

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

**Monoklonale Antikörper zum Nachweis
von 2,4,6-Trichloranisol in Kork**

Ralph Lausterer

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 27.03.2002 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt am 27.06.2002 angenommen.

| | | |
|-----------|--|-----------|
| I | <u>Einleitung</u> | 1 |
| 1.1 | Entstehung von TCA | 1 |
| 1.2 | TCA-Eintrag in Wein | 2 |
| 1.3 | Ersatz für Kork | 3 |
| 1.4 | Lösungen für das TCA-Problem | 3 |
| 1.5 | Immunologische Grundlagen | 6 |
| 1.5.1 | Antikörper | 6 |
| 1.5.2 | Antikörper-Antigen-Reaktion | 7 |
| 1.5.3 | Herstellung von Antikörpern | 8 |
| 1.5.4 | Immunochemische Methoden | 11 |
| 1.5.5 | Immunassays | 11 |
| 1.6 | Zielsetzung | 12 |
| II | <u>Material und Methoden</u> | 14 |
| 2.1 | Material | 14 |
| 2.1.1 | Allgemeine Chemikalien | 14 |
| 2.1.2 | Immunreagenzien | 15 |
| 2.1.3 | Chromatographiereagenzien | 15 |
| 2.1.4 | Zellkulturmedien | 15 |
| 2.1.5 | Pufferlösungen | 17 |
| 2.1.6 | Verbrauchsmaterial | 18 |
| 2.1.7 | Geräte und sonstige Bedarfsgegenstände | 19 |
| 2.2 | Methoden | 21 |
| 2.2.1 | Konjugat-Synthese | 21 |
| 2.3 | Konjugat-Charakterisierung | 24 |
| 2.3.1 | Bestimmung des Proteingehalts | 24 |
| 2.3.2 | Bestimmung des TCA-Gehalts | 24 |
| 2.3.3 | Bestimmung der Hapten-Dichte | 25 |
| 2.4 | Herstellung polyklonaler Antikörper | 25 |
| 2.5 | Zellkultur | 26 |
| 2.6 | Herstellung monoklonaler Antikörper | 26 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.6.1 | Immunsisierung | 26 |
| 2.6.2 | Gewinnung der Milzzellen | 28 |
| 2.6.3 | Zellfusion | 28 |
| 2.6.4 | HAZ-Selektion | 29 |
| 2.6.5 | Screening | 30 |
| 2.6.6 | Klonierung | 32 |
| 2.6.7 | Massenproduktion von monoklonalen Antikörpern | 33 |
| 2.6.8 | Einfrieren und Auftauen von Zellen | 36 |
| 2.6.9 | Subklassenbestimmung | 37 |
| 2.7 | Reinigung und Konzentrierung monoklonaler Antikörper | 38 |
| 2.7.1 | Aufreinigung über Prosep A | 39 |
| 2.7.2 | Aufreinigung über Protein A-Agarose | 39 |
| 2.7.3 | Bestimmung der Antikörperkonzentration | 40 |
| 2.7.4 | ELISA-Entwicklung | 41 |
| 2.7.5 | Kompetitiver ELISA mit Hapten A-spezifischen monoklonalen Antikörpern | 42 |
| 2.7.6 | Kompetitiver ELISA mit Hapten B-spezifischen monoklonalen Antikörpern | 43 |
| 2.7.7 | Kompetitiver ELISA mit Hapten C-spezifischen monoklonalen Antikörpern | 44 |
| 2.7.8 | Kompetitiver Hapten C-ELISA mit ABC-Amplifizierungssystem (Standardverfahren) | 45 |
| 2.7.9 | Auswertung der ELISAs | 47 |
| 2.8 | Kreuzreaktivität oder Querempfindlichkeit | 49 |
| 2.8.1 | Probenmessung | 49 |
| 2.8.2 | Weinproben | 50 |
| 2.8.3 | Korkproben | 50 |
| III | <u>Ergebnisse</u> | 51 |
| 3.1 | Konjugatcharakterisierung | 51 |
| 3.2 | Polyklonale Antikörper | 55 |
| 3.2.1 | Polyklonale Kaninchenantiseren | 55 |
| 3.2.2 | Polyklonale Mausantiseren | 56 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| | 3.3 Monoklonale Antikörper | 59 |
| | 3.3.1 Screening | 60 |
| | 3.3.2 ELISA-Entwicklung mit monoklonale Antikörper gegen Hapten A | 60 |
| | 3.4 Entwicklung eines TCA-ELISAs mit dem monoklonalen Antikörper Rami | 62 |
| | 3.4.1 Optimierter TCA-ELISA für Hapten C-spezifische mAk | 64 |
| | 3.4.2 Ethanolverträglichkeit | 65 |
| | 3.4.3 TCA-ELISA mit Verstärkersystem | 66 |
| | 3.4.4 Kreuzreaktivitäten | 68 |
| | 3.5 Entwicklung eines TCA-ELISAs mit dem Hapten B-spezifischen monoklonalen Antikörper Hbab | 69 |
| | 3.5.1 Optimierter TCA-ELISA mit dem monoklonalen Antikörper Hbab | 72 |
| | 3.5.2 Kreuzreaktivitäten des monoklonalen Antikörper Hbab | 73 |
| | 3.5.3 Ethanolverträglichkeit | 74 |
| | 3.6 Probenmessung mit dem mAk Rami und Hbab | 75 |
| | 3.7 Massenproduktion | 76 |
| | 3.7.1 Massenproduktion von Hapten B-spezifischen monoklonalen Antikörpern | 77 |
| | 3.7.2 Massenproduktion von Hapten C-spezifischen monoklonalen Antikörpern | 77 |
| | 3.7.3 Aufreinigung monoklonaler Antikörper | 79 |
| IV | <u>Diskussion</u> | 82 |
| | 4.1 Immunkonjugate und Immunisierung | 82 |
| | 4.2 Fusion und Zellkultur | 85 |
| | 4.3 Screening und Klonierung | 87 |
| | 4.4 Monoklonaler Antikörper gegen Hapten A | 88 |
| | 4.5 Massenproduktion monoklonaler Antikörper | 88 |
| | 4.6 Aufreinigung monoklonaler Antikörper | 89 |
| | 4.7 Charakterisierung monoklonaler Antikörper | 90 |
| | 4.8 Schlussbemerkung | 95 |

