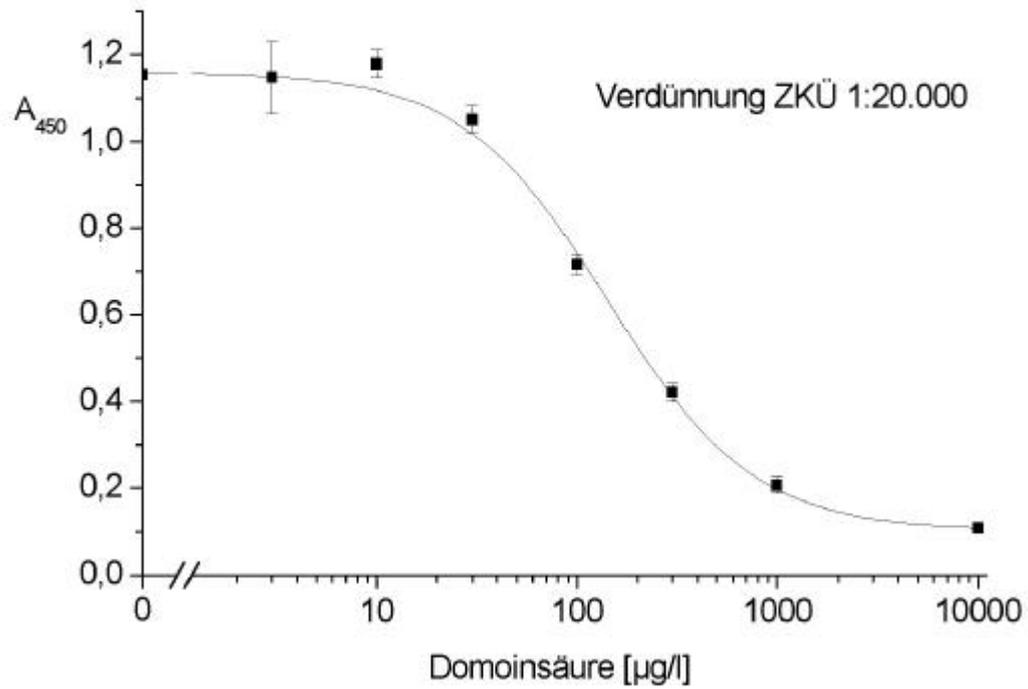


Abbildung 20: Kompetitiver ELISA mit ZKÜ 7D6C

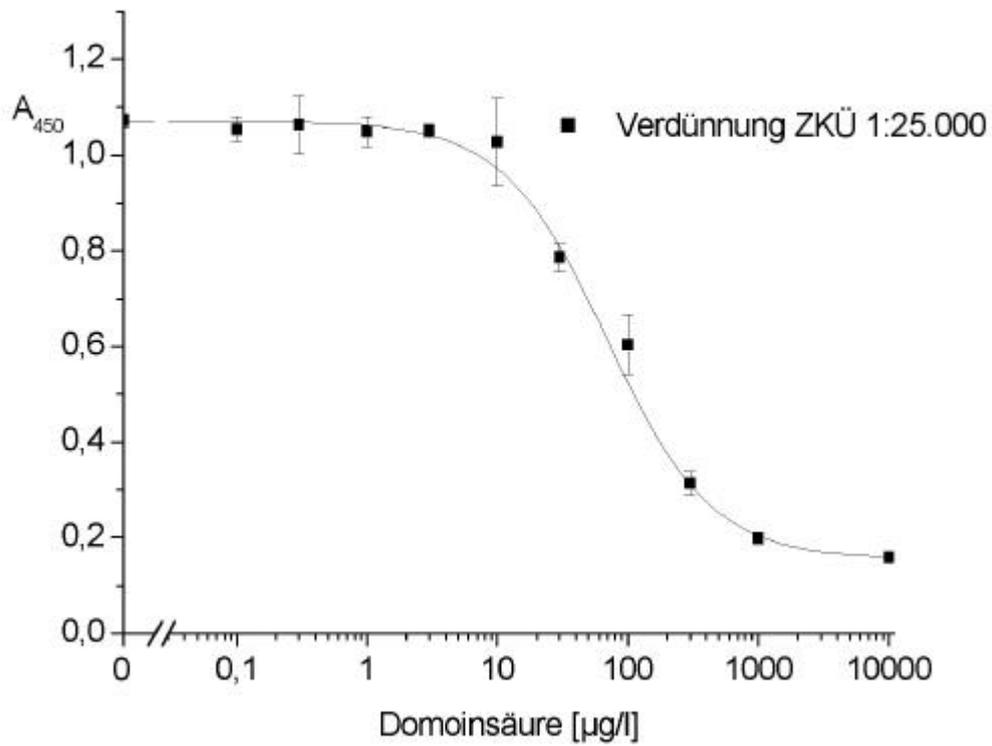


Abbildung 21: Kompetitiver ELISA mit ZKÜ 9B10D

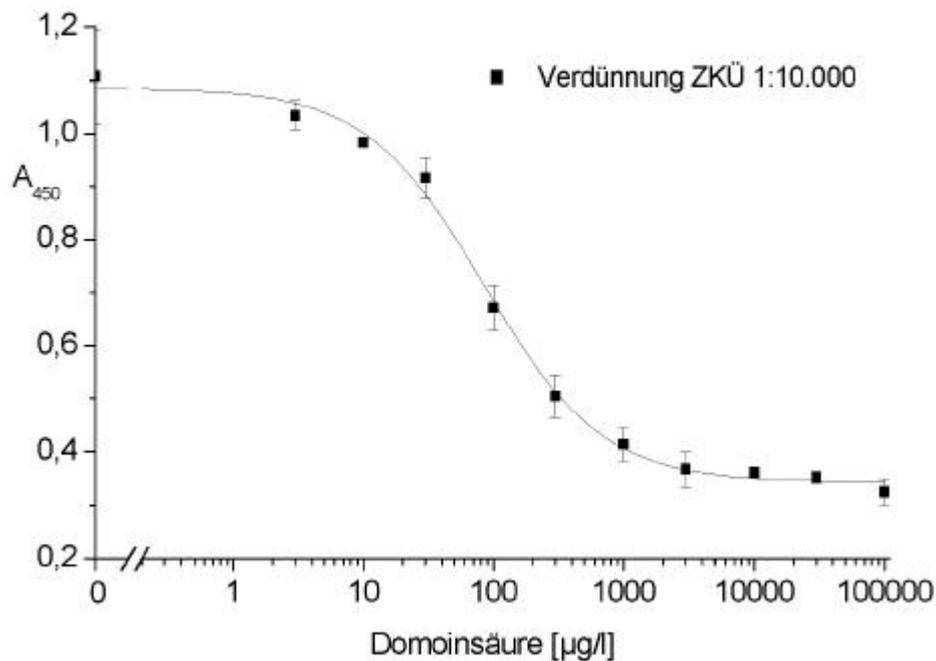


Abbildung 22: Kompetitiver ELISA mit ZKÜ 4D1D

3.4.1 Bestimmung der Immunglobulinsubklasse

Die Bestimmung der Immunglobulinsubklasse der drei isolierten spezifischen Zelllinien erfolgte mit einem Sandwich-ELISA mit subklassenspezifischen Sekundärantikörpern. Es wurde zusätzlich zur Subklasse die Art der Leichtkette (κ oder λ) bestimmt. Die drei Klone 7D6C, 9B10D und 4D1D gehörten zur IgG₁-Subklasse mit κ -Leichtketten.

3.4.2 Massenproduktion monoklonaler Antikörper

Zur Massenproduktion wurde nur der Klon 4D1D herangezogen, da dieser das beste Wachstum und die größte Sensitivität gegenüber Domoinsäure zeigte und somit für eine Probenmessung am geeignetsten schien. Die Kultur von Hybridomen erfolgte üblicherweise im serumhaltigen Medium, um ein optimales Wachstum auch in kritischen Phasen wie z.B. nach der Fusion zu gewährleisten. Vor der Massenvermehrung von mAk wurden die Hybridomalinien jedoch auf serumfreies Kulturmedium umgestellt. Dadurch konnten die mAk leichter aufgereinigt werden, da schwer entfernbare Kontaminationen mit Rinder-IgG, welche in serumhaltigen Medium vorkommen, verhindert wurden. Die Umstellung auf serumfreies Me-

dium erfolgte durch schrittweise Reduktion des serumhaltigen Normalmediums. Aufgrund des geringen Proteingehaltes des SFM zeigten die Zellen ein verringertes adhärentes Wachstum und blieben in Suspension. Nach jedem Mediumswechsel musste somit ein Zentrifugationsschritt erfolgen. Die Umstellung war für den Klon 4D1D unproblematisch. Die Massenproduktion erfolgte im Biofermenter Miniperm (Vivascience) und im Biofermenter CL 350 (Integra). Dafür wurde das Produktionsmodul der beiden Fermentersysteme wie unter Kapitel 2.2.3.7 beschrieben mit $1-4 \cdot 10^6$ Zellen/ml beimpft, die Versorgungsmodule mit der entsprechenden Menge an SFM-Medium aufgefüllt und im Brutschrank inkubiert. Mediumswechsel erfolgte je nach Wachstum der Zellen alle 2-6 Tage. Dabei wurden die Zellzahl und die IgG-Menge bestimmt. Die Abbildungen 23 und 24 zeigen die Zellzahlen und das akkumulierte IgG, die in den unterschiedlichen Systemen gewonnen wurden. Im Biofermenter CL350 konnten während 35-tägiger Kulturzeit insgesamt 24 mg IgG geerntet werden. Eine durchschnittliche Zellzahl von 10^6 Zellen/ml mit einer maximalen Zellzahl von $3,2 \cdot 10^6$ wurde bei diesen System erreicht (Abb. 23). Im Biofermenter Miniperm wurden hingegen nach einer Kulturzeit von 20 Tagen 60 mg IgG geerntet. Dabei betrug die durchschnittliche lebende Zellzahl $7 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Die maximale Zellzahl belief sich auf 10^7 Zellen/ml (Abb. 24). Tab. 6 zeigt einen Vergleich der unterschiedlichen Kulturdaten der beiden Biofermentersysteme. Die Zellkulturüberstände wurden gesammelt, bei -20 °C gelagert und anschließend zusammen aufgereinigt.

Tabelle 6: Vergleich der Kulturdaten von MiniPerm und CL 350

	MiniPerm	Integra CL 350
Kulturzeit	20 Tage	35 Tage
durchschnittliche lebende Zellanzahl [ml]	$7 \cdot 10^6$	10^6
durchschnittliche mAk-Konzentration [mg/ ml]	0,68	0,16
Gesamtzellkulturüberstand [ml]	89	150
Gesamt-IgG [mg]	60	24

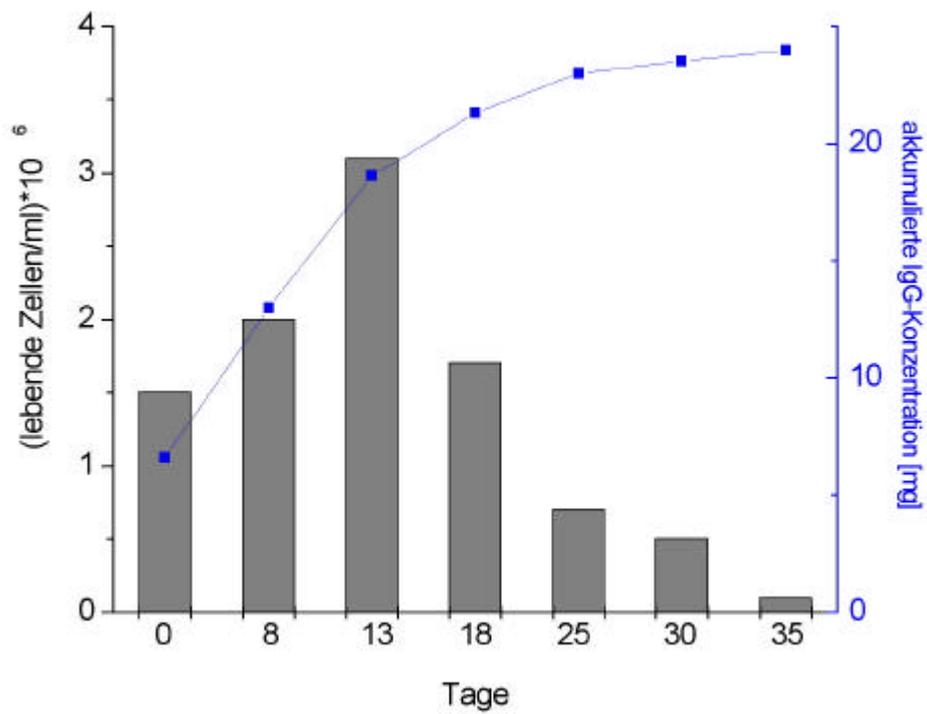


Abbildung 23: Massenproduktion des mAk 4D1D im Biofermenter CL 350

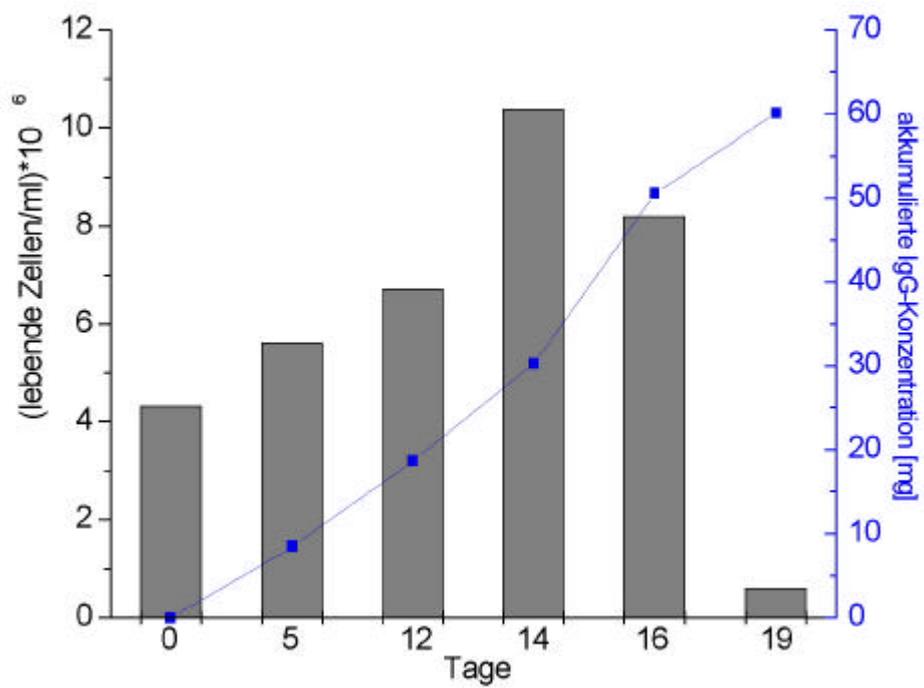


Abbildung 24: Massenproduktion des mAk 4D1D im Biofermenter MiniPerm

3.4.3 Reinigung und Konzentrierung von Antikörpern

Zur Standardisierung der ELISA-Bedingungen war es notwendig, die gewonnenen Überstände aufzureinigen. Dies geschah mittels eines affinitätschromatographischen Verfahren unter Nutzung von Protein A. Dieses Protein besitzt eine hohe Affinität zum F_c-Teil von IgG-Molekülen. Eine Aufreinigung der serumhaltigen Überstände über Protein A erfolgte nicht, da enthaltenes Rinder-IgG mit dem Maus IgG um die Bindungsstellen des Affinitätsliganden konkurriert. Oft werden dabei mehr als 50% der Bindungskapazität für die Fremd-IgG-Bindung genutzt. Da weiterhin alle gewonnenen Antikörper der Subklasse IgG₁ angehörten, konnte das Rinder-IgG nicht sauber abgetrennt werden, da sich Rinder IgG wie IgG₁ bereits bei pH 8 eluieren lässt. Reine mAk sind hier nur aus serumfreien ZKÜ zu gewinnen. Bei Antikörpern der Subklassen IgG_{2a}, IgG_{2b} oder IgG₃ lässt sich die Abtrennung hingegen durchführen, da diese erst im pH-Bereich zwischen 3 und 6 eluieren (Peters und Baumgarten, 1990).

Aufgrund der besseren Sensitivität wurde nur der mAk 4D1D in serumfreiem Medium kultiviert. Die Aufreinigung erfolgte mit Prosep A oder Protein A-Agarose wie unter Kapitel 2.2.3.9 beschrieben. Abbildung 25 zeigt eine Elutionskurve der affinitätschromatographischen Aufreinigung des mAk 4D1D in serumfreiem Medium. Nach Durchlauf des Zellkulturüberstandes war ein breiter Peak aufgrund von nicht gebundenen Proteinen festzustellen. Nach einem Waschschrift erfolgte die Elution von den an Protein A gebundenen mAk, welche an dem einzelnen scharfen Peak zu erkennen ist. Zur Reinigung der Säule wurde die Säule abschließend mit HCl, pH 1,5 gewaschen.

Die Reinheit des mAk 4D1D wurde nach der Umpufferung mittels SDS-PAGE bestimmt. Abbildung 26 zeigt die elektrophoretische Auftrennung des mAk 4D1D. Die Auftrennung erfolgte unter nicht reduzierenden Bedingungen und zeigte, dass die Aufreinigung des mAk 4D1D über Protein A-Affinitätschromatographie erfolgreich und ohne verunreinigende Proteine abgeschlossen werden konnte. Es ist zu erkennen, dass die 4D1D-Bande bei ca. 155 kDa liegt. Neben der Bande wurde ein Marker aufgetragen.

Die aufgereinigten Antikörper wurden anschließend lyophilisiert und bei -20 °C gelagert. Bei Bedarf wurden sie in PBS-Puffer resuspendiert.

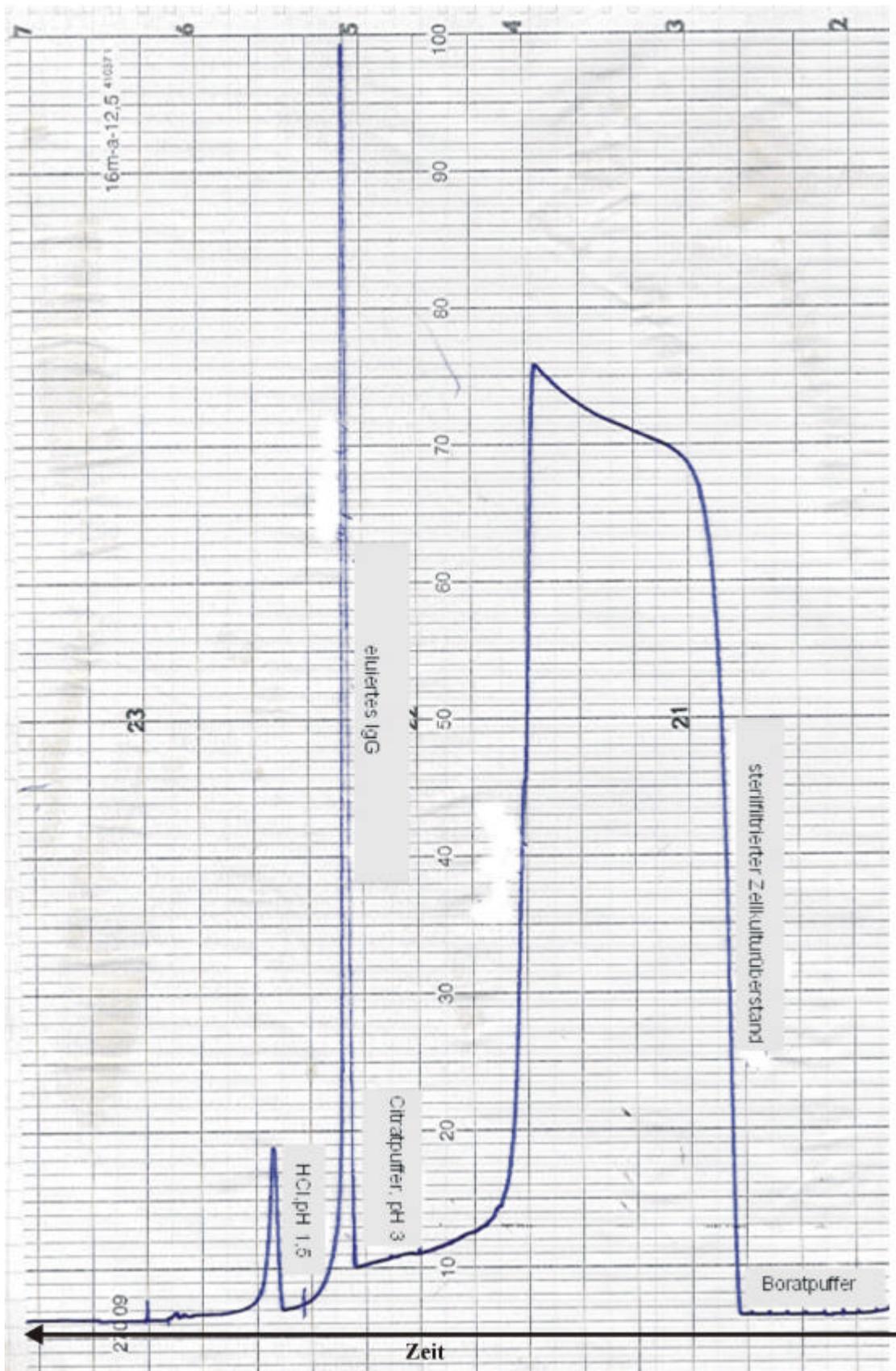


Abbildung 25: Photometrische Bestimmung des Proteingehaltes während der Aufreinigung von ZKÜ aus serumfreiem Medium

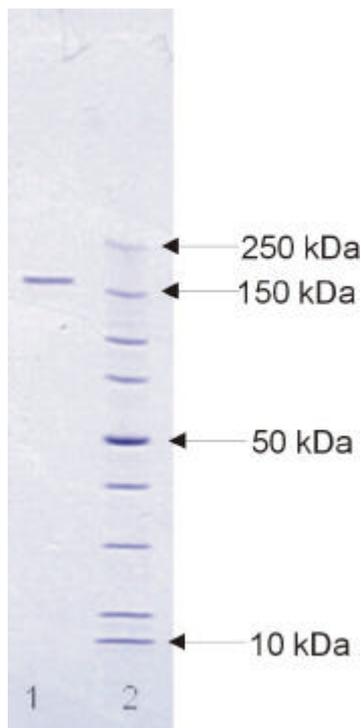


Abbildung 26: SDS-Gel des mAk 4D1D

3.5 Standardisierung und Optimierung eines Enzymimmunoassay zum Nachweis von Domoinsäure mit monoklonalen Antikörpern

Der mAk 4D1D zeigte, wie bereits erwähnt, von allen erhaltenen Zelllinien die beste Sensitivität gegenüber Domoinsäure. Somit wurde dieser Antikörper benutzt, um ein Testsystem zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Domoinsäure zu entwickeln. Testoptimierung bedeutet in der Praxis u.a. die Ermittlung der optimalen mAk- und Sekundärantikörperkonzentrationen, des optimalen Blockierungsmittels und der besten Coatkonjugatkonzentration. Für die Testoptimierung wurde deshalb nur aufgereinigter mAk verwendet, da sich ZKÜ aufgrund des unterschiedlichen IgG-Gehaltes nicht zur Testoptimierung eignen. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurden verschiedene Blockierungsmittel wie OVA, Gelatine, BSA und Magermilchpulver in unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Zusätzlich wurde der Test auch ohne Einsatz eines Blockierungsmittels durchgeführt. Um festzustellen, ob der mAk nicht an das Blockierungsmittel bindet, wurden nicht vorgecoatete Reihen ebenfalls blockiert. Der Antikörper 4D1D interferierte mit keinem der Blockierungsmittel. Als optimales Blockierungsmittel, mit dem das niedrigste Hintergrundrauschen erzielt wurde, erwies sich 3 % Magermilchpulver. Nach einer folgenden 2-dimensionalen Titerbestimmung stellte sich eine Beschichtungskojugatkonzentration von 5 µg/ml, eine mAk-Verdünnung von 1:20.000 und eine Zg<ms>POD Verdünnung von 1:20.000 als optimal heraus. Abweichungen von die-

sen angegebenen Werten führten zu Sensitivitätsverlusten bzw. höherem Hintergrundrauschen. Die Nachweisgrenze konnte aber im Vergleich zu mit nicht aufgereinigten ZKÜ durchgeführten Versuchen nicht signifikant verbessert werden. Für den Standard-EIA konnte ein Testmittelpunkt von 100 µg/l und eine Nachweisgrenze von 19 µg/l ermittelt werden (Abb. 27). Zur Steigerung der Sensitivität entschied man sich deshalb für ein EIA-Amplifizierungssystem.

3.5.1 DO-ELISA mit Amplifizierungssystem

Zur Verbesserung der Sensitivität des Standard-ELISAs wurde ein ABC-System verwendet. Dafür wird ein biotinylierter Zg <ms> Sekundärantikörper eingesetzt, der an den spezifischen mAk 4D1D binden kann. Anschließend wurde ein Streptavidin-Biotin-Komplex zugegeben. Auf diese Weise konnte im Vergleich zur Verwendung eines POD-markierten Sekundärantikörpers mehr Peroxidase an den Primärantikörper gebunden werden. Dadurch konnte folglich mehr Substrat durch POD umgesetzt werden. Abbildung 27 zeigt die Kalibrierkurven des Standard-ELISA und des ABC-ELISAs. Durch den Einsatz des ABC-Systems konnte die Nachweisgrenze von 19 µg/l auf 3,9 µg/l und der Testmittelpunkt von 100 µg/l auf 10 µg/l verbessert werden. Zur Vermeidung von hohem Hintergrundrauschen musste der biotinylierte Sekundärantikörper und der Streptavidin-Biotin-Komplex in 1% BSA-PBS Lösung inkubiert werden.

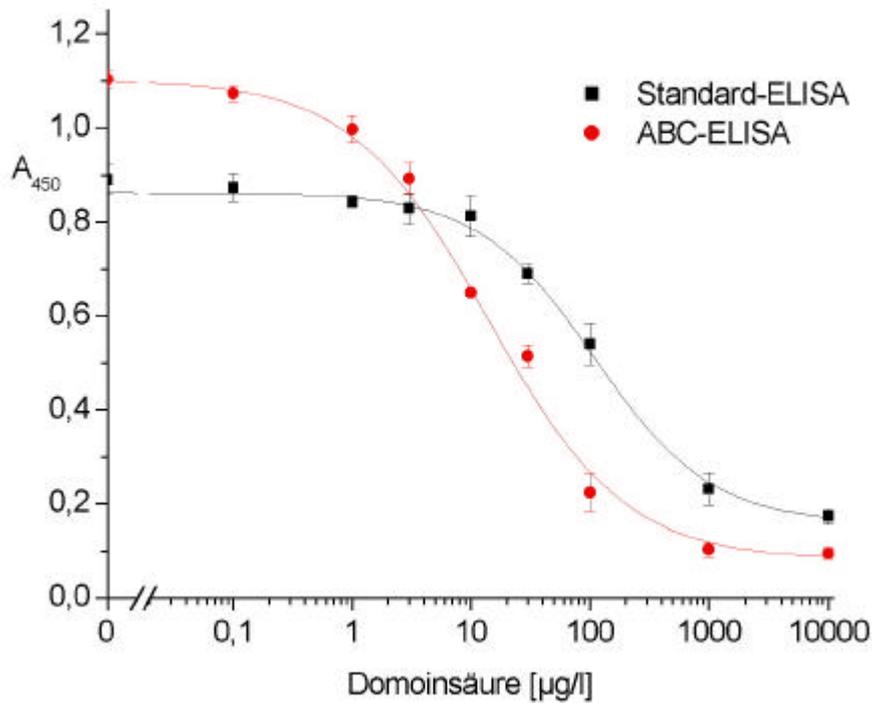


Abbildung 27: Optimierte ABC- und Standard-ELISA mit mAk 4D1D

3.5.2 Bestimmung der Kreuzreaktivitäten des mAk 4D1D

Ein weiteres Merkmal eines Antikörpers ist sein Kreuzreaktionsmuster. Dabei wird die Bindung des mAk mit dem Zielanalyten und mit Analyten strukturell ähnlicher Substanzen am Testmittelpunkt (50 % B/B₀) verglichen. Hierfür wurde der mAk 4D1D mit Standards von Domoin-, Kainin-, Glutamin, Asparagin-, Geranyl- und 2-Methyl-3-Butensäure wie unter Kapitel 2.2.7 beschrieben inkubiert. Abbildung 28 zeigt die Interaktion des mAk 4D1D mit den eingesetzten Substanzen. Hierbei ist zu erkennen, dass alle Substanzen im untersuchten Konzentrationsbereich keine Kreuzreaktion mit dem mAk 4D1D zeigten. Der entwickelte Antikörper 4D1D ist somit hochselektiv für Domoinsäure.

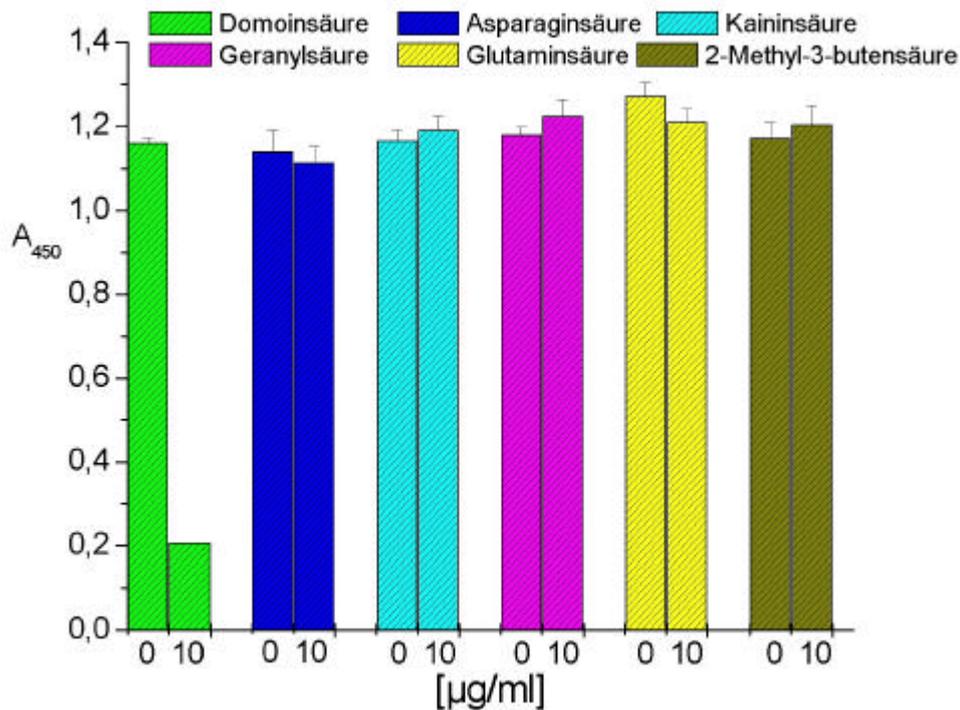


Abbildung 28: Kreuzreaktivitäten des mAk 4D1D

3.6 Probenmessung

3.6.1 Methanol-Kompatibilität des mAk 4D1D

Da Domoinsäure unter Verwendung eines 50 % Methanol-Wasser-Gemisches aus Muscheln extrahiert wird, war es nötig, die Methanolverträglichkeit des mAk 4D1D zu überprüfen. Hierfür wurden Standardreihen von DO in PBS, in 50 % Methanol/Wasser, in 25 % Methanol/Wasser und in 12,5 % Methanol/Wasser erstellt und, wie unter Punkt 2.2.8.2 beschrieben, im ELISA appliziert. Wie aus Abbildung 29 ersichtlich ist, trat bei einer Konzentration von 50 % Methanol/Wasser eine Verschlechterung der Nachweisgrenze von 4 µg/l auf 12 µg/l auf. Der Testmittelpunkt fiel von 10 µg/l auf 80 µg/l. Ab einer Konzentration von 25 % Methanol/Wasser konnten keine Matrixeffekte mehr festgestellt werden und die mit PBS erstellte Standardkurve glich nahezu der mit 25% Methanol/Wasser erstellten Standardkurve. Somit war es für eine Probenmessung notwendig, die extrahierten Proben mindestens 1:2 mit PBS zu verdünnen, um Matrixeffekte zu vermeiden.

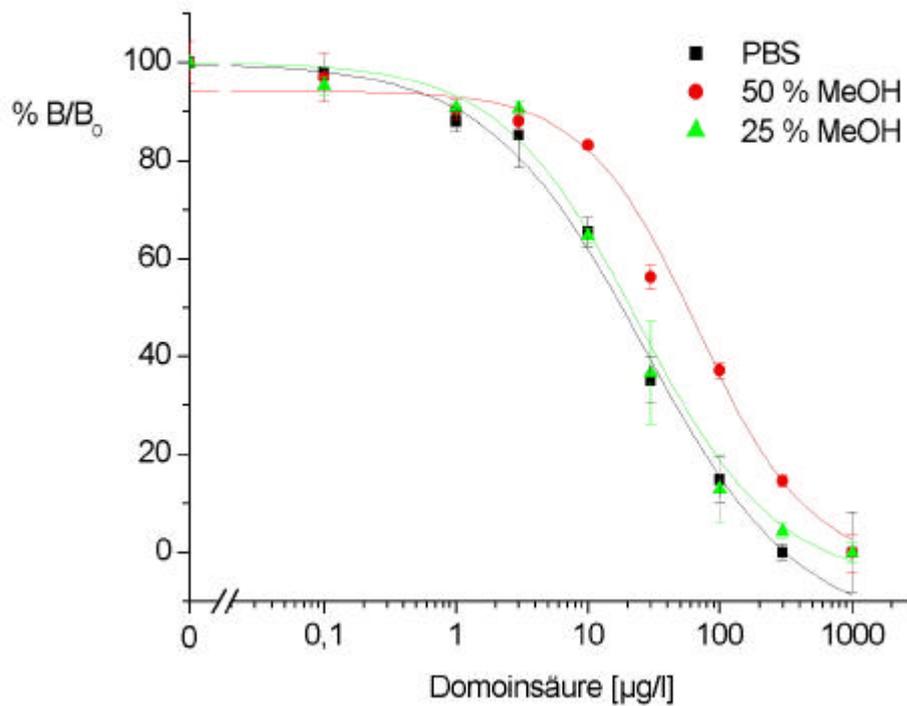


Abbildung 29: Methanolkompatibilität des mAk 4D1D

3.6.2 Ermittlung von Wiederfindungsraten

Um die Wiederfindungsraten von Domoinsäure im EIA zu bestimmen, wurde 1g Muschelgewebe mit 20 µg DO und 10 µg DO dotiert. Anschließend erfolgte die oben beschriebene Extraktion. Die Extrakte wurden 1:100 und 1:200 mit PBS verdünnt. Alle Proben wurden mehrmals in dreifacher Wiederholung gemessen. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate von DO betrug im EIA 88,5 % ± 4,9 %. Für die mit 20 µg/g dotierten Proben konnten dabei Wiederfindungsraten von 81,0 % ± 3,3 %, für die mit 10 µg/g dotierten Proben 96,0 % ± 6,4 % ermittelt werden (Abb. 30). Damit liegt für den ELISA eine leichte Unterbestimmung vor.

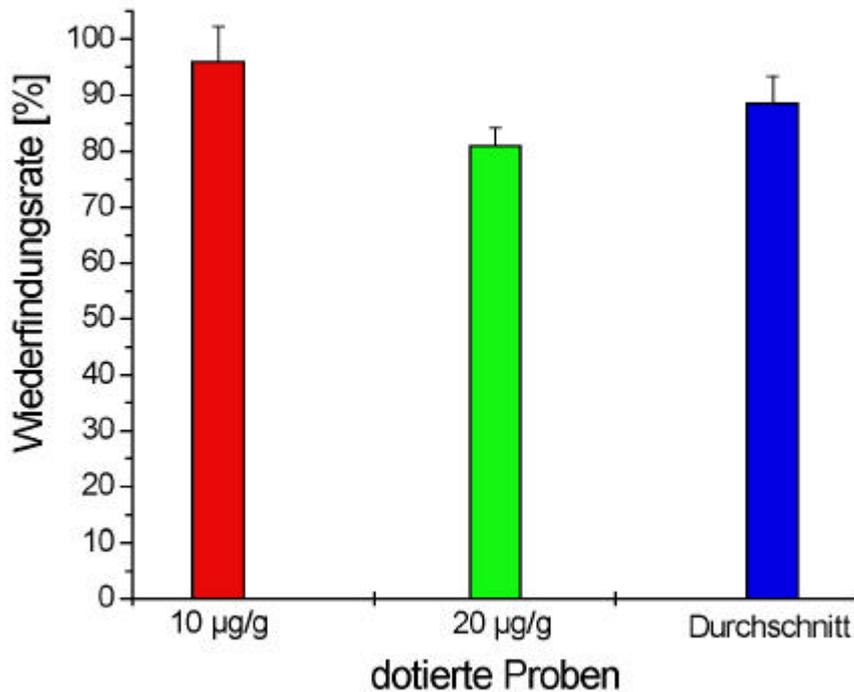


Abbildung 30: Wiederfindungsraten von DO

3.6.3 Bestimmung der DO-Konzentration von exponierten Muscheln

Miesmuscheln und *Anadonta* sp. wurden mit DO exponiert, die Gewebearten Kiemen, Hepatopankreas, Mantel, Gonaden und Hinterer Schließmuskel getrennt präpariert und extrahiert. Da die einzelnen Gewebearten oft nur geringe Mengen an DO beinhalteten, wurden Gewebehomogenate mit 40 µg/g aufgestockt und parallel zu nicht aufgestockten Proben im EIA gemessen, um eventuell auftretende Matrixeffekte feststellen zu können. Alle Proben wurden 1:4 mit PBS verdünnt, direkt im ELISA appliziert und in dreifacher Wiederholung gemessen. Nach Bereinigung der Messergebnisse um die aufgestockte DO-Menge ergab sich folgende Verteilung von DO im Frischgewicht der untersuchten Muschelarten. Bei *Anadonta* sp. akkumulierte DO im Hepatopankreas mit 0,73 µg/g FG, gefolgt vom Gonadengewebe mit 0,23 µg/g FG, Mantelgewebe mit 0,12 µg/g FG und Kiemengewebe mit 0,05 µg/g FG (Abb. 31). In Miesmuscheln konnte im Hepatopankreas 0,41 µg/g FG, im Kiemengewebe 0,15 µg/g FG und im Gonadengewebe 0,12 µg/g FG detektiert werden (Abb. 32). Im Mantelgewebe konnte keine DO detektiert werden.

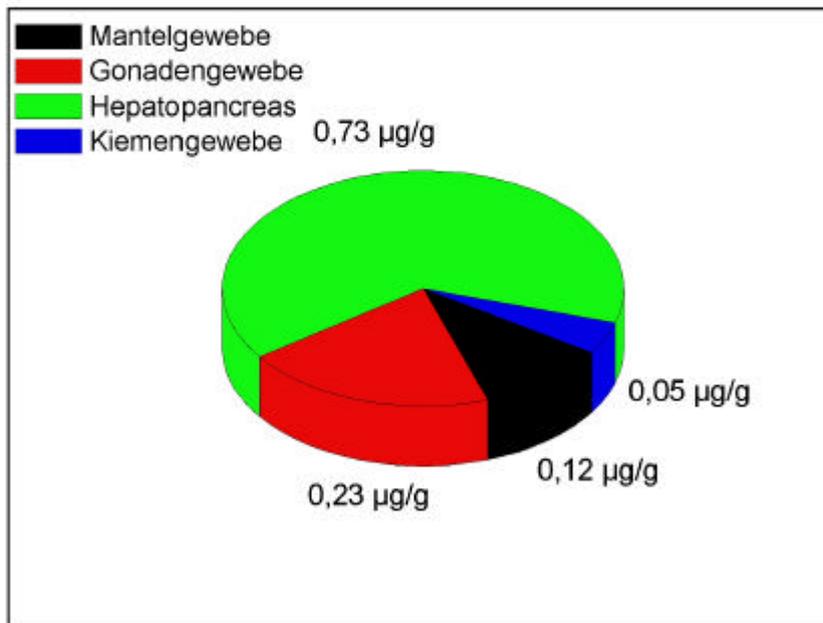


Abbildung 31: Verteilung von DO in den unterschiedlichen Gewebearten exponierter Muscheln (*Anadonta* sp.)