| | | |
|----------|-------------------------------|------------------|
| V | <u>Zusammenfassung</u> | <u>97</u> |
|----------|-------------------------------|------------------|

| | | |
|-----------|-------------------------|------------------|
| VI | <u>Literatur</u> | <u>98</u> |
|-----------|-------------------------|------------------|

Abbildungen

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Entstehungsmöglichkeiten für TCA | 2 |
| Abbildung 2: Schematische Darstellung der Herstellung monoklonaler Antikörper | 10 |
| Abbildung 3: Schematische Kopplung von TCA-Haptenen an Trägerproteine | 22 |
| Abbildung 4: 2,4,6-Trichloranisol (TCA), Hapten A, Hapten B und Hapten C | 23 |
| Abbildung 5: Screeningverfahren für TCA-spezifische monoklonale Antikörper | 31 |
| Abbildung 6: Darstellung des Fermenters CL 350 a) und des Fermenters Miniperm b) | 34 |
| Abbildung 7: TCA-ELISA mit monoklonalen Antikörpern | 42 |
| Abbildung 8: TCA-ELISA mit Verstärkersystem | 47 |
| Abbildung 9: MALDI-TOF-Analyse von BSA-Hapten C und –Hapten A Konjugaten im Vergleich zu reinem BSA | 53 |
| Abbildung 10: TCA-ELISA mit einem polyklonalen Kaninchenantiserum | 56 |
| Abbildung 11: TCA-ELISA mit einem polyklonalen Mousantiserum (Immunisierung mit Hapten A) | 57 |
| Abbildung 12: TCA-ELISA mit einem polyklonalen Mousantiserum (Immunisierung mit Hapten C) | 57 |
| Abbildung 13: TCA-ELISA mit einem polyklonalen Mousantiserum (Immunisierung mit Hapten B) | 58 |
| Abbildung 14: TCA-ELISA mit mAk gegen Hapten A | 61 |
| Abbildung 15: Unterschiedliche Blockierungsmittel im TCA-ELISA mit dem mAk Rami | 63 |
| Abbildung 16: Optimierter TCA-ELISA mit dem mAk Rami | 64 |
| Abbildung 17: TCA-ELISA mit dem mAk Rami in PBS und in 10 % Ethanol | 65 |
| Abbildung 18: TCA-ELISA mit dem mAk Rami und TCA in 1 und 5 % Ethanol | 66 |
| Abbildung 19: TCA-ELISA mit Verstärkersystem | 67 |
| Abbildung 20: TCA-ELISA mit Verstärkersystem | 67 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 21: TCA-ELISA mit dem mAk Hbab und OVA und Gelatine als Blockierungsmittel | 70 |
| Abbildung 22: TCA-ELISA mit dem mAk Hbab und OVA in verschiedenen Konzentrationen | 70 |
| Abbildung 23: TCA-ELISA mit dem mAk Hbab in zwei unterschiedlichen Verdünnungen | 71 |
| Abbildung 24: TCA-ELISA mit dem mAk Hbab und dem Sekundärantikörper in zwei verschiedenen Verdünnungen | 72 |
| Abbildung 25: Optimierter TCA-ELISA mit dem mAk Hbab | 73 |
| Abbildung 26: TCA-ELISA mit dem mAk Hbab in verschiedenen Ethanolkonzentrationen | 74 |
| Abbildung 27: Massenproduktion des mAk Rami im Biofermenter Miniperm | 78 |
| Abbildung 28: Massenproduktion des mAk Rami im Biofermenter Cl 350 | 78 |
| Abbildung 29: Photometrische Bestimmung des Proteingehaltes während der Aufreinigung von Zellkulturüberstand aus serumfreien Medium (a) und Normalmedium (b) | 80 |
| Abbildung 30: SDS-Gel mit dem mAk Rami und Hbab | 81 |