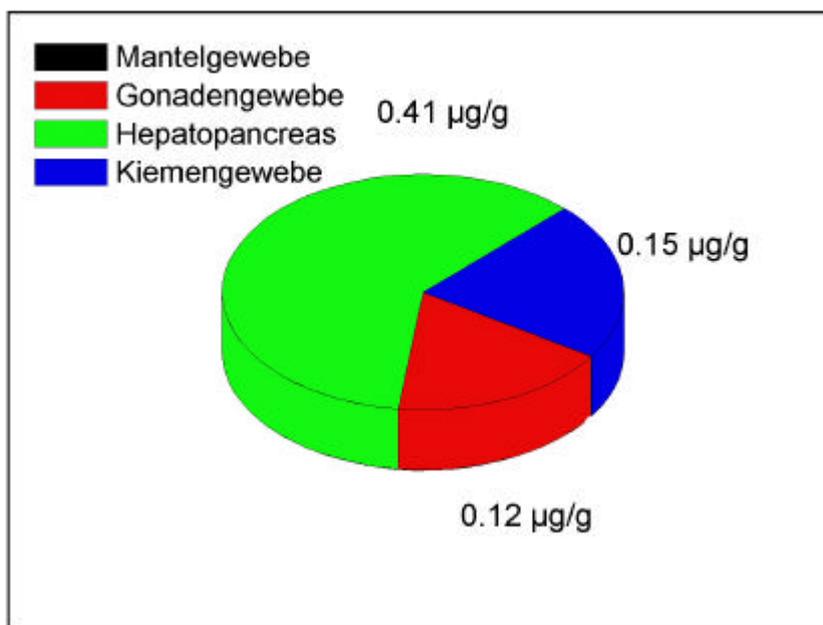


Abbildung 32: Verteilung von DO in den unterschiedlichen Gewebearten exponierter Muscheln (*Mytilus edulis*)

3.6.4 Realprobenmessung

Drei Realproben von Miesmuscheln aus der Nordsee wurden mittels des entwickelten ELISA bestimmt. Die drei Proben wurden im Zuge eines in Jena durchgeführten Ringtests mittels HPLC gemessen. Prof. Lukas stellte freundlicherweise Aliquote homogener Proben für die EIA-Messung zur Verfügung. Die Extraktion erfolgte wie oben beschrieben. Die Proben wurden unterschiedlich verdünnt (1:4-1:50) und im EIA gemessen. Dieselben Proben wurden mittels HPLC in Jena gegen gemessen. Die mit den beiden Methoden ermittelten Werte zeigt Tabelle 7. Dabei konnte eine zufriedenstellende Übereinstimmung der ermittelten Werte festgestellt werden. Alle Messwerte liegen unter der von der WHO angegebenen Grenze von 20 µg/g.

Tabelle 7: Vergleich der mit dem EIA und HPLC ermittelten Werte

Probe	ELISA	HPLC
ASP-1	7,66 ± 0,16 µg/g	13,9 ± 0,7 µg/g
ASP-2	3,83 ± 0,35 µg/g	5,5 ± 0,7 µg/g
ASP-3	Nicht nachweisbar	Nicht nachweisbar

3.7 BIAcore-Messungen

3.7.1 Bestimmung der Affinitätskonstanten mit dem BIAcore 3000[®]

Ergänzend zu den ELISA-Messungen wurde das BIAcore 3000[®] als optisches Sensorsystem zur Charakterisierung des mAk 4D1D eingesetzt. Die Versuche wurden am Cranfield Biotechnology Centre in Silsoe, England, durchgeführt. Es wurden CM5-Chips verwendet, die eine carboxymethylierte Dextranmatrix besaßen. Über EDC/NHS voraktivierte Carboxylfunktionen der Dextrane reagierten mit zugänglichen Aminogruppen des Proteins unter Ausbildung einer Amidbindung. Es wurden 3 Fließzellen mit dem Coatkonjugat OVA-DO (150 µg/ml) und eine Fließzelle zur Kontrolle mit OVA (150 µg/ml) beladen. Das Sensorsystem ermöglichte die Echtzeitanalyse der Bindung des Proteins auf allen 4 Fließzellen. Abbildung 33 zeigt ein Sensogramm der Immobilisierung von OVA-DO auf den Sensorchip.

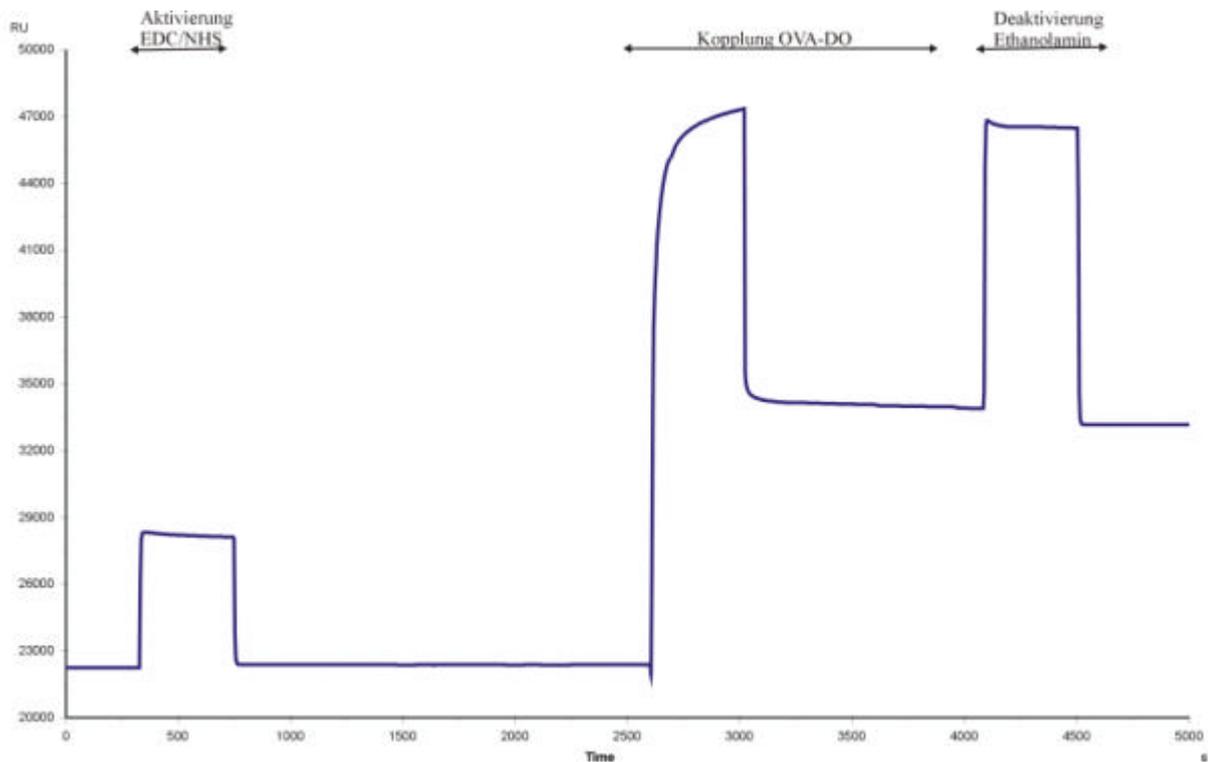


Abbildung 33: Sensogramm der Immobilisierung von OVA-DO auf dem Sensorchip

Anschließend wurde der mAk 4D1D in einer Verdünnung von 1/150 in alle vier Kanäle injiziert. Die Bindung zeichnete sich durch eine hohe Spezifität bei geringen Hintergrundsignal aus. In Abbildung 34 ist ein Sensogramm dargestellt, welches für die Berechnung der Affinitätsdaten verwendet wurde. Um von unspezifischen Bindungen hervorgerufene Effekte zu eliminieren, wurde das Sensogramm der mit OVA beladenen Fließzelle jeweils von den mit OVA-DO beladenen Sensogrammen abgezogen. Abbildung 35 und 36 zeigen beispielhaft Kurven, die zur Berechnung der Assoziations- und Dissoziationsrate verwendet wurden. Die Konstante der Assoziationsrate (k_a) wurde mit $3 \cdot 10^5 \text{ [M}^{-1}\text{s}^{-1}]$, die Dissoziationsrate (k_d) mit $5 \cdot 10^{-5} \text{ [s}^{-1}]$ errechnet. Insgesamt ergibt sich für die Dissoziationskonstante ($K_d = k_d/k_a$) ein Wert von $1,6 \cdot 10^{-10} \text{ [M]}$.

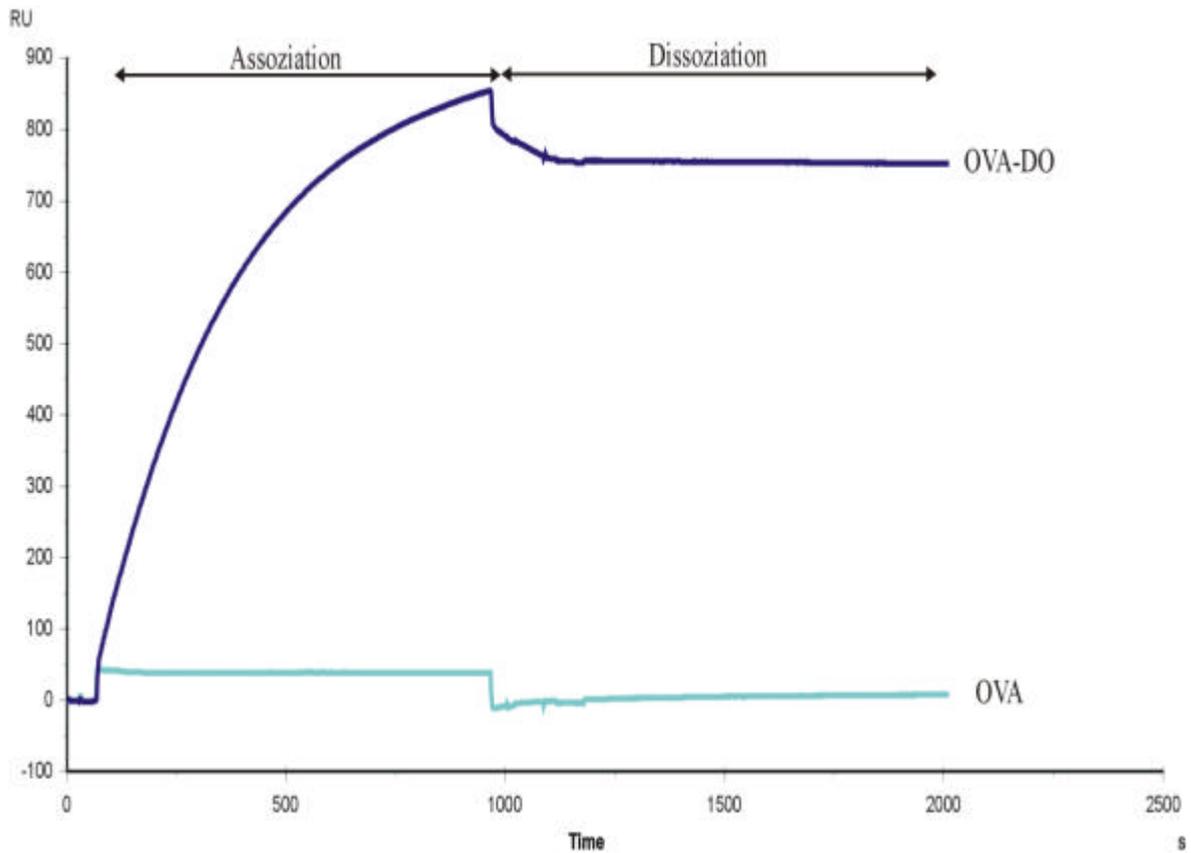


Abbildung 34: Bindung des mAb 4D1D an OVA-DO oder OVA

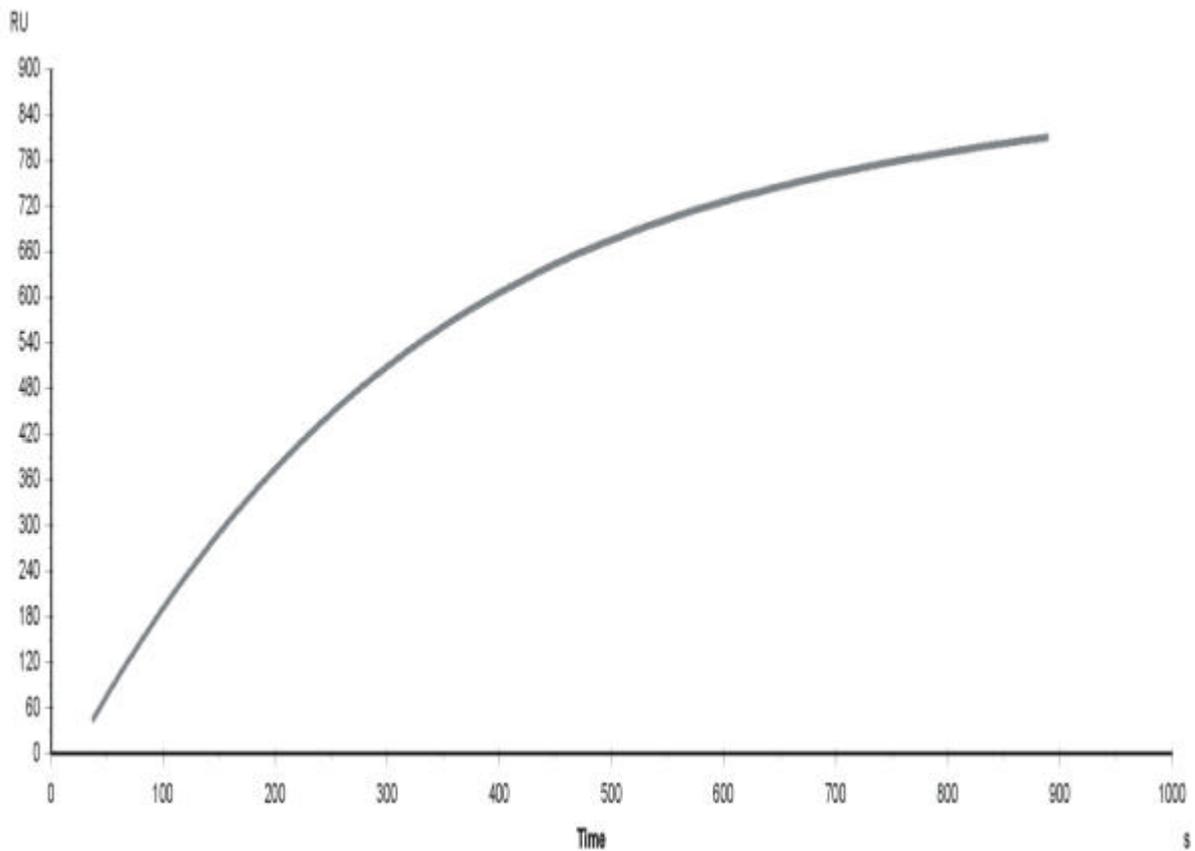


Abbildung 35: Fitting der Assoziationsrate

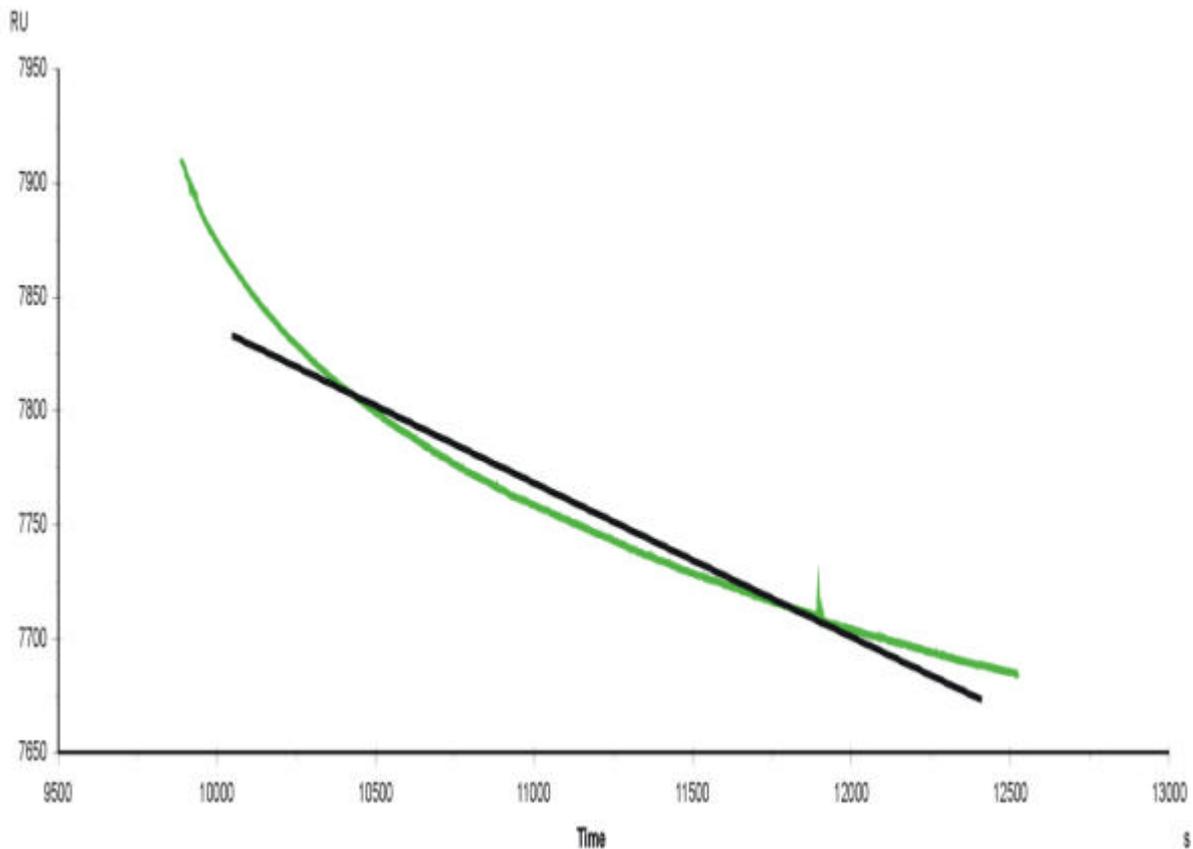


Abbildung 36: Fitting der Dissoziationsrate

3.7.2 Kompetitiver BIAcore-Immunoassay

Der Versuchsaufbau mit immobilisierten OVA-DO erlaubt neben der Ermittlung von Affinitätsdaten auch den Aufbau eines kompetitiven Assays. Hierfür wurden steigende Konzentrationen an DO (0-5000 $\mu\text{g/l}$) mit dem mAk 4D1D gemischt und in die Fließzellen injiziert. Die daraus resultierenden Bindungskurven wurden mit der BIAevaluation-Software ausgewertet.

Abbildung 37 zeigt, dass mit steigender DO-Konzentration die Antikörperbindung an OVA-DO abnimmt. Bei Auftragen der Injektionsendpunkte gegen die DO-Konzentration zeigt sich eine sigmoidale Kurve (Abb. 38). Eine Nachweisgrenze von 1,2 $\mu\text{g/l}$ mit einem Testmittelpunkt von 9 $\mu\text{g/l}$ konnte mit diesem Biosensor erreicht werden.