Tabellen

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Methoden zur Erkennung von TCA (GC/MS = Gaschromatographie mit Massenspektrometrie) | 5 |
| Tabelle 2: Immunisierungsschema für Mäuse mit KLH-Hapten A, B oder C | 27 |
| Tabelle 3: Molekulargewicht von KLH und BSA | 51 |
| Tabelle 4: Chloranalyse von BSA-Hapten A, KLH-Hapten A und –Hapten C | 52 |
| Tabelle 5: Theoretische Haptendichten für BSA-Hapten A und KLH-Hapten A | 52 |
| Tabelle 6: Bestimmung der Hapten-Dichte mit MALDI-TOF | 54 |
| Tabelle 7: Proteingehalt verschiedener Konjugate | 55 |
| Tabelle 8: Anzahl immunisierter und fusionierter Mäuse | 56 |
| Tabelle 9: Kreuzreaktivitäten des mAk Rami | 68 |
| Tabelle 10: Kreuzreaktivitäten des mAk Hbab | 73 |
| Tabelle 11: Wiederfindung von TCA bei der Messung von Weinproben mit dem mAk Rami und Hbab (Mittelwerte mit Standardabweichung $n = 3$) | 75 |

| | | |
|-------------|---|----|
| Tabelle 12: | Wiederfindungsraten von TCA bei einer Messung von Korkproben mit dem mAk Hbab | 76 |
| Tabelle 13: | 20tägige Massenproduktion des mAk Hbab im Biofermenter Miniperm | 77 |
| Tabelle 14: | Vergleich der Massenproduktion in Miniperm und Cl 350 nach 16 Tagen Kulturdauer des mAk Rami | 79 |

Abkürzungen

| | |
|-------|---|
| A | Absorption |
| ABC | (Strept-)Avidin-Biotin-Komplex |
| Ak | Antikörper |
| BCA | Bicinchinonsäure |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| CARD | catalyzed reporter deposition |
| cFA | komplettes Freund's Adjuvans |
| Da | Dalton |
| DCC | N, N'-Dicyclohexylcarbodiimid |
| dest. | destilliert |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| Fc | konstanter Teil des Antikörpers |
| FKS | Fötales Kälberserum |
| GC | Gaschromatographie |
| h | Stunde |
| H | Hypoxanthin |
| HAZ | Hypoxanthin-Azaserin |
| HGPRT | Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase |
| IA | Immunassay |
| IFA | unkomplettes Freund's Adjuvans |
| Ig | Immunglobulin |
| kDa | Kilodalton |
| KLH | Hämocyanin (Keyhole Limpet Hemocyanin) |
| KR | Kreuzreaktivität |
| l | Liter |
| mAk | monoklonale Antikörper |
| min | Minuten |
| MMP | Magermilchpulver |
| MS | Massenspektrometrie |
| NHS | N-Hydroxysuccinimid |
| NM | Normalmedium |
| OVA | Hühner-Ovalbumin |

| | |
|-----------|--|
| pAk | polyklonale Antikörper |
| PBS | Phosphatgepufferte Kochsalzlösung |
| PCP | Pentachlorphenol |
| PEG | Polyethylenglykol |
| POD | Meerrettichperoxidase |
| RPMI 1640 | Grundmedium für die Zellkultur („Roswell Park Memorial Institute“) |
| Rt | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SFM | Serumfreies Medium |
| TCA | 2,4,6-Trichloranisol |
| TCP | 2,4,6-Trichlorphenol |
| TMB | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan |
| U | Umdrehungen |
| ZKÜ | Zellkulturüberstand |

I Einleitung

2,4,6-Trichloranisol (TCA) ist für Kontaminationen in unterschiedlichen Lebensmitteln verantwortlich ist. TCA führt zu einer negativen geschmacklichen Beeinflussung, zu einem muffigen Geschmack. Die menschlichen Geschmacksnerven sind sehr empfindlich für TCA. So liegt die sensorische Nachweisgrenze einiger Weintester bei 4 ng/l TCA. Ungeübte Weintrinker sind nicht so empfindlich für TCA. Sie sind nicht in der Lage eine Konzentration von 4 ng/l TCA zu erkennen. 4 ng/l (Amon *et al.*, 1989) bis 10 ng/l TCA (Tanner *et al.*, 1981) können in Weißweinen den Geschmack beeinflussen. In Rotweinen können aber auch erst 50 ng/l zu Auswirkungen auf die Geschmacksnerven führen.

Einige Lebensmittel, die mit TCA verunreinigt sein können, sind Rosinen, essentielle Öle, Trinkwasser, in Flaschen abgefülltes Mineralwasser, Bier und Wein. (Stoffelsma und de Roos, 1973; Karlsson *et al.*, 1995; Aung *et al.*, 1996; Fischer und Fischer, 1997). Verunreinigt TCA Wein, so wird von Korkgeschmack gesprochen. TCA ist in 80 % der Fälle für den Korkgeschmack im Wein verantwortlich (Buser *et al.*, 1982). TCA ist aber nicht die einzige Substanz, die Korkgeschmack bewirkt. Andere Chloranisole, Chlorphenole und Guaiacal haben ähnliche Effekte.

TCA kann nicht nur in Lebensmitteln, sondern auch auf Verpackungen oder in Korkverschlüssen auftreten (Tindale *et al.*, 1989; Howland *et al.*, 1997). Von dort kann es in die Lebensmittel und in den Wein gelangen.

TCA führt durch Kontaminationen zu hohen Verlusten in den betroffenen Industrien. So verursacht TCA in der weltweiten Weinindustrie jährliche Verluste von bis zu einer Milliarde € Es sind 0,5 % bis 2 % aller europäischen und 1 % bis 5,5 % aller australischen abgefüllten Weine von dem durch TCA hervorgerufenen Korkgeschmack betroffen.

1.1 Entstehung von TCA

Es sind mehrere Quellen von TCA bekannt. Abbildung 1 zeigt einige Entstehungsmöglichkeiten. Die häufigste Quelle von TCA ist die mikrobielle Umsetzung von Chlorphenolen. Für diese Umsetzung sind einige Pilzarten verantwortlich. Chlorphenole finden in der Landwirtschaft als Pestizide häufig Gebrauch. In der Verpackungsindustrie und in der Holz- und der Korkherstellung werden sie als Schutzmittel eingesetzt. Elementares Chlor kann aus der Kork- und Weinfassherstellung kommen. Kork unterliegt während seiner

Herstellung einer Chlorbleiche. Weinfässer aus Holz werden mit Hypochlorit gewaschen. Ein allgemeiner Grund für die TCA-Kontamination im Wein ist eine Verschmutzung des Weinkellers.

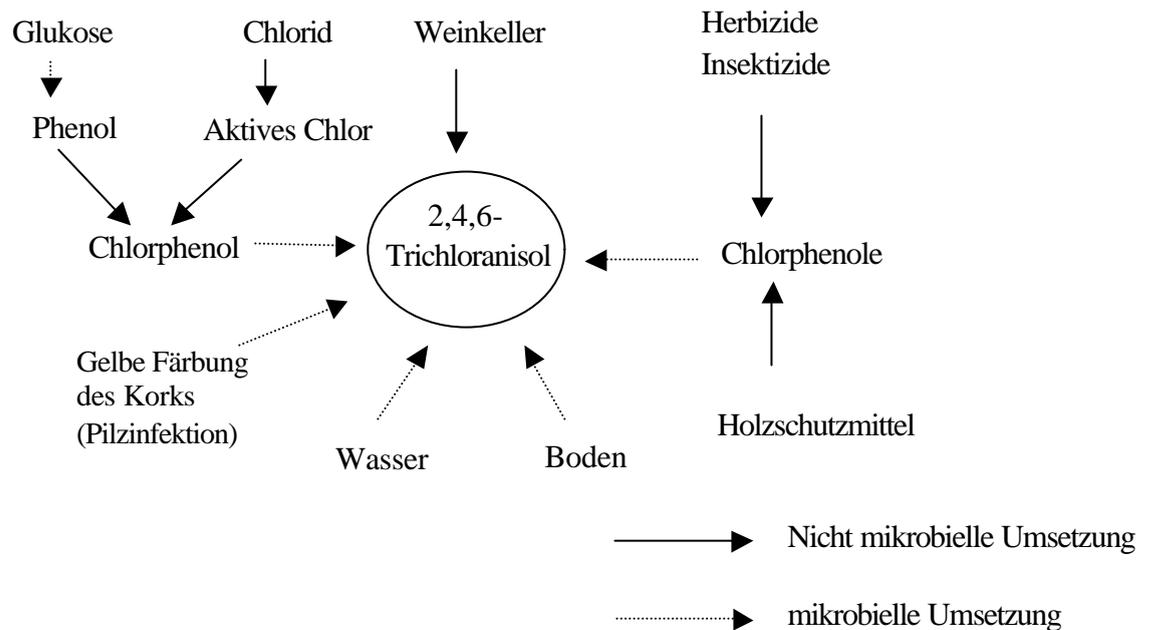


Abbildung 1: Entstehungsmöglichkeiten für TCA

TCA findet sich auf Korkeichen in nur geringen Konzentrationen. Je näher der Kork in Bodennähe gewachsen ist, desto mehr TCA ist vorhanden. Dies ist durch ein stärkeres mikrobielles Wachstum bedingt, das aufgrund höherer Feuchtigkeit in Bodennähe hervorgerufen wird. Befindet sich auf der Korkoberfläche jedoch eine „Gelbe Färbung“, die durch einen Pilz hervorgerufen wird, so steigt der TCA-Gehalt rapide an.

1.2 TCA-Eintrag in Wein

Der Korken ist eine Möglichkeit, um Wein mit TCA zu verunreinigen. TCA kann aus dem Korken in den Wein migrieren (Varea *et al.*, 2001). TCA wurde in Flaschen abgefüllten Weinen und in den dazu gehörenden Korken nachgewiesen. Der TCA-Gehalt dieser Weine, der TCA-Gehalt der dazu gehörigen Korken und die Intensität des Korkgeschmacks waren

direkt korreliert (Pena-Neira *et al.*, 2000 b). Jedoch wurde TCA auch in mit Schraubverschlüssen versiegelten Weinen entdeckt. Dieses TCA gelangte vor der Abfüllung wahrscheinlich durch Eichenfässer in den Wein. Allgemein können Eichenfässer mit TCA verunreinigt sein. TCA kann aber auch aus der Atmosphäre des Weinkellers und von Trauben in den Wein gelangen.

1.3 Ersatz für Kork

Da TCA Verluste von bis zu einer Milliarde € pro Jahr verursacht, wurden Wege gesucht, diese Verluste zu minimieren. Die einfachste Möglichkeit, den Großteil der TCA-Kontaminationen zu vermeiden ist, die Verwendung anderer Verschlüsse für Wein. Dagegen sprechen einige Gründe. So wird Kork seit dem 17. Jahrhundert als Weinverschluss eingesetzt, da er einzigartige physiologische Eigenschaften besitzt. Er bleibt lang andauernd sehr flexibel, ist hydrophob und gasundurchlässig.

Der Verbraucher verbindet mit gutem Wein den Korkverschluss. Desweiteren hat ein Korken nicht nur negative Effekte auf den Wein. Er kann Substanzen abgeben, die den Geschmack des Weins positiv beeinflussen.