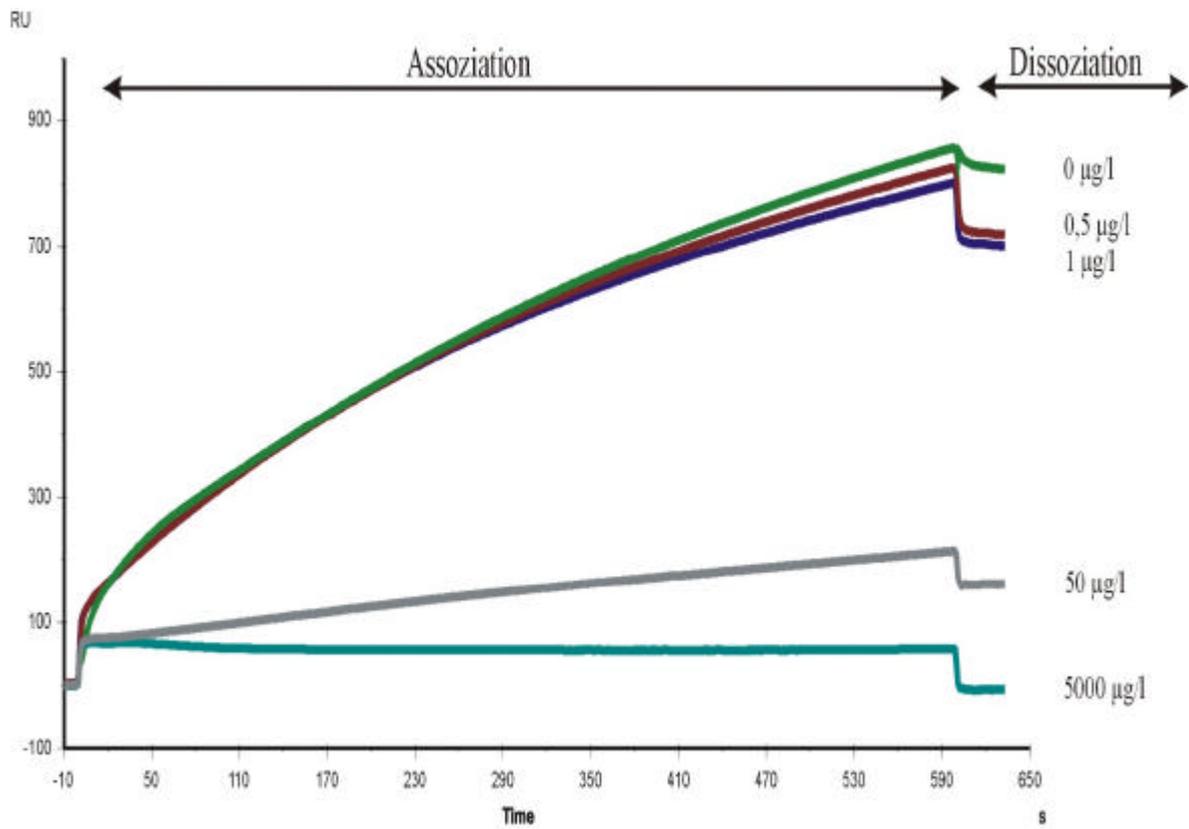


Abbildung 37: Kompetitiver Immunoassay im Biosensor-Format

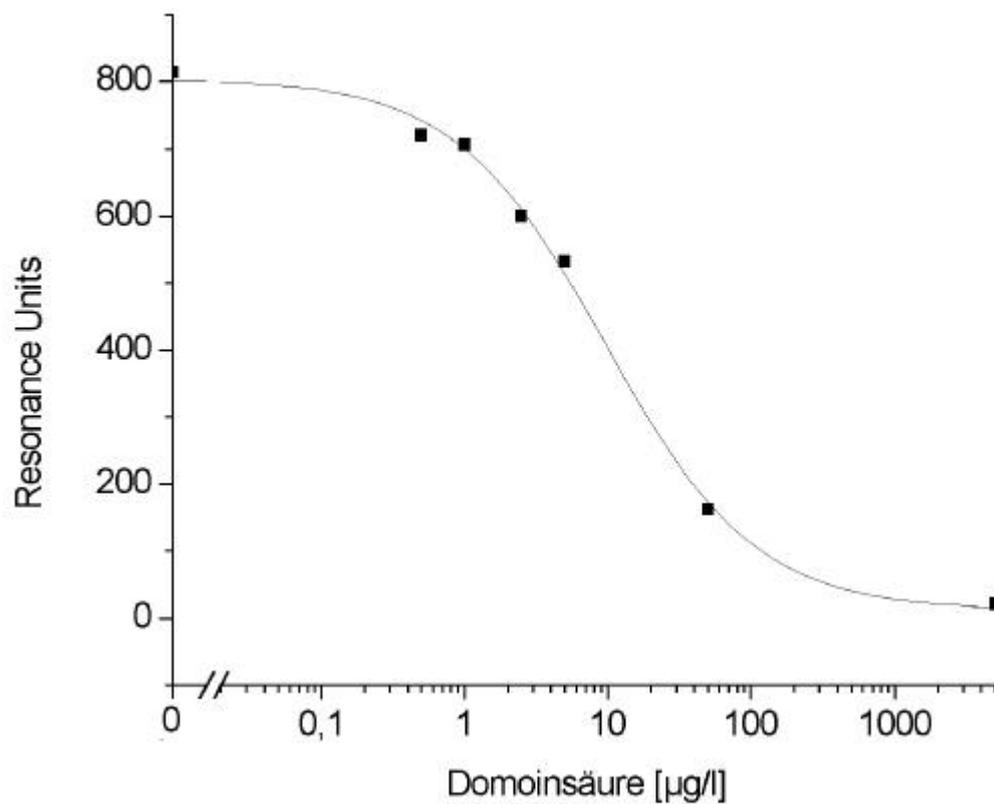


Abbildung 38: Kalibrationskurve des kompetitiven Immunoassay im Biosensorformat

3.7.3 Kreuzreaktivitätsstudien mit dem BIAcore 3000[®] und Chipregeneration

Aufgrund der erhöhten Sensitivität der BIAcore-Messungen im Vergleich zum ELISA, wurden mit diesem auch Kreuzreaktivitätsstudien durchgeführt. Hierfür wurden Standards von Domoinsäure, Glutaminsäure, Kaininsäure und Asparaginsäure mit mAk 4D1D gemischt und in die Kanäle injiziert. Dabei wurde festgestellt, dass sich 4D1D nicht von den genannten Komponenten verdrängen ließ. Abbildung 39 zeigt schematisch die „Resonance Units“ der Null- und Überschusswerte der eingesetzten Komponenten. Der Sensorchip konnte durch Injektion von 100 µl einer 0,2 % SDS 10 mM HCl-Lösung vollständig regeneriert werden (Abb. 40), so dass bis zu 20 Messzyklen mit einem Chip möglich waren.

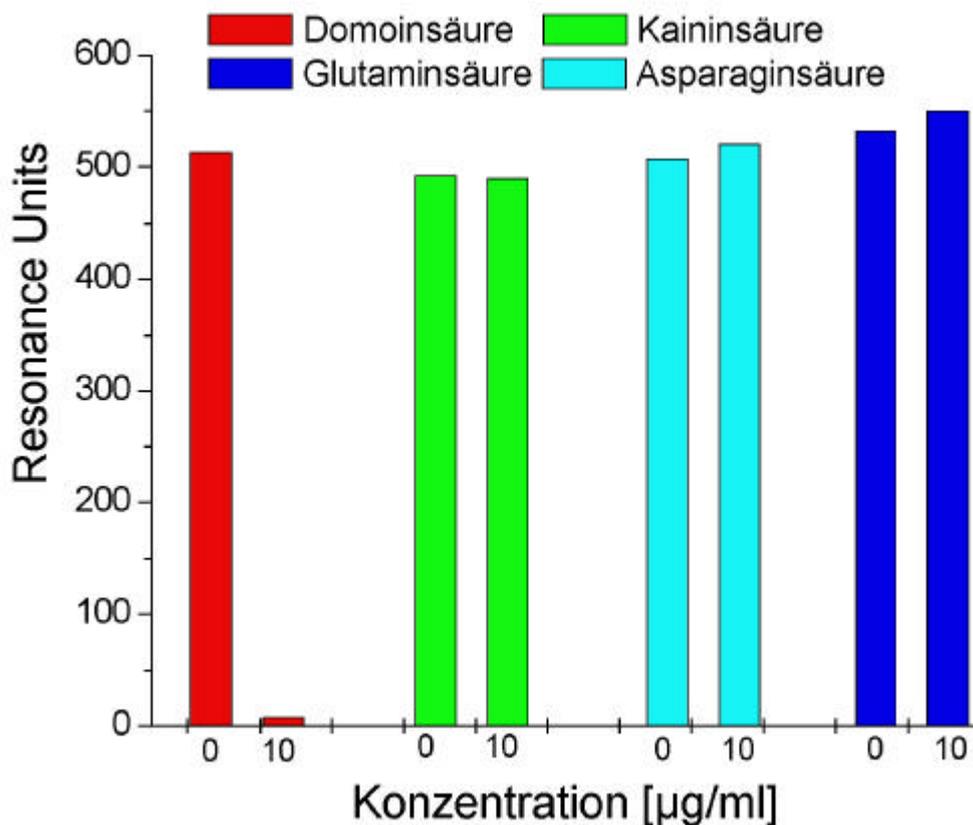


Abbildung 39: Kreuzreaktivitäten des mAk 4D1D ermittelt mit dem BIAcore

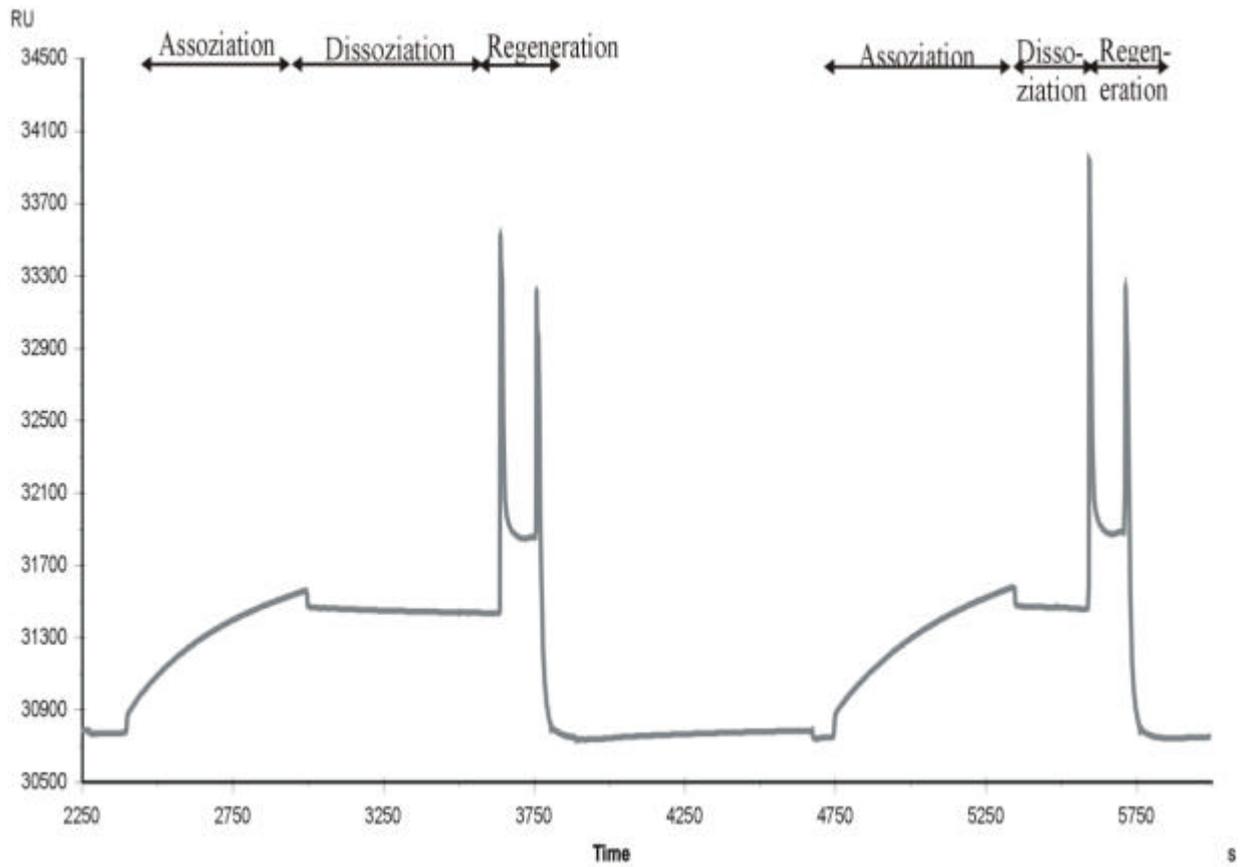


Abbildung 40: Vollständige Regeneration des Sensorchips mit SDS 0,2 % HCl 10 mM

4 Diskussion

Immunochemische Nachweismethoden etablieren sich zunehmend in der Umweltanalytik. Sie zeichnen sich durch hohe Sensitivität, Selektivität und geringen Kosten- und Zeitaufwand aus und ermöglichen somit eine Untersuchung einer großen Anzahl von Proben innerhalb eines relativ kurzen Zeitraumes. Diesen Verfahren ist der Bedarf an Antikörpern gemeinsam. Immunochemische Nachweismethoden finden in der Umweltanalytik u.a. zum Nachweis von Pflanzenschutzmitteln, Mykotoxinen, Vitellogenin und Aflatoxinen ihre Anwendung (van Emon und Lopez-Avilla, 1992; Sherry, 1992; Hock, 1993; Carmichael und An, 1999; Marx *et al.*, 2000). Zur Detektion von Domoinsäure, dem Auslöser von Amnesic Shellfish Poisoning (ASP), kommen vor allem der Bioassay (Iverson *et al.*, 1989) und analytische Methoden wie Massenspektrometrie oder HPLC zum Gebrauch (Quilliam *et al.*, 1989a; Quilliam *et al.*, 1989b; Thibault *et al.*, 1989; Pleasance *et al.*, 1990; Pocklington *et al.*, 1990; Lawrence and Ménard, 1991). Konventionelle Methoden sind aber recht zeitaufwendig und kostenintensiv. In neuerer Zeit wurden deshalb vermehrt ELISA, basierend auf polyklonale Antikörper zum Nachweis von DO herangezogen (Quilliam *et al.*, 1998; Smith und Kitts., 1995; Garthwaite *et al.*, 1998; Branaa *et al.*, 1999). Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen DO wurde bei Branaa *et al.* (2000) und bei Kania und Hock (2002) erwähnt.

In der vorliegenden Arbeit wurden polyklonale und monoklonale Antikörper gegen Domoinsäure entwickelt. Die monoklonalen Antikörper wurden für einen quantitativen Nachweis von DO in Muschelgewebe verwendet. Weiterhin wurden in Kooperation mit einem EU-Projektpartner Biacore-Studien mit dem mAk 4D1D durchgeführt. Im Rahmen eines EU-Projektes wurden die pAk und die mAk für Immunsensoren eingesetzt.

4.1 Konjugatsynthese und -charakterisierung

Für die Gewinnung qualitativ hochwertiger Antikörper ist die Wahl des Immunogens, das eingesetzte Adjuvans, die zu immunisierende Tierart und das Dosierungsschema von entscheidender Bedeutung (Hurn und Chantler, 1980). Da Moleküle unter 1000 Da in der Regel keine Immunantwort auslösen, musste DO an ein immunogenes Trägermolekül gekoppelt werden. Goodman *et al.* (1982) berichten allerdings von Molekülen von weniger als 1000 Da, die immunogen wirkten und umgekehrt von Makromolekülen, die nicht immunogen wirkten. Als Carrier wurde Hämocyanin, ein Protein einer Napfschnecke (*Megathura crenulata*), ein-

gesetzt, welches stark immunogen wirkt (Rittenberg und Amkraut, 1966). Dieses lässt sich zum einen auf das hohe Molekulargewicht von ca. $8 \cdot 10^6$ Da, zum anderen auf die geringe Ähnlichkeit mit den körpereigenen Proteinen von Vertebraten zurückführen (Goding, 1996). Da Antikörper in der Regel gegen den Teil des Peptids gerichtet sind, der am weitesten vom Carrier entfernt ist, hat es sich für die Herstellung von Ak gegen Haptene bewährt, Abstandshalter (=Spacer) einzubauen (Schaaper *et al.*, 1989). Befindet sich das Hapten zu nah am Trägerprotein, kann es von dessen Strukturen umwölbt sein und es entstehen Antikörper, die oftmals gegen den Hapten-Carrier-Komplex gerichtet sind (Peters und Baumgarten, 1990). Eine Spacerlänge von mindestens vier C-Atomen ist anzustreben (Campell, 1991). Die Anfügung eines Spacers verändert jedoch die chemische und räumliche Struktur des Haptens. Da Domoinsäure bereits einen „natürlichen“ C4- und C5-Spacer enthält, konnte auf einen Einbau eines Spacers verzichtet werden. Somit wurde DO unverändert analog Smith und Kitts (1994) direkt an das Carrierprotein gekoppelt.

Für die Herstellung von Immunkonjugaten wurde KLH als Carrier eingesetzt. Die für das Screening notwendigen Coatkonjugate wurden mit OVA hergestellt. Die Kopplung erfolgte mit der Carbodiimid-Methode, welche oft zur Immunogensynthese verwendet wird (Erlanger, 1973; Bauminger und Wilchek, 1980). Hierfür werden die Carboxylgruppen von DO unter Bildung eines aktiven Esters mit EDC aktiviert. Da alle drei Carboxylgruppen aufgrund der räumlichen Struktur gleichermaßen aktiviert werden, koppelt DO in verschiedenen Arten an das Trägerprotein an (Schmiedeberg, 2000). Dabei geht der aktivierte Ester mit den Lysinresten von KLH bzw. OVA unter Wasserabspaltung eine Peptidbindung ein.

Die exakte Bestimmung der Haptendichten erfolgte mit MALDI-TOF-MS. Wengatz *et al.* (1992) ermittelten mit diesem Verfahren zuverlässig die Haptendichten von Atrazin-BSA-Konjugaten. Aufgrund der hohen Molekularmasse von KLH war es nicht möglich, die Immunkonjugate mit MALDI-TOF-MS zu messen. Es wurde eine hohe Haptendichte für das Immunkonjugat angestrebt. Dennoch gibt es unterschiedliche Meinungen über die optimale Haptendichte. Während Rittenberg und Amkraut (1966) mit Epitopdichten zwischen 800-1000 sehr gute Erfolge erzielten, konnte Marx (1997) schon mit einer Haptendichte von 443 eine gute Immunantwort erzielen. Selbst Haptendichten von 1:1 führten bei Weiler (1989) zu guten Immunantworten. Zu hohe Haptendichten (über 5000) können dagegen auch die immunogene Wirksamkeit der Konjugate verringern, da diese zu einer Veränderung der Tertiärstruktur führen, die den Abbau des Proteins für die Antigenpräsentation erschweren. Weiterhin könnten immunogene Determinanten des Proteins durch die Ankopplung zu vieler Haptene blockiert sein (Rittenberg und Amkraut, 1966). Aufgrund der großen Unterschiede in der

Immunantwort bei identischer Immunisierung zwischen den einzelnen Tieren, lassen sich nur schlecht quantitative Beziehungen zwischen der Haptendichte und dem Antikörpertiter, Affinität und Spezifität erkennen. Es ist anzunehmen, dass sich bezüglich der Haptendichte kein Optimum festsetzen lässt. Bei der Herstellung von OVA-Konjugaten, die für das Screening notwendig waren, konnte der Kopplungserfolg mit MALDI-TOF-MS ermittelt werden. Bei der OVA-Kopplung stehen 20 freie Lysinreste zur Verfügung (Hermanson, 1996). Die im MALDI-TOF ermittelte Haptendichte betrug 18 mol DO pro mol OVA. Die Haptendichte wurde zur Steigerung der Sensitivität später auf 3:1 reduziert. Der Kopplungserfolg wurde auch hier mit MALDI-TOF-MS bestätigt.

4.2 Immunisierung von Kaninchen und Mäusen

Adjuvanzien dienen zur Verstärkung der Immunantwort. Viele Adjuvanzien sind oberflächenaktive Agenzien, die sowohl hydrophile als auch lipophile Anteile wie Saponine, Liposomen, Glycolipide etc. enthalten. Die Wirkung von Adjuvanzien kann viele Ursachen haben wie die Aktivierung der Makrophagen, die Aktivierung der CD4⁺-T-Zellen (Janeway und Travers, 1995), das Anlocken der Lymphozyten zum Antigen, die verbesserte Antigenpräsentation und eine Depotbildung (Peters und Baumgarten, 1990). Für die Immunisierungen wurde das 1937 von Freund *et al.* (1937) entwickelte Adjuvans eingesetzt. Die Immunisierung erfolgte nach einem bestimmten Schema mit dem Immunkonjugat, welches in Freund's Adjuvans emulgiert war. Bei Kaninchen wurde ausschließlich mit komplettem Freund's Adjuvans immunisiert. Bei Mäusen wurden Erstimmunisierungen mit komplettem Freund's Adjuvans, alle folgenden mit inkomplettem Freund's Adjuvans durchgeführt. Diese Vorgehensweise hat sich als besonders effizient erwiesen (Hu *et al.*, 1989). Inkomplettes Freund's Adjuvans besteht aus Mineralöl und Detergenzien. Sind diesem noch getrocknete, hitzeinaktivierte *Mycobacterium tuberculosis*-Organismen beigelegt, spricht man von komplettem Freund's Adjuvans. Die Bakterien bewirken in erster Linie eine Aktivierung von Makrophagen und T-Helferzellen. Zur Immunisierung wurde das Antigen mit dem Adjuvans zu einer „Wasser-in-Öl“-Emulsion vermischt. Bennett *et al.* (1992) erzielten mit Freund's Adjuvans bei Mäusen im Vergleich zu anderen Adjuvanzien wie z. B. Aluminiumhydroxid die höchste und längste antigenspezifische Immunantwort. Kellner *et al.* (1992) und Giersch (1993b) bestätigen ebenso die bessere Wirkung des Freund's Adjuvans. Dennoch induziert inkomplettes und komplettes Freund's Adjuvans örtliche Reaktionen, Entzündungen und Fieber (Claasen *et al.*, 1992, Broderson, 1989). Aron *et al.* (1983) stellten Granulombildung bei der Verwendung von

komplettem Freund's Adjuvans fest. Die gesundheitliche Beeinträchtigung ist allerdings bei einmaliger Applikation von komplettem Freund's Adjuvans und anschließenden Folgeimmunisierungen mit inkomplettem Freund's Adjuvans relativ gering, was durch Toth *et al.* (1989) und eigene Beobachtungen bestätigt wird. Die Tendenz geht aber zu nebenwirkungsfreien Adjuvanzen. Die Forschung tendiert zu isolierten oder synthetischen Bakterienkomponenten wie Derivate von Muramyl-dipeptid in einem verstoffwechselbaren Öl, welche als Adjuvanzen eingesetzt werden.

Neben den Immunkonjugaten und den eingesetzten Adjuvanzen hat die Dauer der Immunisierung Einfluss auf die Affinität der gebildeten Antikörper. Nach Rathjen *et al.* (1986) können 5 Phasen der Immunantwort unterschieden werden, nämlich die Phase vor der Primärantwort, der Gipfel der Primärantwort, der Abfall nach der Primärantwort, der Gipfel der Sekundärantwort und der Abfall der Sekundärantwort. Immunisierungen sollen immer beim Abfall des Antikörpertiters stattfinden. In Phasen hoher Antikörpertiter kann das Antigen nämlich bereits von Serum-Ak neutralisiert werden und somit kann die Anzahl spezifischer B-Lymphozyten wieder sinken (Peters und Baumgarten, 1990). Deshalb ist es während einer Immunisierung notwendig, den Verlauf und die Immunantwort der immunisierten Tiere zu verfolgen. Am Anfang der Immunisierung werden vor allem B-Lymphozyten angeregt, die IgM, den typischen Antikörper der Primärantwort, sezernieren. Deshalb sollte eine Immunisierungsphase mit vierwöchigen Immunisierungsabständen mindestens über 3 Monate erfolgen, um Antikörper der Sekundärantwort, nämlich IgG zu erhalten. Diese IgG haben eine wesentlich höhere Affinität zum Antigen als die IgM. Anfangs ist die Affinität dieser IgG oft nicht ausreichend, um mit diesen einen hochsensitiven ELISA zu entwickeln. Erst durch wiederholten Kontakt mit dem Antigen kommt es bei den zur Proliferation angeregten B-Lymphozyten zu somatischen Mutationen der Gensegmente, die für die variablen Regionen kodieren. Hierbei entstehen Antikörpervarianten mit neuer Spezifität und Affinität (Allen *et al.*, 1987; Weinand, 1990). Bei längeren Immunisierungen werden vor allem diejenigen Zellen durch erneuten Kontakt mit dem Antigen zur Teilung angeregt, welche eine hohe Affinität zum Antigen besitzen. Dieses Zusammenwirken von somatischen Mutationen und Selektion bezeichnet man als Affinitätsreifung (Manser, 1990; Goding, 1996).

Die Immunisierungen von Kaninchen erfolgten subkutan, alle Boosterimmunisierungen intramuskulär. Auf intravenöse Immunisierungen wurde verzichtet, um die Tiere keinen zu großen Belastungen auszusetzen. Intravenöse Impfungen sind zum einen schwerer durchführbar, zum anderen kann es - gerade bei Benutzung von Freund's Adjuvans - zu anaphylaktischen Schockreaktionen kommen (Harlow und Lane, 1988). Die Blutentnahme erfolgte über die

Ohrvene. Bereits das 1. gewonnene Antiserum zeigte eine spezifische Reaktion gegen Do-moinsäure.

Mäusen wurde das Antigen intraperitoneal appliziert. Immunisierungen in die Pfoten sind ebenfalls möglich, führen aber oft zu quälenden Entzündungen und Schwellungen (Peters und Baumgarten, 1990). Spitz *et al.* (1984) erreichten mit einer intrasplenischen Gabe von Antigen bessere Ergebnisse als mit herkömmlichen Methoden. Raymond und Suh (1986) injizierten das Antigen in die abdominalen Lymphknoten. Bei beiden letzteren Methoden konnten die benötigte Antigenmengen erheblich reduziert werden. Aufgrund einer genügenden Menge an Antigen, der leichten Durchführbarkeit und vor allem der größten Tierverträglichkeit wurde allerdings nur intraperitoneal immunisiert. Die Blutentnahme erfolgte bei Mäusen über die Schwanzvene. Auf eine Entnahme von Blut durch Augenpunktion wurde verzichtet, um den Tieren keine unnötigen Belastungen und Verletzungen zuzufügen. Es wurde aus der Schwanzvene ausreichend Blut für Titer-tests und weitere ELISA gewonnen. Alle Mausantisera zeigten nach einer ungefähren Immunsierungsdauer von drei Monaten eine spezifische Reaktion.

4.3 Polyklonale Antikörper

Ein Kaninchen wurde wiederholt mit KLH-DO immunisiert und Blut in entsprechenden Zeiträumen abgenommen. Für den Einsatz von polyklonalen Antikörpern im ELISA ist kein Reinigungsschritt erforderlich, und die Seren wurden somit direkt eingesetzt. Erwägt man jedoch die Kopplung von Enzymen oder Fluorochromen an die Antikörper, müssen die Antikörper z.B. mit Ammoniumsulfatfällung angereichert werden (Dankwardt, 1994). Für den Einsatz im ELISA wurde das Serum der 5. Blutentnahme ausgewählt. Mit diesem wurden in einem kompetitiven Enzymimmunoassay die Sensitivität und Spezifität des Serums gegenüber DO bestimmt.

4.4 Monoklonale Antikörper

4.4.1 Zellfusion und Zellkultur

Vier Tage vor der Fusion erhielten die ausgewählten Mäuse Boosterimmunisierungen. Die B-Lymphozyten der Maus werden dadurch zur erneuten Teilung angeregt. Stähli *et al.* (1980) und French *et al.* (1986) erzielten mit diesem Schema eine höhere Anzahl aktivierter B-

Blasten und somit spezifischer Hybridomklone. Als Fusionspartner wurde die Myelomlinie PAI-B₃ Ag8I verwendet, welche ein Abkömmling der Myelomzelllinie P3X63Ag8.653 ist. Diese zeichnet sich durch hohe Fusionsraten und gutes Wachstum aus (Giersch, 1993b). Unter optimalen Bedingungen enthält eine Milz ca. $0,5-1 \cdot 10^8$ B-Lymphozyten (Peters und Baumgarten, 1990). Auf eine genaue Zellzahlbestimmung der B-Lymphozyten wurde allerdings verzichtet, da alle Zellen für die Fusion zur Verfügung stehen sollten. Es wurde bei den Berechnungen von 10^8 Zellen ausgegangen. Die Anzahl der Myelomzellen wurde mit der Trypanblaumethode bestimmt. Zur Fusion wurden $5 \cdot 10^7$ Myelomzellen verwendet. Die früher zur Zellfusion einsetzten Viren werden heute u.a. durch Polyethylenglycol (PEG) ersetzt. PEG gibt es in unterschiedlichen Molekulargewichten, wobei PEG zwischen 1500 und 6000 als besonders erfolgreich gilt (Fazekas de St. Groth und Scheidegger, 1980; Gani *et al.*, 1998). Zur Fusion wurde PEG 1500 genommen. Es wurden 50 % der Fusion auf Mikrotiterplatten ausgesät. Die restliche Fusion wurde kryokonserviert. Auf die Bestimmung der Fusionsrate bzw. der Anzahl wachsender Klone wurde verzichtet. Es war zum einen schwierig, vor der HAZ-Selektion Myelom- von Hybridomzellen zu unterscheiden, zum anderen war die genaue Anzahl von B-Lymphozyten nicht bekannt. Dies kann leicht zu einer Überbestimmung der Fusionsrate führen. Durchschnittlich werden Fusionsfrequenzen von $1-3 \cdot 10^{-4}$ erreicht. Giersch und Hock (1990) erreichten Fusionsraten von $6 \cdot 10^{-5}$. Wichtiger als die reine Fusionsfrequenz erscheint die Anzahl der Hybridomzellen, die den gesuchten Antikörper produzieren. Bei der Fusion M22 zeigten acht Kavitäten von 576 Zellkulturüberständen eine positive Bindung an das Coatkonjugat (1,3%). Deutliche Verdrängung von DO zeigten davon vier Kavitäten (0,7%), von denen drei stabile Klone (0,5%) isoliert werden konnten.

Usagawa *et al.* (1989), die monoklonale Antikörper gegen Okadasäure entwickelten, etablierten drei positive Klone von 888 Zellkulturüberständen (0,34%) aus einer Fusion. Karu *et al.* (1991) erhielten 2 % positive Klone. Pullen und Hock (1995) konnten aus zwei Fusionen drei Klone isolieren. Die durchschnittliche Rate an positiven Klonen, die aus einer Zellfusion gewonnen werden kann, liegt im Bereich von 0,16–0,5 % (Peters und Baumgarten, 1990). Somit liegt die Ausbeute an positiven Klonen der Fusion M22 im durchschnittlichen Bereich.

Anschließend wurden die in den positiven Kavitäten befindlichen Hybridomzellen mit der Einzelzellablage und mit der „Limiting Dilution Method“ kloniert. Positive Hybridomlinien, die von einer einzigen abgelegten Zelle ausgingen, wurden weiter kultiviert und rekloniert. Nach Peters und Baumgarten (1990) wird eine Zelllinie als stabil und monoklonal angesehen, wenn sie ein- bis zweimal erfolgreich kloniert worden ist. Von insgesamt drei isolierten Kb-

nen zeigte der mAk 4D1D das beste Wachstum, verbunden mit der höchsten Sensitivität. Er wurde deshalb für die Entwicklung eines EIA zur Detektion von Domoinsäure verwendet.

4.4.2 Massenproduktion und Aufreinigung

Die Hybridomlinie 4D1D wurde anfangs im NM kultiviert. Für erste Charakterisierungen von Ak können serumhaltige Zellkulturüberstände eingesetzt werden. Für Standardisierungsprozesse und für Anwendungen im Biosensorbereich bedarf es allerdings größerer Mengen an aufgereinigten Ak. Da die Abtrennung der im NM enthaltenen, kontaminierenden, bovinen IgG aufgrund der Subklasse des mAk 4D1D (IgG₁) nicht möglich war, wurde der Klon 4D1D in serumfreiem Medium kultiviert. Dabei wurde 4D1D langsam an das serumfreie Medium adaptiert.

Zur Massenproduktion wurden die Biofermenter CL 350 und MiniPerm verwendet. Beide Systeme sind durch eine semipermeable Membran mit einer Ausschlussgröße von 45 kDa in ein Produktions- und Versorgungsmodul unterteilt. Bei dem CL 350 handelt es sich um ein stationäres System, bei MiniPerm um eine Rollkultur. Während einer Kulturzeit von 35 Tagen wurden im CL 350 24 mg mAk 4D1D geerntet. Im MiniPerm-Fermenter konnten dagegen innerhalb einer 20-tägigen Kulturzeit 60 mg mAk 4D1D geerntet werden. Nagel *et al.* (1999) kultivierten eine Zelllinie im CL 350. Diese konnten im CL 350 während einer 15-tägigen Kulturzeit 10,4 mg mAk ernten. Trebak *et al.* (1999) kultivierten 3 verschiedene Hybridomlinien in diesem Fermenter. Eine Linie konnte sogar über 2 Monate lang kultiviert werden. Die durchschnittliche Kultivierungsdauer lag aber bei 20 Tagen. Sie erreichten durchschnittliche Zellzahlen von $10^7 - 10^8$ Zellen/ml und mAk-Konzentrationen von 0,7 – 2,5 mg/ml. Während einer 20-tägigen Kultur konnte ca. 60 mg mAk gewonnen werden. Jackson *et al.* (1999) ernteten maximal 1,5 mg/ml mAk aus dem Fermenter CL 350. Im MiniPerm-Reaktor konnten Falkenberg *et al.* (1995) mit unterschiedlichen Hybridomzellen Zelldichten von $5 * 10^6$ bis zu $35 * 10^6$ Zellen/ml erzielen. Innerhalb von 1-4 Wochen konnten 9-159 mg IgG geerntet werden. Giersch und Schäpermeier (1998) erzielten mit drei im MiniPermsystem kultivierten Hybridomzelllinien maximale Antikörperkonzentrationen zwischen 1 und 2 mg/ml Erntevolumen und eine maximale Zelldichte von $8-12 * 10^6$ Zellen/ml. Während einer 20-tägigen Kulturzeit wurden bis zu 120 mg mAk gewonnen. Marx *et al.* (2000) ernteten mit dem MiniPermsystem dagegen maximal 0,2 mg/ml eines mAk.

Die aufgeführten Beispiele machen deutlich, dass große Schwankungen innerhalb eines Systems in der Zelldichte und der mAk-Konzentration auftreten. Einzelne Hybridomlinien rea-

gieren in den Systemen unterschiedlich. Nagel *et al.* (1999) kultivierte 3 unterschiedliche Hybridomlinien im „Tecomouse bioreactor system“. Er stellte Unterschiede in der IgG-Ernte von bis zu 340 % fest. Es scheint günstig, eine Hybridomlinie in unterschiedlichen Fermentersystemen zu kultivieren. Für den Klon 4D1D erwies sich das MiniPerm-System aufgrund der höheren IgG-Ausbeute verbunden mit weniger Medieneinsatz als die bessere Alternative. Neben den *in vitro*-Systemen wird in vielen Ländern noch die Ascitesvermehrung durchgeführt. Dabei werden einer Maus Hybridomzellen in die Bauchhöhle appliziert. Die Vorteile dieses Systems liegen in der optimalen Nährstoffversorgung der Zellen, dem garantierten Vermeiden von mikrobiellen Infektionen, dem Entfernen von Zelltrümmern durch Makrophagen und der kostengünstigen und einfachen Handhabung (Nagel *et al.*, 1999). Neben den schwerwiegenden Gründen des Tierschutzes spricht aber v.a. die Kontamination des Produktes mit Maus IgG gegen dieses System. Erst seit den frühen 90er Jahren wird die Ascitesvermehrung durch Aufkommen von einfach zu handhabenden Bioreaktoren (Wiesmann, 1994; Falkenberg *et al.*, 1995) langsam abgelöst.

Eine Aufreinigung von NM war aufgrund der Subklasse des mAk nicht möglich. Rinder-IgG eluiert wie IgG₁ bei einem pH-Wert von 8 (Peters und Baumgarten, 1990). Die Aufreinigung der serumfreien ZKÜ erfolgte mit einer Affinitätschromatographie. Hierbei wird die Affinität von Immunglobulinen zu spezifischen Liganden ausgenutzt. Als Ligand wurde das oft in der Literatur beschriebene Protein A eingesetzt (Miller und Stone, 1978; Trebak *et al.*, 1999). Der Antikörper 4D1D gehört zur Subklasse IgG₁. Obwohl Protein G bessere Bindungseigenschaften für Antikörper der Klasse IgG₁ besitzt (Peters und Baumgarten, 1990), konnte der Zellkulturüberstand mit gutem Erfolg mit Protein A aufgereinigt werden. Man löste dieses Problem durch Einsatz von Puffersystemen mit höherem pH (Juarez-Salinas und Ott, 1985). Die ZKÜ wurden nach der Ernte bei -20 °C eingefroren, um mikrobielle Kontaminationen und Proteaseaktivität zu vermeiden. Durch das Einfrieren wurde kein Aktivitätsverlust beobachtet. War genügend ZKÜ vorhanden, wurde dieser aufgetaut und aufgereinigt. Der Erfolg der Aufreinigung wurde mit einer SDS-PAGE bestimmt. Dabei zeigte sich eine Bande bei etwa 155 kDa. Das Molekulargewicht von Immunglobulinen der Klasse G kann zwischen 150 kDa und 194 kDa variieren (Roitt *et al.*, 1995). Nach der Aufreinigung wurde die IgG-Konzentration des Eluats zum einen photometrisch, zum anderen mittels eines Sandwich-ELISA bestimmt. Als Methode zur Quantifizierung geringer Antikörpermengen ist allerdings der ELISA vorzuziehen. Wichtig bei der Bestimmung der IgG-Konzentration ist allerdings die Wahl des mAk-Standards. Es muss als Standard ein aufgereinigter identischer mAk eingesetzt werden, da Unterschiede im Bindungsverhalten an den Fangantikörper oder an den Sekundärantikörper

zwischen unterschiedlichen mAk auftreten können. Versuche, die von Falkenberg *et al.* (1991) und Giersch *et al.* (1993b) durchgeführt wurden, bestätigen dies. Die IgG-Konzentration wurde somit photometrisch oder mit dem BCA-Test ermittelt, der die Gesamt-Proteinkonzentration einer Probe bestimmt. Die Methode wurde von Smith *et al.* (1985) erstmalig beschrieben.