Der wohl wichtigste Grund, nicht auf Korken zu verzichten, ist die Korkeiche. In den Ländern, in denen sie beheimatet ist, vor allem Portugal, spielt sie ökologisch und ökonomisch eine sehr wichtige Rolle. Sie wirkt der Desertifikation entgegen. Die Korkeiche ist der ideale Baum für diese Regionen. Durch seine dicke Rinde ist er in der Lage, Waldbrände zu überstehen. Unter ökonomischen Aspekten betrachtet, hängt ein ganzer Industriezweig an der Korkherstellung. Neben dem Portwein war Kork das Hauptexportgut Portugals.

1.4 Lösungen für das TCA-Problem

Aufgrund der enormen Verluste, die jährlich durch TCA hervorgerufen werden, ist es verständlich, dass verschiedene Verfahren entwickelt worden sind, um TCA-Kontaminationen zu vermeiden oder ihnen entgegen zu wirken. So wurde der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln in den Korkeichenwäldern innerhalb der Europäischen Union untersagt. In der Herstellung der Korkverschlüsse wird auf den Einsatz von chlorhaltigen Verbindungen verzichtet. Die Chlorbleiche wurde durch eine Peroxidbleiche ersetzt. Trotz dieser Maßnahmen treten immer noch TCA-Kontaminationen auf, die zu den oben erwähnten

Verlusten führen. Eine weitere Option zur Vermeidung von TCA-Kontaminationen ist die Erkennung verunreinigter Korkchargen. Es gibt mehrere Verfahren zur Erkennung von TCA. Das gebräuchlichste Analyseverfahren für TCA ist die Gaschromatographie. Pollnitz *et al.* (1996) entwickelte eine Kapillargaschromatographie zur quantitativen Bestimmung von TCA. Mit diesem Verfahren konnten bis zu 0,5 ng/l TCA nachgewiesen werden. Der gaschromatographischen Quantifizierung geht eine TCA-Extraktion aus der Probe voraus. Ein lösungsmittelfreies Verfahren zur Extraktion von TCA ist die Festphasenmikroextraktion. Mit dieser Methode und anschließender Gaschromatographie konnten bis zu 2,9 ng/l TCA nachgewiesen werden (Fischer und Fischer, 1997).

Eine Methode, die auf die Erkennung einzelner TCA-verunreinigter Korkchargen verzichtet, ist eine Mikrowellenbehandlung (Delfin-Methode, Herstellerangabe). Bei diesem Verfahren wird der ganze zu verarbeitende Kork in einen Ofen gegeben und dort Mikrowellen ausgesetzt. Dadurch verdampft das eventuell vorhandene TCA fast vollständig. Nach Ansicht vieler Kork- und Weinproduzenten handelt es sich nach vollzogener Behandlung jedoch nicht mehr um Kork im eigentlichen Sinne. Dieser Kork hätte keine positiven Effekte mehr auf den von ihm verschlossenen Wein (Gespräch im Jahr 2000 mit Nuno Nunes, leitender Angestellter bei Alvaro Coelho & Irmaos, einem der weltweit größten Korkproduzenten).

Eine ähnliche Methode ist die Dampfdeodorisation. Der Kork wird in einen geschlossenen Behälter gegeben. Anschließend wird Wasserdampf hinzugefügt. Der Wasserdampf erwärmt den Kork und nimmt die geschmacksbeeinflussenden Stoffe wie TCA auf. Anschließend wird der Wasserdampf entfernt (Konishi *et al.*, 1992).

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die verschiedene Arbeiten zur Bestimmung von TCA. Bei den eingesetzten Verfahren handelte es sich jeweils um Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC/MS).

Tabelle 1: Methoden zur Erkennung von TCA (GC/MS = Gaschromatographie mit Massenspektrometrie).

| Jahr | Methode | Author |
|------|---------|--------------------------------------|
| 1973 | GC/MS | Stoffelsma und de Roos, (1973). |
| 1982 | GC/MS | Buser <i>et al.</i> , (1982). |
| 1996 | GC/MS | Pollnitz <i>et al.</i> , (1996). |
| 1996 | GC/MS | Aung <i>et al.</i> , (1996). |
| 1997 | GC/MS | Fischer und Fischer, (1997). |
| 2000 | GC/MS | Pena-Neira <i>et al.</i> , (2000 b). |
| 2000 | GC/MS | Taylor <i>et al.</i> , (2000). |

Wie aus der vorherigen Tabelle ersichtlich, handelt es sich bei allen beschriebenen Verfahren zur TCA-Bestimmung um Gaschromatographie, die mit Massenspektrometrie gekoppelt ist. Ziel dieser Arbeit war es, monoklonale Antikörper (mAk) gegen TCA zu gewinnen. Mit diesen mAk sollte ein Testsystem zur Bestimmung von TCA entwickelt werden. Das Testsystem sollte aus einem ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) bestehen. Ein solcher ELISA ist in der Lage, geringste Analytkonzentrationen zu erkennen. Es werden keine aufwendigen Laborausstattungen und -geräte benötigt. Dieser ELISA kann eine Alternative zu GC/MS darstellen. Die immunologischen Grundlagen und Immunassays werden in den nächsten Kapiteln beschrieben.