4.5 Entwicklung eines DO-Enzymimmunoassays

Für die Entwicklung eines indirekten kompetitiven Enzymimmunoassays wurde das polyklonale Serum der 5. Blutabnahme und der mAk 4D1D eingesetzt. Um unspezifische Bindungen von den Antikörpern an die Mikrotiterplatte zu eliminieren, wurde die Platte nach dem Vorcoaten blockiert. Als günstigstes Blockierungsmittel für den DO-ELISA hat sich – sowohl für mAk als auch pAk - Magermilchpulver in einer Konzentration von 3 % (w/v) erwiesen. Mit diesem konnte ein niedrigeres Hintergrundrauschen, verbunden mit einer verbesserten Nachweisgrenze als z.B. mit 1% OVA, erzielt werden. Zur Detektion belegter Bindungsstellen wurde ein mit Meerrettichperoxidase (POD) gekoppelter anti-Kaninchen- bzw. anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper verwendet. POD hat mit 4500 U/mg im Vergleich zu den anderen gebräuchlichen Markierungen wie alkalische Phosphatase mit 1000 U/mg und β -Galactosidase mit 600 U/mg die höchste spezifische Aktivität (Porstmann und Kiessig, 1992). Im Standard- ELISA wurde so mit dem polyklonalen Serum eine Nachweisgrenze von 5 μ g/l mit einem Testmittelpunkt von 100 μ g/l erreicht. Die Nachweisgrenze für den mAk 4D1D lag bei 20 μ g/l mit einem Testmittelpunkt von 100 μ g/l. Die Aufreinigung des mAk 4D1D brachte keine Sensitivitätssteigerung. Marx (1997) erreichte mit der Aufreinigung von Antikörpern gegen Quecksilber eine Verbesserung der Nachweisgrenze von 5 μ g/l auf 2,8 μ g/l. Da die ZKÜ der gewonnenen mAk in hoher Verdünnung eingesetzt wurden, führte das im NM enthaltene Rinder-IgG zu keinen Störeffekten im ELISA. Zur Steigerung der Sensitivität eines ELISAs gibt es unterschiedliche Möglichkeiten wie den Einsatz von Markern mit höherer Sensitivität, die Steigerung der relativen Menge von detektierbaren Labeln oder Änderungen im Testformat und in den Testbedingungen z.B. Inkubationszeit und –temperatur (Feldkamp *et al.*, 1987; Bates *et al.*, 1987; Avrameas, 1992; Kricka *et al.* 1994). Konkrete Beispiele hierfür wären der Einsatz von DNA-Label, Enzymkaskaden über Alkoholdehydrogenase/Diaphorase, CARD oder ABC-Amplifizierungssystem. Die Sensitivität der DO-ELISAs wurde dadurch erhöht, indem die Antikörperkonzentration im Assay reduziert wurde. Mit niedrigen Antikörperkonzentrationen werden allerdings niedrige Signale infolge geringerer

Substratumsetzung erreicht. Zur Steigerung der Substratumsetzung wurde ein Streptavidin-Biotin-Amplifizierungssystem (ABC-System) verwendet (Avrameas, 1992). Bei diesem System können mehr POD-Moleküle pro gebundenem Ak umgesetzt werden, als bei dem Einsatz von einem einfach mit POD-markierten Sekundärantikörper. Mit diesem Assay konnte die Nachweisgrenze im Falle der polyklonalen Antikörper von 5 µg/l auf 0,8 µg/l verbessert werden. Der Testmittelpunkt lag bei 15 µg/l. Im Falle des mAk 4D1D konnte die Sensitivität von 20 µg/l auf 4 µg/l verbessert werden. Der Testmittelpunkt befand sich hier bei 10 µg/l. Damit konnte in beiden Fällen die Sensitivität ungefähr um den Faktor 5 verbessert werden. Marx *et al.* (2000) erreichten mit dem ABC-System eine Verbesserung der Sensitivität um den Faktor 10. Es wird auch von einer Steigerung bis um das 100fache berichtet (Shamzuddin und Harris, 1983; Diamandis und Christopoulos, 1991).

Mehrere polyklonale Antikörper gegen Domoinsäure wurden bereits entwickelt. Smith und Kitts (1994) detektierten Domoinsäure in Körperflüssigkeiten. Sie erhielten Nachweisgrenzen zwischen 0,2 µg/ml und 10 µg/ml. Garthwaite *et al.* (1998) konnten Domoinsäure in einem Bereich von 0,15 bis 15 µg/l bestimmen. Brannaa *et al.* (1999) erreichten Nachweisgrenzen mit pAk von 3 µg/l. Monoklonale Antikörper gegen DO sind von Brannaa *et al.* (2000) erwähnt. Sie erreichten einen Messbereich von 30 bis 300 µg/l. Dennoch ist zur Zeit noch kein kommerzieller ELISA zur Bestimmung von DO verfügbar. Vergleicht man die entwickelten pAk und mAk miteinander, wird eine höhere Sensitivität mit den pAk erreicht. Dies darf aber nicht zu der Behauptung führen, dass man mit polyklonalen Antikörpern gegen Haptene durchweg höhere Sensitivitäten erreicht. Deschamps *et al.* (1991) entwickelten pAk und mAk gegen Picloram. Hier zeigte sich der mAk in Bezug auf Nachweisgrenze und Präzision überlegen. Auch konnte Giersch (1993a) mit einem mAk gegen Atrazin die Nachweispfindlichkeit eines von Wüst und Hock (1992) entwickelten polyklonalen Antikörpers aus Schafen erreichen.

Bevor Ak zur Quantifizierung in immunochemischen Methoden eingesetzt werden, ist die Kenntnis der Kreuzreaktivitäten wichtig. Die Kreuzreaktivität definiert sich als der Grad der kompetitiven Bindung strukturell dem Analyten ähnlicher Moleküle. Sie gehört zu den inhärenten Eigenschaften eines Antikörpers und tritt sowohl bei polyklonalen als auch bei monoklonalen Antikörpern auf (Wilson, 1988). Eine häufige Methode für diese Bestimmung ist der Vergleich der Bindung verschiedener Moleküle am Testmittelpunkt (Abraham *et al.*, 1969). Die Voraussetzung dafür ist die Parallelität der Eichkurven der untersuchten Substanzen. Dieses Kriterium wird bei den untersuchten mAk durch die einheitliche Antikörperpopulation erfüllt (Giersch, 1993b). Bei polyklonalen Seren können durch inhomogene Zusam-

mensetzung der Antikörper Abweichungen in der Parallelität der Standardkurven, die bei unterschiedlichen Analytkonzentrationen zu abweichenden Kreuzreaktivitäten führen, festgestellt werden (Ulrich *et al.*, 1991). Bestimmungen bei verschiedenen Konzentrationen liefern hier ein genaueres Bild. Ferner sind die Kreuzreaktivitäten nur unter den Bedingungen gültig, unter denen sie ermittelt wurden. Größere Veränderungen von Parametern wie Reaktionszeiten, pH-Wert oder unterschiedliche Verdünnungen von Reaktionspartnern können zu veränderten Kreuzreaktivitäten führen (Giersch, 1993b).

Kreuzreaktivitätstests wurden sowohl mit den pAk als auch mit dem mAk 4D1D durchgeführt. Kaininsäure, Aspartinsäure, Glutaminsäure, Geranolsäure und 2-Methyl-3-butensäure wurden für Kreuzreaktivitätsstudien ausgewählt, da diese strukturell der Domainsäure ähnlich sind. Insbesondere die Kenntnis der Kreuzreaktivität gegenüber Kaininsäure scheint besonders wichtig. Sato *et al.* (1996) fand dieses von der Rotalge *Digenea simplex* produzierte Algentoxin in Algenblüten. Oftmals kommen diese Algen zusammen mit den domoinsäureproduzierenden Spezies von *Pseudonitzschia* vor. Aufgrund der weitaus geringeren Toxizität der Kaininsäure könnte ein Messergebnis im ELISA im Falle hoher Kreuzreaktivität der Ak somit verfälscht werden.

Weder die pAk noch der mAk 4D1D kreuzreagierten mit den oben aufgeführten Substanzen. Es konnten somit pAk und mAk mit hoher Selektivität gegenüber Domoinsäure entwickelt werden. Garthwaite *et al.* (1998) entwickelten pAk gegen DO. Sie konnten gegenüber Glutaminsäure keine Kreuzreaktivität, gegenüber Kaininsäure eine geringe Kreuzreaktivität von 0,005% feststellen. Smith und Kitts (1994) konnten keine Kreuzreaktivität gegen Glutamin-, Aspartin- und Kaininsäure feststellen. Bei der Betrachtung der Kreuzreaktivitätsmuster ist es schwierig, Aussagen über Zusammenhänge zwischen den Haptenstrukturen und den Antikörperspezifitäten abzuleiten. In diesem Fall könnten die Ak gegen Teilstrukturen des Ringes inklusive des C₆-Carboxylrestes gerichtet sein, was die negative Kreuzreaktivität gegenüber Kaininsäure erklären würde.

Polyklonale Antikörper wurden trotz ihrer höheren Sensitivität und hohen Spezifität nicht zur Entwicklung eines Testsystemes zur Quantifizierung von DO im Muschelgewebe herangezogen. Die Etablierung eines Testsystems auf Basis polyklonaler Antikörper ist aufgrund der begrenzten Menge an pAk schwierig, da die Immunantworten der immunisierten Tiere und damit die Qualität der Ak selbst bei Injektion desselben Immunkonjugates recht unterschiedlich ausfallen können. Die entwickelten pAk dienten vor allem zur Belieferung von EU-Projektpartnern während der langwierigen Produktion von monoklonalen Antikörpern.

4.6 Probenmessung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein ELISA auf der Basis von mAk zur Quantifizierung von Domoinsäure im Muschelgewebe entwickelt werden. Für die Untersuchung von Umweltproben muss sichergestellt sein, dass die im Test ermittelten Messergebnisse korrekt und zuverlässig sind. Anhaltspunkt für die Qualität der Tests ist die Bestimmung der Toleranz gegenüber Matrixeffekten. Die Extraktion von Domoinsäure aus Muschelgewebe erfolgte nach Quilliam *et al.* (1995). Hierbei wird DO mit einem Methanol/Wasser-Gemisch (50 % / 50 %) extrahiert. Erfahrungen aus dem eigenen Labor zeigten, dass Antikörper oft mit einem erhöhten Sensitivitätsverlust auf organische Lösungsmittel reagieren. Deshalb musste zuerst die Methanolverträglichkeit des mAk 4D1D untersucht werden. Bei Lausterer (2002) war eine ELISA-Messung von Trichloranisol ab einem Ethanolgehalt von 10 % in der Probe nicht mehr möglich. Schon ab 5 % Ethanolgehalt in der Probe zeigte dieser mAk erhebliche Sensitivitätsverluste. Zeck (2001) stellte eine Methanolkompatibilität von 30 % eines mAk gegen Microcystin fest. Um die Methanolkompatibilität zu messen, wurden DO-Standards mit Muschelextrakten erstellt. Der mAk 4D1D zeigte bei 25 % Methanol in der Probe keine Matrixeffekte mehr. Die mit 25 % Methanol erstellte Standardkurve war identisch zu der mit PBS erstellten Standardkurve. Bei 50 % Methanol in der Probe verschlechterte sich die Nachweisgrenze von 4 µg/l auf 12 µg/l. Der Testmittelpunkt betrug in diesem Fall 80 µg/l. Eine Messung von Rohextrakten wäre folglich dennoch möglich.

Die Methanolverträglichkeit des mAk 4D1D scheint sehr selten zu sein. Garthwaite *et al.* (1998) mussten die extrahierten Muschelextrakte mindestens 1:50 mit PBS verdünnen, um Matrixeffekte bei einem ELISA mit pAk zu vermeiden. Bei Branaa *et al.* (1999) war zuvor ein Reinigungsschritt der Extrakte über eine Anion-Austauscher-Säule erforderlich. Die Extrakte wurden anschließend noch 1:10 verdünnt und über Nacht mit pAk präinkubiert, bevor diese in einem ELISA appliziert werden konnten. Jedes zusätzliche Aufreinigungsverfahren kostet allerdings Zeit. Kommerzielle Testkits sollen dagegen leicht und schnell durchführbar sein. Eventuell ist hier ein Grund darin zu sehen, warum sich diese hochsensitiven polyklonalen Antikörper für einen kommerziellen Testkit nicht eignen und sich somit gegenüber den klassischen Verfahren wie Bioassay (Iverson *et al.*, 1989) oder HPLC (Quilliam *et al.*, 1998) nicht durchsetzen konnten. Der mAk 4D1D würde trotz seiner etwas geringeren Sensitivität diesen Anforderungen genügen, da er ohne Aufreinigungsschritte direkt mit Rohextrakten eingesetzt werden kann.

Um die Wiederfindungsrate zu bestimmen, wurde jeweils 1g Muschelgewebe mit 20 µg Domoinsäure (Grenzwert WHO) bzw. mit 10 µg Domoinsäure aufgestockt und extrahiert. Die Extrakte wurden 1:100 und 1:200 mit PBS verdünnt und direkt im ELISA gemessen. Dabei betrug die durchschnittliche Wiederfindungsrate mit dem DO-ELISA 88,5 %±4,9 %. Damit zeigte der EIA eine leichte Unterbestimmung. Garthwaite *et al.* (1998) erreichten Wiederfindungsraten von 103 %±3,3 %. Betrachtet man allerdings die Wiederfindungsraten der einzelnen aufgestockten Proben, so erhält man Wiederfindungsraten von 96,0 %±6,4 % für mit 10 µg dotierten Proben und 81,0 %±3,3 % für mit 20 µg dotierte Proben. Dabei ist die Wiederfindungsrate für mit 10 µg/g dotierte Proben relevanter, da dieser Wert sich nahe am Testmittelpunkt des ELISAs befindet. Der Testmittelpunkt liegt im steilsten Bereich der sigmoiden Kurve. In diesem Bereich ist der Variationskoeffizient klein und relativ konstant, während er in dem asymptotischen Bereichen schnell sehr groß wird. Die Wiederfindungsrate lässt sich folglich am besten nahe des Testmittelpunktes bestimmen.

Mit Domoinsäure exponierte *Mytilus*- und *Anadonta*-Proben wurden von Prof. Dr. Hansen und Dr. Dizer, TU Berlin, bereitgestellt. Es wurden die Gewebearten Kiemen, Hepatopankreas, Mantel, Gonaden und hinterer Schließmuskel getrennt präpariert, extrahiert und im EIA gemessen. Bei *Mytilus* konnten im Hepatopankreas 0,41 µg/g, im Gonadengewebe 0,12 µg/g und 0,15 µg/g im Kiemengewebe detektiert werden. Bei *Anadonta* sp. akkumulierte DO im Hepatopankreas mit 0,73 µg/g, gefolgt vom Gonadengewebe mit 0,23 µg/g, Mantelgewebe mit 0,12 µg/g und Kiemengewebe mit 0,05 µg/g. Die Versuche von Whyte (2001) bestätigten ebenso, dass sich DO vor allem im Hepatopankreas akkumuliert. Jene kultivierten die Muschelarten *Mizuhopecten yessoensis*, *Chlamys hastata* und *Chlamys rubida* zusammen mit *Pseudonitzschia multiseriis* in einer Konzentration von 8,7–19,6*10⁴ Zellen/ml. Jede Algenzelle beinhaltet 3,2–5,0 pg Domoinsäure. Nach einer halben Stunde Inkubation konnten im Hepatopankreas 75%, 63% bzw. 92% der eingesetzten DO detektiert werden. Im Verlauf von 4 Stunden kann allerdings beobachtet werden, dass der Gehalt an DO im Hepatopankreas langsam abnimmt, während er im Kiemen- und Mantelgewebe zu nimmt. Douglas *et al.* (1997) stellten ebenfalls fest, dass die höchsten Konzentrationen von Domoinsäure im Hepatopankreas zu finden sind. Die niedrigsten Konzentrationen befinden sich im hinteren Schließmuskel, was auch die eigenen Messungen bestätigen.

Drei Realproben von *Mytilus edulis* wurden von Prof. Lukas, Universität Jena, zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden dort mit HPLC gemessen. Dabei wurden die Konzentrationen im EIA niedriger bewertet als in der HPLC. Dies könnte daran liegen, dass die Muschelhomogenate ungekühlt versendet worden sind. Domoinsäure ist bei Raumtemperatur nur wenige Tage

stabil. Gekühlte Stammlösungen sind dagegen bis zu 15 Wochen haltbar (Herstellerangabe, BTS).

4.7 Untersuchung der Antikörper-Antigen-Interaktionen

Prinzipiell kann die Untersuchung von Interaktionen mit dem BIAcore zum einen mit der Immobilisierung des Antikörpers (Karlsson und Stahlberg, 1995), zum anderen durch Bindung eines Ligand-Protein-Konjugats (Nieba *et al.*, 1996) auf der Sensorchipoberfläche erfolgen. Erstere ermöglicht die Messung von Antikörper-Antigen-Interaktionen unter homogenen Verhältnissen. Nachteile dieses Verfahrens sind allerdings, dass bei der Messung von Analyten kleiner Molekülgröße wie DO kein bzw. nur ein sehr schwaches Signal erzeugt werden kann. Weiterhin bereitet die Regeneration des Chips große Schwierigkeiten, was oftmals zum Verlust der Affinität führt. Bei Versuchen, die mit dem mAk 4D1D durchgeführt wurden, konnten die oben genannten Beobachtungen bestätigt werden.

Eine andere Möglichkeit, konkrete Affinitätsdaten für die Interaktion des mAk 4D1D mit dem Coatkonjugat zu messen, stellt die Immobilisierung des Liganden dar. Hock *et al.* (2002) nutzten diesen Ansatz, um Affinitätsdaten eines Oestradiol-Rezeptors und eines rekombinanten Antikörpers gegen s-Triazine zu ermitteln. Weiterhin wurden damit kompetitive Assays zur Messung von 17β -Oestradiol und s-Trazinen entwickelt. Stöcklein *et al.* (2000) immobilisierten ein Kreatinderivat an der Sensoroberfläche und entwickelten damit einen kompetitiven Assay. Oda und Azuma (2001) ermittelten mit immobilisierten Antigenen die Affinität unterschiedlicher Antikörper. Von Systemen mit immobilisierten Atrazinderivaten zur Ermittlung von Affinitätsdaten von rekombinanten Antikörpern berichtet auch Strachan *et al.* (1998). Durch die Messung der Interaktion von immobilisierten Coatkonjugat OVA-DO mit dem mAk 4D1D konnte die Affinität des mAk 4D1D zum Beschichtungskonjugat ermittelt werden. Es konnte eine Dissoziationskonstante von $1,6 \cdot 10^{-10}$ [M] errechnet werden. Branaa *et al.* (1999) konnten mit pAk einen EIA gegen DO mit einer Nachweisgrenze von $3 \mu\text{g/l}$ und einem Testmittelpunkt von $20 \mu\text{g/l}$ entwickeln. Mit Hilfe dieses EIA wurde eine Dissoziationskonstante eines gegen Domainsäure gerichteten polyklonalen Antikörpers von $5 \cdot 10^{-7}$ [M] ermittelt. Nach diesem Verfahren hängt die Affinitätskonstante direkt von der Konzentration des Analyten am niedrigsten erreichbaren Testmittelpunkt ab. Dieser kann durch den Einsatz sehr geringer Antikörper- und Enzymtracerkonzentrationen ermittelt werden. Da mit dem mAk 4D1D bei einer Dissoziationskonstante von $1,6 \cdot 10^{-10}$ [M] ein Testmittelpunkt im EIA

von 10 µg/l erreicht wurde, ist es wahrscheinlich, dass dieser durch weitere Optimierungsarbeiten (Konjugat- und Tracersynthesen) noch gesenkt werden könnte.

Weiterhin konnte auf diese Weise ein kompetitiver Immunoassay zur Ermittlung der Konzentration von freier Domoinsäure entwickelt werden. Der Testmittelpunkt lag für Domoinsäure bei 9,6 µg/l, die Nachweisgrenze bei 1,8 µg/l. Der kompetitive Immunoassay diente weiterhin zur Ermittlung von Kreuzreaktivitäten gegen Glutaminsäure, Aspartinsäure und Kaininsäure. Es konnten keine Veränderungen der „Resonance Units“ festgestellt werden, was belegt, dass der mAk 4D1D mit keiner der oben aufgeführten Substanzen kreuzreagiert. Diese Ergebnisse wurden durch Versuche im ELISA bestätigt. Eine Einzelmessung konnte innerhalb von 10 Minuten durchgeführt werden, was zu erheblicher Zeiteinsparung im Vergleich zum ELISA führt. Durch geeignete Regenerationsbedingungen (0,2% SDS, 10 mM HCl) konnte die Sensoroberfläche wieder vollständig hergestellt werden. Es waren bis zu 20 Messzyklen mit einem Chip möglich. Sind die Testparameter erst optimiert, stellt das Biacore die schnellere Alternative zum ELISA dar.

4.8 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden polyklonale und monoklonale Antikörper gegen Domoinsäure entwickelt. Bisher erfolgt die Analyse von DO vor allem durch Bioassays (Iverson *et al.* 1989), HPLC und Dünnschichtchromatographie (Quilliam *et al.*, 1998). Immunologische Nachweisverfahren als schnelles Screeningverfahren sind die ideale Ergänzung konventioneller chromatographischer Verfahren (Hammock *et al.*, 1990). Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte mAk 4D1D eignet sich zur Quantifizierung von Domoinsäure im µg/l-Bereich. Ausgehend von der von der WHO gesetzten Grenze von 20 µg DO/g Muschelgewebe wäre eine 5000fache Probenverdünnung noch möglich, um den Analyten detektieren zu können. Neben den verwendeten ELISA im Mikrotiterplattenformat sind auch andere Testprinzipien wie Dipstick-Assays denkbar. Diese könnten von ungeschulten Personen eingesetzt werden. So wäre bereits eine Erfassung kontaminierter Muscheln schon vor Ort möglich. Die poly- und monoklonalen Antikörper wurden bereits erfolgreich in der Biosensoranalytik wie im BIAcore und der Piezo-Sensortechnik eingesetzt. Im BIAcore eröffnet sich weiterhin die Möglichkeit zur Etablierung eines Verdrängungsassays. Dabei bindet der Antikörper an das Beschichtungskonjugat, worauf sich eine Dissoziationsrate einstellt. Ist in einer Probe der Analyt vorhanden, wird der Ak vom Beschichtungskonjugat verdrängt, wodurch sich die Dissoziationsrate erhöht (Seifert, 1999). Dieser Assay wäre zum „online-Monitoring“ von kon-

taminierten Muschelproben geeignet. Für BIAcore-Messungen sind jedoch geschultes Personal und erhebliche finanzielle Mittel notwendig.

Antikörper und die darauf basierenden immunchemischen Methoden haben durch ihr breites Anwendungsspektrum Einzug in die Medizin, Biologie und Umweltanalytik gehalten. Weiterentwicklungen vor allem in der Gentechnologie erweitern das Spektrum von nachweisbaren Substanzen fortwährend.

5 Zusammenfassung

Domoinsäure ist ein von der marinen Kieselalge *Pseudonitzschia* sp. produziertes Neurotoxin, welches sich in Muscheln und anderen Weichtieren anreichern kann. Beim Verzehr solcher kontaminierter Muscheln kommt es zum Ausbruch eines als „Amnesic Shellfish Poisoning“ bekannten Syndroms. Als Symptome können Kopfschmerzen, Orientierungsverlust und Störungen des Kurzzeitgedächtnisses auftreten. Auch Todesfälle sind bekannt. Die etablierten Techniken zur Detektion von Domoinsäure (DO) sind der Maus-Bioassay und analytische Verfahren wie HPLC und Dünnschichtchromatographie. Der Einsatz von immunchemischen Verfahren stellt eine mögliche Alternative dar, welche sich durch hohe Sensivität und Selektivität auszeichnet. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, polyklonale und monoklonale Antikörper gegen DO zu entwickeln.

DO wurde mit der Carbodiimid-Methode an die Trägerproteine OVA und KLH gekoppelt, um eine Immunantwort auslösen zu können. Kaninchen und Mäuse wurden mit KLH-DO-Konjugaten nach einem vorgegebenen Immunisierungsschema immunisiert. Nach 5 Blutabnahmen zeigte das polyklonale Kaninchenantiserum eine hohe Sensitivität zum Analyten. Die Nachweisgrenze dieses Serums in einem heterogenen kompetitiven ELISA lag bei 5 µg/l mit einem Testmittelpunkt von 100 µg/l. Die pAk zeigten keine Kreuzreaktivität gegenüber Kaininsäure, Glutaminsäure, Aspartinsäure, Geranylsäure und 2-Methyl-3-Butensäure. Zur Verbesserung der Sensitivität des ELISA wurde ein ABC-Amplifizierungssystem verwendet. In diesem System wurde anstelle eines enzymmarkierten-Sekundär-Ak ein biotinylierter Ak eingesetzt, an dem ein Streptavidin-POD-Komplex binden konnte. Durch die Erhöhung der Anzahl von immobilisierten POD-Molekülen konnte somit die Nachweisgrenze auf 0,8 µg/l mit einem Testmittelpunkt von 15 µg/l verbessert werden. Somit konnten hochspezifische und hochsensitive pAk entwickelt werden.

Monoklonale Ak wurden mit der Hybridomtechnologie erhalten. Nach der Immunisierung wurden die Milzzellen entnommen und durch PEG mit Myelomzellen fusioniert. Nach der HAZ-Selektion wurden die Hybridomzellen mit einem Screening-Verfahren daraufhin überprüft, ob sie spezifische Anti-DO-Ak sezernieren. Es konnten 3 Hybridomalinien isoliert werden. Die Hybridomalinien wurden zweimal kloniert, um die Monoklonalität zu gewährleisten. Die Zelllinie mAk 4D1D wurde aufgrund des guten Wachstums und der hohen Sensitivität zur Massenproduktion ausgewählt. Die Aufreinigung der serumfreien Kulturüberstände erfolgte über Protein-A-Affinitätschromatographie. Mit dem aufgereinigten mAk 4D1D konnte eine Nachweisgrenze von 19 µg/l bei einem Testmittelpunkt von 100 µg/l erreicht werden.

Der mAk 4D1D zeigte keine Kreuzreaktivität gegenüber den oben aufgeführten Substanzen. Mit einem ABC-Amplifizierungssystem konnte die Nachweisgrenze auf 3,9 µg/l mit einem Testmittelpunkt von 10 µg/l deutlich verbessert werden.

Der mAk 4D1D wurde zur Quantifizierung von DO im Muschelgewebe eingesetzt. Zur Extraktion von DO aus Muschelgewebe wurde ein Methanol-Wassergemisch (50%/50%) verwendet. Der mAk 4D1D zeigte erstaunlich hohe Methanolverträglichkeit, so dass die Extrakte ohne feststellbare Matrixeffekte in einer 1:2 Verdünnung direkt im ELISA appliziert werden konnten. Die Wiederfindungsrate von DO in dotierten Muschelextrakten betrug $88,5 \pm 4,9$ %. Mit dem Standard-ELISA wurden reale Muschelproben gemessen. Zum Vergleich wurden die Proben mit HPLC gegemessen. Dabei zeigte sich eine gute Übereinstimmung der beiden Methoden. Somit eignet sich der mAk 4D1D zur quantitativen Bestimmung von DO im Muschelgewebe. Weiterhin wurden Ak-Analyt-Interaktionen mit dem BIAcore untersucht. Hierbei konnte eine Dissoziationskonstante von $1,6 \cdot 10^{-10}$ [M] ermittelt werden. Außerdem wurde ein kompetitiver Immunoassay im BIAcore entwickelt. Mit diesem System wurde eine Nachweisgrenze von 1,2 µg/l mit einem Testmittelpunkt von 9,6 µg/l erreicht.

6 Literatur

ABRAHAM, G.E. (1969) Solid-phase radio immunoassay for estradiol-17 β . *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 29, 866-870.

ALLEN D., CUMANO A., DILDROP R., KOCKS C., RAJEWSKI K., RAJEWSKI N., ROES J., SABLITSKY F., SIEKEVITZ M. (1987) Timing, genetics requirements and functional consequences of somatic hypermutation during B-Cell development. *Immunological Review*, 96, 5-22.

ALZARI P.M., LASCOMBE M.-B., POLJAK R.J. (1998) Three-dimensional structure of antibodies. *Annual Review of Immunology*, 6, 555-580.

ANSELL R.J., KRITZ D., MOSBACH K. (1996) Molecularly imprinted polymers for bioanalysis: chromatography, binding assays and biomimetic sensors. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 7, 89-94.

ARNON R. , SHAPIRA M., JACOB C.O. (1983) Synthetic vaccines. *J.Immunol.Meth.*, 61, 261-273.

AVRAMEAS S. (1992) Amplification systems in immunoenzymatic techniques. *J. Immunol. Meth.*, 150, 23-32.

BATES D.L. (1987) Enzyme amplification in diagnostics. *Tibtech*, 5, 204-209.

BATES S.S, WORMS J., SMITH J.C. (1993) Effects of ammonium and nitrate growth and Domoic acid production by *Nitzschia pungens* in batch culture. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50, 1248-1254.

BAUMINGER S., WILCHEK M. (1980) The use of carbodiimides in the preparation of immunizing conjugates. *Methods in Enzymology*, 70, 151-159.

BENNETT B., CHECK I.J., OLSEN M.R., HUNTER R.L. (1992) A comparison of commercially available adjuvants for use in research. *Journal of Immunological Methods*, 153, 31-40.

- BERSON S.A., YALOW R.S, BAUMANN A., ROTHSCHILD M.A., NEWERLY K. (1956) Insulin-I¹³¹ metabolism in human subjects: Demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects. *J. Clin. Invest.*, 35, 170-190.
- BETTER M., CHANG, C.P., ROBINSON R.R., HRWITZ, A.H. (1988) Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science*, 240, 1041-1043.
- BURGSTALLER P.; FAMULOK M. (1994) Isolation of RNA-Aptamers for Biological Cofactors by In Vitro Selection. *Angew. Chem.* 1994, 106, 1163-1166 (*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1994, 33, 1084-1087).
- BRANAA P., NAAR J., CHINAIN M., PAULLAC S. (1999) Preparation and characterisation of domoic acid-protein conjugates using small amount of toxin in a reversed micellar medium: application in a competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Bioconjugate Chem.*, 10, 1137-1142.
- BRANAA P., NAAR J., CHINAIN M., PAULLAC S. (2000) Monoclonal Antibody-based enzyme immunoassay for domoic acid by using hapten-protein conjugates obtained at the nanomolar level in a reversed micellar medium. Poster Presentation, Harmful Algae Blooms, Ninth Conference Tasmania.
- BRODERSON J.R. (1989) A retrospective review of lesions associated with the use of Freund's adjuvant. *Laboratory Animal Science*, 39, 400-405.
- BRUNN L., KOCH C., JACOBSEN M. H., AAMAND J. (2000) A new monoclonal antibody for the sensitive detection of cyanazine and other s-triazines in water by ELISA. *Food and Agricultural Immunology*, 12, 253-262.
- CAMPELL A.M. (1991) Monoclonal antibody and immunosensor technology. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, 23, Elsevier Amsterdam.

- CARMICHAEL W.W., AN J. (1999) Using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and a protein phosphatase inhibition assay (PPIA) for the detection of microcystins and nodularins. *Natural Toxins*, 7, 377-385.
- CLAASEN E., DELEEUW, W., DEGREEVE, D., HENDRIKSEN C., BOERSMA W. (1992) Freund's complete adjuvant: an effective but disagreeable formula. *Research in Immunology*, 143, 478-482.
- COLLER H.A., COLLER B.S. (1983) Poisson statistical analysis of repetitive subcloning by the limiting dilution technique as a way of assessing hybridoma monoclonality. *Meth. Enzymol.*, 121, 412-417.
- DANKWARDT, A. (1994) Entwicklung und Anwendung von Immunoassays in der Rückstandsanalytik von Atrazin-Untersuchungen von Regenwasser, Oberflächenwasser und gebundenen Rückständen. Promotionsschrift an der Technischen Universität München.
- DESCHAMPS R.J.A., HALL J.C. (1991) Enzyme immunoassay for picloram detection: a comparison of assay formats. *Food and Agricultural Immunology*, 3, 135-145.
- DIAMANDIS E.P., CHRISTOPOULOS T.K. (1991) The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clinical Chemistry*, 37, 625-636.
- DIZER H., FISCHER B., HARABAWY A.S.A., HENNION M.-C., HANSEN P.-D. (2001) Toxicity of domoic acid in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 55, 149-156.
- DOUGLAS D.J., KENCHINGTON E.R., BIRD C.J., POCKLINGTON R., BRADFORD B. SIVERT W. (1997) Accumulation of domoic acid by the sea scallop (*Placopecten magellanicus*) fed cultured cells of toxic *Pseudonitzschia multiseries*. *Ca. J. Fish. Aquat. Sci.* , 54, 907-913.
- DOUGLAS D.J., RAMSEY U.P., WALTER J.A, WRIGHT J.L.C. (1992) Biosynthesis of the neurotoxin domoic acid by the marine diatom *Nitzschia pungens* forma *multiseries*, determined with [¹³C]-labelled precursors and nuclear magnetic resonance. *Journal of the chemical society*, 714-716.

DUDLEY R.A., EDWARDS P., EKINS R.P., HINNEY D.J., MCKENZIE I.G.M., RAAB G.M., ROBBARD D., RODGERS R.R.C. (1985) Guidelines for immunoassay data processing. *Clinical Chemistry*, 31, 1264-1271.

EBEL, S., KAMM, K. (1983) Statistische Definition der Bestimmungsgrenze. *Fresenius Zeitschrift für analytische Chemie*, 316, 382-385.

EKINS, R., CHU F., MICALLEF J. (1989) High specific activity chemiluminescent and fluorescent markers: their potential application to high sensitivity and multianalyte immunoassays. *J. Bioluminescence and Chemiluminescence*, 4, 59-78.

ENGVALL E., PERLMANN P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)- quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8, 871-874.

ENGVALL E., PERLMANN P. (1972) Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA. Quantification of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *The Journal of Immunology*, 109, 129-135.

ERLANGER B.F. (1973) Principles and methods for the preparation of drug protein concentration for immunological studies. *Pharmacological Reviews*, 25, 271-280.

ERLANGER B.F. (1980) The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates: a survey. *Methods in Enzymology*, 70, 85-104.

FAGERSTAM L.G., FROSTELL-KARLSSON A., KARLSSON R., PERSSON B., RONNBERG I. (1992) Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding-site and concentration analysis. *J. Chromatogr.*, 597, 397-410.

FALKENBERG F.W., HAARDT F., WÜTHRICH M., HENGELAGE T., KRANE M. (1991) Möglichkeiten und Grenzen der in vitro-Produktion monoklonaler Antikörper. *BMFT-Forschungsbericht*, AZ 0318902A.

FALKENBERG F.W., WEICHERT H., KRANE M., BARTELS I., PALME M., NAGELS H.-O., FIEBIG H. (1995) In vitro production of monoclonal antibodies in high concentration in a new and easy to handle modular minifermenter. *J. Immunol. Meth.*, 179, 13-29.

FAMULOK, M. (1994) Molecular Recognition of Amino Acids by RNA-Aptamers: An L-Citrulline Binding RNA Motif and its Evolution into an L-Arginine Binder. *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 1698-1706.

FAZEKAS DE ST. GROTH S., SCHEIDEGGER, D. (1980) Production of monoclonal antibodies; strategy and tactics. *Journal of Immunological Methods*, 35, 1-21.

FeldkAMP, C .S.; SMITH, S. W. (1987) Practical guide to immunoassay method evaluation. In *Immunoassay. A Practical Guide*; Chan, D.W. (Ed.), Academic Press: Orlando, Florida,; 49 – 95.

FORSGREN A., SJÖQUIST J. (1966) "Protein A" from *S. aureus* I. pseudo-immune reaction with human gamma-globulin. *J. Immunol.*, 97, 822-827.

FRENCH D., FISCHBERG E., BUHL S., SCHARFF M.D: (1986) the production of more useful monoclonal antibodies I. Modifications of the basic technology. *Immunology Today*, 7, 344-346.

FREUND J., FISCHBERG E., BUHL S., SCHARFF M.D. (1937) Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, 37, 509.

FRYXELL G.A., VILLAC M.C., SHAPIRO L.P. (1997) *Phycological reviews* 17, The Occurrence of the toxic diatom genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) on the west coast of the USA, 1920-1996: a review. *Phycologia*, 36 (6), 419-437.

GALLATI H., PRACT, I. (1985) Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H₂O₂ und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 23, 453-460

GANI M., MC GUINNESS B.J., DAVIES, P. (1998) Monoclonal antibodies against tea polyphenols: a novel immunoassay to detect polyphenols in biological fluids. *Food and Agricultural Immunology*, 10, 13-22.

GARTHWAITE I., ROSS K.M., MILES C.O., HANSEN R.P., FOSTER D., WILKINS A.L., TOWERS N.R. (1998) Polyclonal antibodies to domoic acid and their use in immunoassay for domoic acid in sea water and shellfish. *Natural Toxins*, 6, 93-104.

GIERSCH T., HOCK B. (1990) Production of monoclonal antibodies for the determination of s-triazines with enzyme immunoassay. *Food and Agricultural Immunology*, 2, 85-97.

GIERSCH, T. (1993a) A new monoclonal antibody for the sensitive detection of atrazine with immunoassay in microtiter plate and dipstick format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1006-1011.

GIERSCH, T. (1993b) Monoklonale Antikörper für die Umweltanalytik. Habilitationsschrift an der Technischen Universität München, Freising-Weihenstephan.

GIERSCH, T., SCHÄPERMEIER, S. (1998) Monoclonal antibody production in serum-free medium. *GIT International Edition*, 2, 113-117.

GODING J.W. (1996) *Monoclonal antibodies: principles and practice*. Academic Press London.

GOODMANN M.G., CHENOWETH D.E., WEIGLE W.O. (1982) Potentiation of the primary humoral immune response in vitro by C5a anaphylatoxin. *J. Immunol.*, 129 (1), 70-75.

HAMMOCK B.D., GEE S.J., HARRISON R.O., JUNG. F., GOODROW M.H., LI Q.X., LUCAS A.D., SZEKACS A., SUNDARAM K.M.S. (1990) Immunochemical technology in environmental analysis - Addressing critical problems. *Immunochemical Methods in Environmental Analysis*. ACS Symposium Series, 442, 112-139.

HAMPSON D.R., MANALO J.L. (1998) The activation of glutamate receptors by kainic acid and domoic acid. *Natural Toxins*, 6, 153-158.

HARLOW, E., LANE, D. (1988) *Antibodies, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

HERMANNSON G.T. (1996) *Bioconjugates Techniques*. Academic Press San Diego.

HILLENKAMP, F.; KARAS, M. (1991) Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers. *Anal. Chem.*, 63, 1193A-1202A.

HITZFELD B.C., LAMPERT C.S., SPAETH N., MOUNTFORT D., KASPAR H., DIETRICH D.R. (2000) Toxin Produktion in Cyanobacterial Mats from ponds on the McMurdo ice shelf, Antarctica. *Toxicon*, 38, 1731-1748.

HOCK B. (1993) Immunochemische Verfahren in der Umweltanalytik und ihre Perspektiven. *Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie*, 5, 309-319.

HOCK B., SEIFERT M., KRAMER K. (2002) Engineering receptors and antibodies for biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*, 17, 239-249.

HU, J.G., TAKASAGI W., TSUKAMOTO R., NAMBARA T. (1989) Studies on the optimal immunization schedule of mouse as an experimental animal. The effect of antigen dose and adjuvant type. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 37, 3042-3046.

HURN B.A.L., CHANTLER S.M. (1980) Production of reagent antibodies. *Methods in Enzymology*, 70, 104-142.

IVERSON F., TRUELOVE J., NERA E., TRYPHONAS L., CAMPELL J., LOK E. (1989) Domoic acid poisoning and mussel-associated intoxication: preliminary investigations into the response of mice and rats to toxic mussel extracts. *Food Chem. Toxicol.*, 27, 377-384.

JACKSON L.L., TRUDEL L.J., LIPMAN, N.S. (1999) Small-scale monoclonal antibody production in vitro: methods and resources. *Lab Animal*, 28, No 3.

JANEWAY C.A., TRAVERS, P. (1995) Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

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

JUAREZ-SALINAS H., OTT G.S. (1985) Process for binding IgG protein A. UK Patent Application GB 2160530.

KABAT E.A. (1980) Basic principles of antigen-antibody reactions. *Methods in Enzymology*, 70, 3-49.

KANIA M., HOCK B. (2002) Development of monoclonal antibodies to domoic acid for the detection of domoic acid in blue mussels (*Mytilus edulis*) by ELSIA. *Analytical Letters*, 35 (5), in press.

KARLSSON R., STAHLBERG R. (1995) Surface plasmon resonance detection and multispot sensing for direct monitoring of interactions involving low-molecular analytes and far determination of low affinities. *Anal. Biochem.*, 228, 274-280.

KARU A.E., HARRISON R.O., SCHMIDT D.J., CLARKSON C.E., GRASSMANN J., GOODROW M.H., LUCAS A., HAMMOCK B.D., VAN EMON, J.M., WHITE R.J. (1991) Monoclonal immunoassay of triazine herbicides – Development and implementation. *Immunoassay for trace chemical analysis. ACS Symposium Series*, 451, 59-77.