1.5 Immunologische Grundlagen

1.5.1 Antikörper

Antikörper (Ak) oder Immunglobuline (Ig) sind Teil der Immunantwort von Wirbeltieren auf in den Körper eindringende fremde Substanzen, die Antigene. Neben den T-Zell-Antigenrezeptoren sind sie die zweiten Erkennungsmoleküle der angepassten Immunantwort. Sie bilden eine Gruppe von Glykoproteinen, die im Serum und in der Körperflüssigkeit aller Säugetiere vorhanden ist. Ak werden in großen Mengen von Plasmazellen, den aktivierten B-Lymphozyten hergestellt. Die Ig werden in fünf verschiedene Klassen eingeteilt und zwar in IgG, IgA, IgM, IgD und IgE. Diese Klassen unterscheiden sich in der Größe, der elektrischen Ladung; der Zusammensetzung der Aminosäuren und in dem Kohlenhydratanteil. IgG ist das am häufigsten vorkommende Ig und macht 70-75 % des Gesamtbestandes der Immunglobuline aus (Roitt *et al.*, 1995). Unter anderen ist es aufgrund dieser Tatsache das in der Immunchemie am meisten verwendete Ig. IgG ist der wichtigste Antikörper der sekundären Immunantwort.

Bei IgG handelt es sich um ein Monomer mit einer Größe von ungefähr 146.000 Da (Janeway und Travers, 1997). Es wird wegen Unterschieden in der Zusammensetzung der Polypeptidketten in vier Subklassen unterteilt (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3). IgG setzt sich aus zwei schweren Ketten (H-Ketten), zwei leichten Ketten (L-Ketten) sowie zwei Kohlenhydratresten zusammen. Es kann durch Papain in der „Türangel-Region“ in drei Teile gespalten werden. Es entstehen zwei identische Stücke, die Antigen binden können (Fab-fragment antigen binding), und ein Stück, das keine Antigenbindungseigenschaften (Fc-Fragment crystallizable) besitzt. Sowohl die H-Ketten als auch die L-Ketten bestehen aus einem konstanten Teil sowie einem variablen Bereich. Im variablen und konstanten Teil der L-Kette befindet sich jeweils eine Disulfidbrücke. Die H-Kette besitzt ebenfalls eine Disulfidbrücke im variablen, jedoch drei Disulfidbrücken im konstanten Bereich. Diese Disulfidbrücken bilden Peptidschleifen mit einer Größe von 60-70 Aminosäurenresten. Die Peptidschleifen stellen den zentralen Anteil einer „Domäne“ dar. In der schweren und der leichten Kette entspricht die erste Domäne jeweils der variablen Region. Die Bereiche der variablen Regionen, die eine außerordentliche Unterschiedlichkeit in der Aminosäuresequenz besitzen, werden als hypervariable Regionen bezeichnet. Die hypervariablen Regionen bilden die Antigenbindungsstelle, das Paratop aus (Padlan, 1994). Nur wenige Aminosäuren des Paratops sind aber für den Kontakt mit dem Antigen verantwortlich (Padlan *et al.*, 1995).

Bei den anderen Ak handelt es sich um Ig der Klasse IgM, IgA, IgD und IgE. IgM macht 10 % der Ig aus. Es ist ein Pentamer und reagiert zuerst auf eindringende Stoffe. 15-20 % der Antikörper gehören der Klasse IgA an. Es kann als Mono- oder Dimer vorliegen. Es ist der vorherrschende Antikörper in seromukösen Sekreten wie Speichel und Milch. Die genaue Funktion von IgD ist noch nicht exakt geklärt. Es macht weniger als 1 % der Antikörper aus. IgE kommt hauptsächlich auf Oberflächenmembranen vor. Es kann Schleimhautoberflächen sensibilisieren und somit Allergien auslösen.

1.5.2 Antikörper-Antigen Reaktion

Nur das Paratop kommt mit dem Antigen in Kontakt. Es sind aber auch die anderen Bereiche der variablen Regionen, die für die Bindung mit dem Antigen verantwortlich sind. Auch umgekehrt kommt nicht das ganze Antigen mit dem Antikörper in Berührung. Nur Oberflächenstrukturen des Antigens, die antigenen Determinanten oder Epitope, mit einer Größe von 200-1.000 Da sind an der Antikörper-Antigen-Reaktion beteiligt. Diese Bindung erfolgt über die Ausbildung vieler nicht kovalenter Bindungen zwischen Antikörper und Antigen. Für diese nicht kovalenten Bindungen sind Wasserstoffbrücken, elektrostatische (Coulomb) Kräfte, van der Waals Kräfte, hydrophobe Kräfte und Ca^{2+} -Brücken verantwortlich (Van Oss, 1992). Die Summe dieser Kräfte ergibt eine beachtliche Bindungsenergie. Diese Kräfte sind abhängig von der Entfernung zwischen Antigen und Antikörper. So ist bei elektrostatischen Kräften die Bindungsenergie umgekehrt proportional zur siebten Potenz des Abstandes. Damit mehrere nicht kovalente Bindungen zustande kommen, müssen sich Paratop und Epitop eng gegenüberstehen. Die Elektronenwolken von Antikörper und Antigen dürfen sich nicht überlappen. Ihre Strukturen müssen ineinander passen. Ist dies nicht der Fall, treten Abstoßungskräfte auf, die umgekehrt proportional zur 12. Potenz des Abstandes sind. Diese anziehenden und abstoßenden Kräfte bestimmen die Spezifität des Antikörpers für ein Epitop (Roitt *et al.*, 1995). Es wird von Kreuzreaktivität gesprochen, wenn die Spezifität eines Antikörpers eingeschränkt ist, und dieser Antikörper auch andere Antigene erkennt. Diese Kreuzreaktivität kann durch gleiche Epitope auf unterschiedlichen Antigenen hervorgerufen werden. Sie kann aber auch auf dem Erkennen ähnlicher Substanzen beruhen.