KELLNER J., ERHARD M., SCHRANNER I., LÖSCH U. (1992) The influence of various adjuvants on antibody synthesis following immunization with hapten. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 373, 51-55.

KLUG S., HÜTTENHOFER A., FAMULOK M. (1999). In vitro selection of RNA aptamers that bind special elongation factor SelB, a protein with multiple RNA-binding sites, reveals one major interaction domain at the carboxyl terminus. *RNA*, 5, 1180-1190.

- KÖHLER G., MILSTEIN C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. *Nature*, 256, 495-497.
- KRETZSCHMANN E., RAETHER H. (1968) Radiative decay of non-radiative surface plasmons by light. *Z. Naturforsch.*, 23, 2135.
- KRICKA, L. J. (1994) Selected strategies for improving sensitivity and reliability of immunoassays. *Clinical Chemistry*, 40, 347-357.
- LANDSTEINER K. (1933) Die serologische Spezifität der Proteine. In: Die Spezifität der serologischen Reaktionen. Springer Verlag Berlin.
- LAUSTERER R. (2002) Monoklonale Antikörper zum Nachweis von 2, 4, 6 Trichloranisol. Promotionsschrift an der Technischen Universität München.
- LAWRENCE J.F., CHARBONEAU C.F., MENARD C. (1989) Liquid chromatographic determination of domoic acid in shellfish products using the paralytic shellfish poisoning extraction procedure of the association of official analytical chemists. *J. Chromatogr.*, 462, 349-356.
- LAWRENCE J.F., MENARD C. (1991). Confirmation of domoic acid in shellfish using butyl isothiocyanate and reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 550, 595-601.
- LAWRENCE C.R., MARTIN A.S., SAMBLES J.R. (1992) Surface plasmon polariton studies of highly absorbing Langmuir-Blodgett films. *Thin Solid Films.*, 208, 269.
- LIEDBERG B, NYLANDER C, LUNDSTRÖM I (1983), Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing, *Sens. Actuators*, Vol. 4, S.299-304.
- LIVINGSTON D.M. (1974) Immunoaffinity Chromatography of proteins. *Methods in Enzymology*, 34, 723-731.
- LÖFÅS S, JOHNSON B. (1990) A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 21, 1526.

MALMQUIST M. (1993) Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics. *Current Opinion in Immunology*, 5, 282-286.

MANI J.C., MARCHI V., CUCUROU C. (1994) Effect of HIV-1 peptide presentation on the affinity constants of two monoclonal antibodies determined by BIAcore technology. *Mol. Immun.*, 31, 439-444.

MANSER, T. (1990) The efficiency of antibody affinity maturation. Can the rate of B-cell division be limiting?. *Immunology Today*, 11, 305-308.

MARX, A. (1997) Antikörper zum Nachweis von Quecksilber (II). Promotionschrift an der Technischen Universität München. Herbert Utz Verlag München.

MARX A., SHERRY J., HANSEN P.-D., HOCK B. (2000) A new monoclonal antibody against vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Chemosphere*, 44, 393-399.

MILLER T.J., STONE H.O. (1978) The rapid isolation of ribonuclease-free immunoglobulin G by protein A-sepharose affinity chromatography. *J. Immunol. Meth.*, 24, 111-125.

NAGEL A., KOCH S., VALLEY U., EMMRICH F., MARX U. (1999) Membrane-based culture systems- an alternative to in vivo production of monoclonal antibodies. In: Alternatives to animals in the development and control of biological products for human and veterinary use, vol 101, Brown F., Hendirksen C., Sesardic D. (eds), *Dev. Biol. Stand.*, Basel, 57-64.

NEWSOME H., TRUELOVE J., HIERLIHY L., COLLINS, P. (1991) Determination of domoic acid in serum and urine by immunochemical analysis. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47, 329-334.

NGUYEN A.L., LUONG J.H.T., MASSON C. (1990) Capillary electrophoresis for detection and quantitation of domoic acid in mussels. *Analytical Letters*, 23 (9), 1621-1634.

- NIEBA L., KREBBER A., PLUECKTHUN A. (1996) Competition BIAcore for measuring true affinities: Large differences from values determined from binding kinetics. *Anal. Biochem.*, 234, 155-165.
- NIESSNER R. (1994) Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry B5, VCH Cambridge, 140-153.
- NOVOTNY J., (1992) Specificity. *Encyclopedia of Immunology*, Vol. 3. Academic Press London.
- ODA M., AZUMA T. (2000) Reevaluation of stoichiometry and affinity/avidity in interactions between anti-hapten antibodies and mono- or multi-valent antigens. *Molecular Immunology*, 37 (18), 1111-1122.
- PADLAN, E.A., ABERGEL, C., TIPPER, J.P. (1995) Identification of specificity-determining residues in antibodies. *The FASEB Journal*, 9, 133-139.
- PAN Y., BATES S.S., CEMBELLA A.D. (1998) Environmental stress and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia*: a physiological perspective. *Natural Toxins*, 6, 127-135.
- PAN Y., RAO D.V.S., MANN K.H., LI W.K.W., HARRISON W.G. (1996a) Effects of silicate limitation on production of domoic acid, a neurotoxin, by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. II. Continuous culture studies. *Marine Ecology Progress Series*, 131, 235-234.
- PAN Y., RAO D.V.S., MANN K.H. (1996b) Changes in domoic acid production and cellular chemical compositions of the toxigenic diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* under phosphate limitation. *Journal of Phycology*, 32, 371-381.
- PATEL R., BROWN J. C. (1984) Hybridoma preservation at -70 °C: a simple and economical procedure for the short-term storage and individual recovery of hybridomas. *Journal of Immunological Methods*, 71, 211-215.

PENG Y.G., TAYLOR T.B., HINCH R.E., SWITZER R.C., RAMSDELL J.S. (1994) Neuroexcitatory and the neurotoxic actions of the amnesic shellfish poison, domoic acid. *Neuropharmacol. Neurotoxicol*, 5, 981-985.

PETERS J.H., BAUMGARTEN H. (1990) *Monoklonale Antikörper*. Springer Verlag Berlin.

PLEASANCE S., XIE M., LEBLANC Y., QUILLIAM, M.A. (1990). Analysis of domoic acid and related compounds by mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry as N-trifluoroacetyl-O-silyl derivatives. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, 19,420-427.

POCKLINGTON R., MILLEY J.E., BATES S.S., BRD C.J., DE FREITAS A.S.W., QUILLAM M.A. (1990). Trace determination of domoic acid in seawater and plankton by high-performance liquid chromatography of the fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC) derivative. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 38, 351-368.

PORSTMANN T., KIESSIG S.T. (1992) Enzyme immunoassay techniques. *Journal of Immunological Methods*, 150, 5-21.

PROSKE D., HÖFLIGER M., SÖLL R.M., BECK-SICKINGER A.G., FAMULOK M. (2002) A Y2 Receptor Mimetic Aptamer Directed against Neuropeptide Y. *J. Biol. Chem.*, 277 (13), 11416-11422.

PULLEN S., HOCK B. (1995) Development of an enzyme immunoassay for the detection of pyrethroid insecticides – 1. monoclonal antibodies for allethrin. *Analytical letters*, 28, 765-779.

QUILLIAM M.A., SIM P.G., MCCULLOCH A.W., MCINNES A.G. (1989a). High-performance liquid chromatography of domoic acid, a marine neurotoxin, with application to shellfish and plankton. *Intern.J. Environ. Anal. Chem.*, 36,139-154.

QUILLIAM M.A., THOMSON B.A., SCOTT G.J., AND SIU K.W.M. (1989b). Ion-spray mass spectrometry of marine neurotoxins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 3, 145-150.

- QUILLIAM M.A., XIE M., HARDSTAFF W.R.. (1995) Rapid extraction and cleanup for liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted food. *J. AOAC Int.*, 78 (2), 543-554.
- QUILLIAM M.A., THOMAS K., WRIGHT J.L.C. (1998) Analysis of Domoic acid by thin-layer chromatography. *Natural Toxins*, 6, 147-152.
- RAMSEY U.P., DOUGLAS D.J., WALTER J.A., WRIGHT J.L.C. (1998) Biosynthesis of domoic acid by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseriata*. *Natural Toxins*, 6, 137-146.
- RATHJEN D.A., UNDERWOOD P.A, WHALLEY J.M. (1986) An evaluation of some in vivo immunization strategies for the production of monoclonal antibodies to insulin and ACTH. *J. Biol. Stand.*, 14, 1-14.
- RAYMOND Y., SUH M. (1986) Lymph node primary immunization of mice for the production of polyclonal and monoclonal antibodies. *J. Immunol. Meth.*, 93, 103-106.
- REHM, H. (1997) MALDI-TOF. *Laborjournal* 4/97, 13.
- RITTENBERG G. M.B., AMKRAUT A.A. (1966) Immunogenicity of trinitrophenyl- hemocyanin; production of primary and secondary anti-Hapten precipitins. *Journal of Immunology*, 97, 421-430.
- RITTENBURG J.H. (1991) Fundamentals of immunoassay. In: Development and application of immunoassay for food analysis. J.H. Rittenburg (Hrsg.), Elsevier applied Science, London, 29-57.
- RODBARD D. (1971) Statistical aspect of radioimmunoassay. Competitive protein binding assay. W. D. Odell, W. H. Daughaday, J. B. Lipincott, Philadelphia, 204-209.
- RODBARD D., HUTT D.M. (1974) Statistical analysis of radio immunoassays and immunoradiometric (labelled antibody) assay. *Radioimmunoassay and related procedures in Medicine* Vol. 1, International Atomic Energy Agency Wien, 165-192.

ROITT, I.M., BROSTOFF, J., MALE, D.K. (1995) Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart.

SATO, M.; NAKANO, T.; TAKEUCHI, M.; KANNO, N.; NAGASHI, E.; SATO, Y. (1996) Distribution of neuroexcitatory amino acids in marine algae. *Phytochemistry*, 42, 1595-1597.

SCHAAPER W.M.M., LANKHOF H., PUIJK W.C., MELOEN R.H. (1989) Manipulation of antipeptide immune response by varying the coupling of the peptide with the carrier protein. *Mol. Immunol.*, 26, 81-85.

SCHMIEDEBERG N. (2000) persönliche Mitteilung. Department für organische Chemie, TU München.

SEIFERT M. (1999) Bestimmung von Oestrogenen und Xenooestrogenen mit einem Rezeptorassay. Promotionsschrift an der Technischen Universität München.

SEPPÄLÄ I.J.T., SARVAS H., PETERFY H., MÄKELÄ O. (1981) The four subclasses of IgG can be isolated from mouse serum by using protein A-sepharose. *Scan. J. Immunol.*, 14, 335-342.

SHAMZUDDIN A.M., HARRIS C.C. (1983) Improved enzyme immunoassay using biotin-avidin-enzyme complex. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 107, 514-517.

SHERRY J.P. (1992) Environmental Chemistry: The Immunoassay Option. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 23, 217-300.

SKERRA A., PLÜCKTHUN, A. (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv-fragment in *Escherichia coli*. *Science*, 240, 1038-1041.

SMITH P.K., KROHN R.I., HERMANSON G.T., MALLIA A.K., GARTNER F.H., PROVENZANO M. D., FUJIMOTO E.K., GÖEKE N.M., OLSON B.J., KLENK D. C. (1985) Measurement of protein using Bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 76-85.

SMITH-GILL S.J. (1994) Protein epitopes: functional vs. structural definitions. *Research in immunology*, 145, 67-70.

SMITH D.S., KITTS D.D. (1994) A competitive enzyme-linked immunoassay for domoic acid determination in human body fluids. *Fd. Chem. Toxic.*, 32, 1147-1154.

SMITH D.S., KITTS D.D. (1995) Enzyme immunoassay for the determination of domoic acid in mussel extracts. *J. Agric. Food. Chem.*, 43, 367-371.

SPITZ M., SPITZ L., THORBE R., EUGUI E. (1984) Intrasplenic primary immunization for the production of monoclonal antibodies. *J. Immunol. Meth.*, 70, 39-43.

STÄHLI C., STAEHELIN T., MIGGIANO V., SCHMIDT J., HÄRING, P. (1980) High frequencies of antigen-specific hybridomas; dependence on immunization parameters and prediction by spleen cell analysis. *Journal of Immunological Methods*, 32, 297-304.

STENBERG E., PERSSON B., ROOS H., URBANICZKY C. (1991). *J. Coll. Interf. Sci.*, 143, 513-526.

STÖCKLEIN W.F.M., BEHRING O., SCHARTE G., MICHEEL B., BENKERT A., SCHÖBLER W., WARSINKE A., SCHELLER F.W. (2000) Enzyme kinetic assay with surface plasmon resonance (BIAcore) based on competition between enzyme and creatine antibody. *Biosensors & Bioelectronics*, 15, 377-382.

STRACHAN G., GRANT S.D., LEARMONTH D., LONGSTAFF M., PORTER A.J., HARRIS W.J. (1998) Binding characteristics of anti-atrazine monoclonal antibodies and their fragments synthesised in bacteria and plants. *Biosens. Bioelectron.*, 13, 665-673.

STRACHAN N.J., GRAY D.I. (1995) A rapid general method for the identification of PCR products using a fibre-optic biosensor and its application to the detection of *Listeria*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 21 (1), 5-9.

STRASBURGER E. (1997) *Lehrbuch der Botanik*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

THIBAUT P., QUILLIAM M.A., JAMIESON W.D., BOYD R.K. (1989). Mass spectrometry of domoic acid, a marine neurotoxin. *Biomed. Env. Mass Spectrom.*, 18, 373-386.

- TOTH L.A., DUNLAP A.W., OLSON G.A., HESSLER J. R. (1989) An evaluation of distress following intraperitoneal immunization with freund's adjuvant in mice. *Laboratory animal Science*, 39, 122-126.
- TREBAK M., CHONG J.M., HERLYN D., SPEICHER D.W. (1999) Efficient laboratory-scale production of monoclonal antibodies using membrane-based high-density cell culture technology. *J. Immunol. Meth.*, 230, 59-70.
- ULRICH P., WELLER M., WEIL J., NIEBNER R. (1991) Optimierung der immunologischen Bestimmung von Triazinherbiziden im Wasser mit Hilfe unterschiedlicher Enzymtracer. *Vom Wasser*, 78, 251-266.
- USAGAWA T., NISHIMURA M., ITOH Y., UDA T., YASUMOTO T. (1989) Preparation of monoclonal antibodies against okadaic acid prepared from the sponge *Halichondria okadai*. *Toxicol.*, 27, 1323-1330.
- VAN APELDOORN M.E, VAN EGMOND H.P., SPEIJERS G.J.A. (1999) Amnesic shellfish poisoning-A review. RIVM report 388802019, Niederlande
- VAN DOLAH F.M., LEIGHFIELD T.A., RAMSDELL J.S. (1997) A microplate receptor assay for the amnesic shellfish poisoning toxin, domoic acid, utilizing a cloned glutamate receptor. *Anal. Biochem.*, 245, 102-105.
- VAN EMON J.M., LOPEZ-AVILA V. (1992) Immunochemical methods for environmental analysis. *Analytical Chemistry*, 64, 79A-88A.
- VAN OSS C.J. (1992) Antibody-antigen intermolecular forces. *Encyclopedia of Immunology*, Vol. 1. Academic Press London.
- WEBSTER D.M., HENRY A.H., REES A.R. (1994) Antibody-Antigen Interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 4, 123-129.

WEILER E.W. (1989) Immunoassay for the quantification of low molecular weight compounds. In: Chemistry of Plant Protection, Vol 3, G.Hang, H.Hoffmann (eds.), Springer Berlin, Heidelberg, 145-220.

WEINAND R.G. (1990) Somatic mutation, affinity maturation and the antibody repertoire: a computer model. *Journal of Theoretical Biology*, 143, 343-382.

WENGATZ I., SCHMID R.D., KREISSIG S., WITTMANN C., HOCK B., INGENDOH A., HILLENKAMP F. (1992) Determination of the hapten density of immunoconjugates by matrix-assisted UV laser desorption ionization mass spectrometry. *Analyt. Lett.*, 25, 1983-1997.

WHYTE J.N.C. (2001) Proceedings of the seventh Canadian workshop on harmful marine algae. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 2386: 2386 xiii + 158p., 82-84.

WIESMANN R., MAIER S.T., MARX U., BUCHHOLZ R. (1994) Charakterisation of oxygen transfer in a membrane-aerated hollow-fibre bioreactor using modified microcoaxial needle electrodes. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 41, 531-536.

WILSON K., GOULDING, K.H. (1991) *Methoden der Biochemie*. Thieme-Verlag, Stuttgart.

Wilson R.W. (1988) Monoclonal antibodies exhibiting polyspecific reactivity: An overview. *Journal of Clinical Immunoassay*, 11, 41-47.

WINKELMAIR M., WELLER M.G., MANGLER J., SCHLOSSHAUER B., NIESSNER R. (1997) Development of a highly sensitive enzyme-immunoassay for the determination of triazine herbicides. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 358, 614-622.

WITTMANN C., HOCK B. (1989) Improved enzyme immunoassay for the analysis of s-triazines in water samples. *Food and Agricultural Immunology*, 1, 211-224.

WOOD R.W. (1902). On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. *Phil. Mag.*, 4, 396-402.

WÜST S., HOCK B. (1992) A sensitive enzyme immunoassay for the detection of atrazine based upon sheep antibodies. *Anal. Letters*, 25, 1025-1037.

ZECK A (2001). Entwicklung von immunanalytischen, chromatographischen und massenspektrometrischen Methoden zur Bestimmung cyanobakterieller Hepatotoxine (Microcystine und Nodularine). Promotionsschrift an der TU München.

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. Bertold Hock für die Überlassung des Themas, die fachliche Unterstützung, die stete Diskussionsbereitschaft sowie für die Möglichkeit, meine Arbeit auf Tagungen zu präsentieren.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. P.-D. Hansen und Dr. H. Dizer, TU Berlin für die Bereitstellung der exponierten Muschelproben. Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. B. Lukas, TU Jena, für die Bereitstellung von Muschelhomogenaten.

Auch möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Kessler und Herrn Dr. N. Schmiedeberg, TU München für ihre Unterstützung bei den Konjugatsynthesen bedanken.

Ferner bedanke ich mich bei Frau Dr. I. Tóhill, Frau M. Lotierzo und Frau I. Chianella, Cranfield University, England, für die Möglichkeit, BIAcore-Messungen am Cranfield Biotechnology Centre in Silsoe durchzuführen.

Bei Herrn Prof. Skerra und Herrn Dr. Winkler möchte ich mich für die Konjugatmessung mit MALDI-TOF-MS bedanken.

Mein besonderer Dank gilt allen Kolleginnen und Kollegen, insbesondere Herrn R. Lausterer, Herrn Dr. K. Kramer, Herrn Dr. J. Böhm, Herrn Dr. M. Seifert, Frau D. Rau, Frau I. Scholz und Frau M. Krötz für die gute Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima.

Meinen Eltern, meinen Großeltern und allen Freunden danke ich für ihre stete Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Ein besonders herzlichen Dank gilt meiner Freundin Anja, die durch ihre Aufmunterung und Geduld zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Auch möchte ich mich bei Frau C. Dinter für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt auch der Europäischen Union, die durch die Finanzierung die Erstellung dieser Arbeit ermöglichte.

Lebenslauf

Name: Matthias Uwe Kania
geboren am: 15.04.1972
geboren in: Coburg
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1978-1982: Grundschule Sonnefeld

1982-1991: Gymnasium Ernestinum Coburg
(Abschluss: Allgemeine Hochschulreife)

Wehrdienst

1991-1992 Nachschubkompanie 120, Amberg

Studium

1992-1998: Studium der Gartenbauwissenschaften, TU München, Weihenstephan
(Abschluss: Diplom Agraringenieur Univ.)

Januar 1999

bis März 2002: wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Zellbiologie, Prof. Dr. Hock, Freising-Weihenstephan. Während dieser Zeit wurde die vorliegende Dissertation angefertigt.