Eine Antikörper-Antigen-Wechselwirkung ist also die Summe der anziehenden und abstoßenden Kräfte. Diese Summe beschreibt die Antikörperaffinität für ein Antigen. Da jede Antikörper-Antigen-Reaktion umkehrbar ist, lässt sich die Antikörperaffinität mit dem

Massenwirkungsgesetz berechnen. Die Affinität oder Gleichgewichtskonstante ergibt sich aus:

$$K = \frac{[AkAg]}{[Ak][Ag]}$$

| | |
|--------|--|
| K | = Gleichgewichtskonstante |
| [AkAg] | = Konzentration des Antikörper-Antigen-Komplexes |
| [Ak] | = Konzentration des freien Antikörpers |
| [Ag] | = Konzentration des freien Antigens |

Ein Hapten ist ein Molekül mit einer Größe unter 1.000 Da. Es besitzt im Gegensatz zu größeren Antigenen nur ein Epitop. Ein Molekül, das mehrere Epitope besitzt, kann also mit mehreren Paratopen reagieren, es ist multivalent. Es kann mehrere Bindungen mit einem Antikörper eingehen, der mehr als ein Paratop besitzt. Diese Bindungsenergie ist beträchtlich größer als die Summe der Bindungsenergien der einzelnen Antikörper-Antigen-Reaktion. Dies wird als Avidität bezeichnet. Die Avidität ist erheblich größer als die Affinität, wenn Antigen und Antikörper multivalent sind.

1.5.3 Herstellung von Antikörpern

Grundvoraussetzung der Herstellung von Antikörpern ist die Fähigkeit des Immunsystems, auf eindringende Stoffe zu reagieren. Ist ein Antigen größer als ungefähr 1.000 Da, bewirkt es eine Immunantwort, und Antikörper werden gebildet. Kleinere Moleküle wie TCA mit einem Molekulargewicht von 212 Da müssen, um immunogen zu wirken, an ein größeres Trägerprotein gekoppelt werden. Dies kann Rinderserumalbumin (BSA) oder Hämocyanin (KLH) sein. Hämocyanin ist ein Wasserschneckenprotein, das aufgrund seiner entfernten Verwandtschaft zum Säugetierorganismus gerne eingesetzt wird. Aber auch Haptene können in Ausnahmefällen immunogen wirken (Peters und Baumgarten, 1990). Es gibt drei unterschiedliche Verfahren Antikörper herzustellen. Das erste und einfachste Verfahren, ist die Herstellung polyklonaler Antikörper. Dazu wird ein Versuchstier mit einem Antigen über einen definierten Zeitraum immunisiert. Anschließend wird Blut entnommen, und das daraus gewonnene Serum steht für immunchemische Applikationen zur Verfügung. Dieses Serum enthält Antikörper gegen alle Antigene, mit denen das Tier jemals in Berührung gekommen ist. Es handelt sich um ein Serum mit polyklonalen Antikörpern.

Die neueste Methode zur Produktion von Antikörpern ist die Technik der rekombinanten Antikörper. Die Technik der rekombinanten Antikörper hat sich aus den chimären Antikörpern entwickelt. Mit dieser Methode lassen sich Antikörper auf Genebene verändern. Dies führt zu einer Veränderung der Spezifität und Affinität des Antikörpers. Desweiteren lassen sich Genbibliotheken erstellen, die ein größeres Antikörperrepertoire haben als ein Versuchstier. Somit lässt sich ganz auf den Einsatz von Tieren verzichten (Lerner *et al.*, 1992). Diese Ak können in Bakterien hergestellt werden. Dies wurde zuerst von Better *et al.* (1988) und Skerra und Plückthun (1988) beschrieben. Die hergestellten Antikörper besaßen aber eine unbekannte Spezifität.

Das Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper (mAk) wurde von Köhler und Milstein (1975) entwickelt. Dazu wird ein Versuchstier, in diesem Fall eine Maus, mit einem Antigen über einen definierten Zeitraum geimpft. Dies führt zu einer Vermehrung der durch dieses Antigen aktivierten B-Lymphozyten und zu einer starken Antikörperproduktion. Die Antikörperproduktion kann durch Blutabnahme und einen anschließenden Test überprüft werden.

Nach Abschluss der Immunisierungsphase werden die gesamten B-Lymphozyten entnommen (Abb. 2). Diese B-Zellen sind in der Zellkultur nur begrenzt lebensfähig. Deshalb werden sie mit Myelomzellen, Krebszellen des Immunsystems der Maus, fusioniert. Die Myelomzellen dürfen selbst keine Antikörper produzieren. Sie sind *in vitro* unbegrenzt lebensfähig. Diese Eigenschaft übernehmen auch die aus der Fusion entstandenen Hybridomzellen. Desweiteren erhalten sie von den B-Zellen die Fähigkeit der Antikörperproduktion. Nach einer Fusion liegen Hybridomzellen, mehrfach fusionierte Zellen, nicht fusionierte Myelomzellen und B-Lymphozyten vor. Mehrfach fusionierte Zellen und B-Zellen sterben bald ab. Hingegen wachsen Myelomzellen schneller als die antikörperherstellenden Hybridomzellen. Sie würden in kurzer Zeit die Hybridomzellen überwuchern und diese dadurch abtöten. Deshalb werden solche Myelomzellen eingesetzt, die über einen Defekt in ihrer Nukleinsäuresynthese verfügen. Ihnen fehlt das Enzym HGPRT (Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl Transferase). Bei blockiertem Hauptstoffwechselweg können sie ohne dieses Enzym kein Hypoxanthin nutzen und dadurch auch keinen Reservestoffwechselweg zur Nukleinsäuresynthese beschreiten. Wird HAZ-Medium (Medium mit Hypoxanthin und Azaserin) zugegeben, sterben die Myelomzellen ab. Azaserin unterbricht ihren Hauptstoffwechselweg. Nur die Hybridomzellen verbleiben in Kultur.

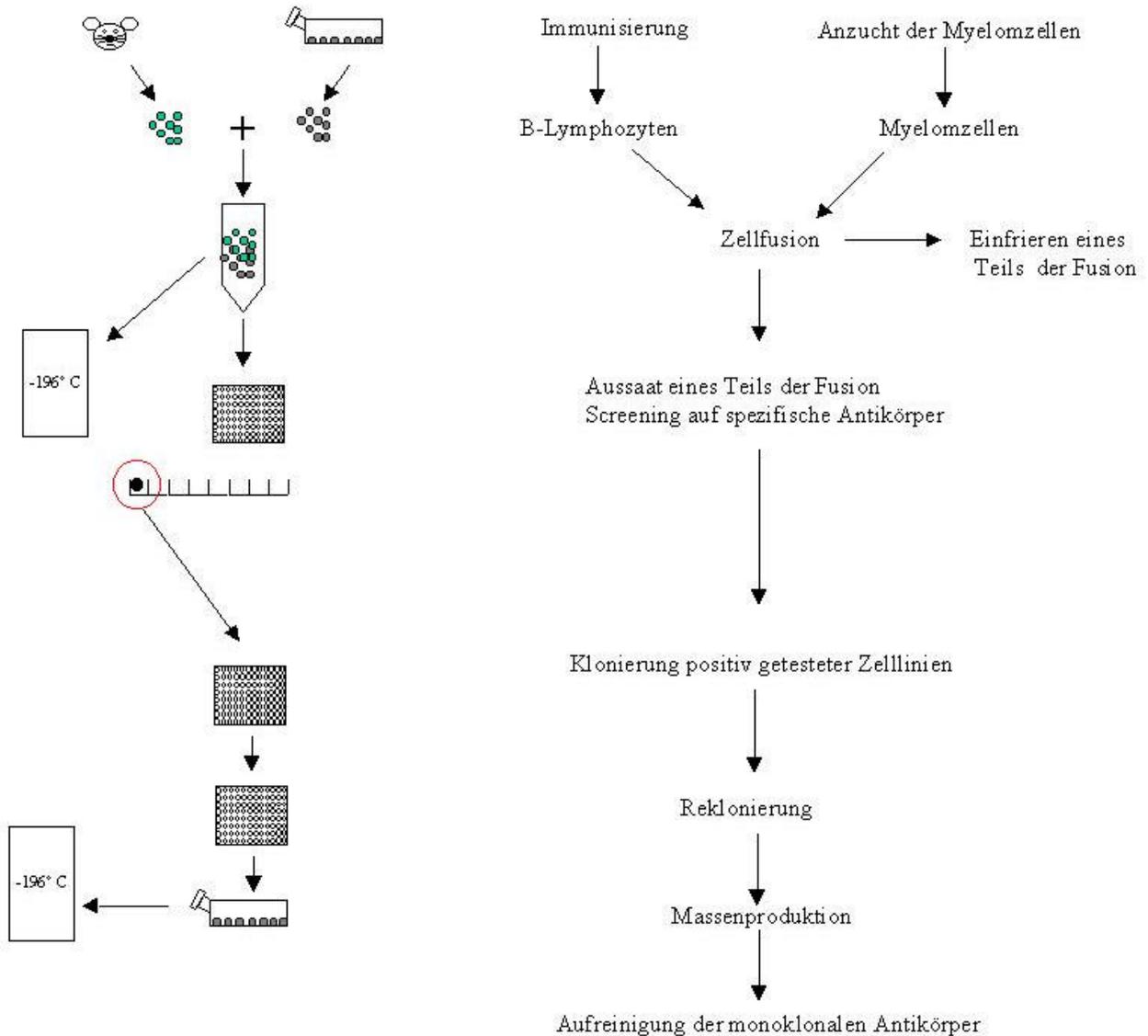


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Herstellung monoklonaler Antikörper.

Nun werden mit einem geeigneten Verfahren, dem Screening, die Zellen gesucht, die die gewünschten Antikörper herstellen. Sind diese gefunden, werden sie vereinzelt und kloniert. Aus einer einzigen Zelle entsteht eine identische Population, die Antikörper mit derselben Spezifität und Affinität, die monoklonalen Antikörper, produziert. Monoklonale Antikörper besitzen im Gegensatz zu polyklonalen Antikörpern eine einheitliche Affinität und können in unbegrenzten Mengen hergestellt werden.

1.5.4 Immunchemische Methoden

Voraussetzung aller immunchemischer Methoden ist es, über eine ausreichende Menge Antikörper mit hoher Spezifität und Selektivität für das gewünschte Antigen zu verfügen. Antikörper und Antigen reagieren spezifisch miteinander. Diese Interaktion zwischen Antikörper und Antigen ist die grundlegende Reaktion der immunchemischen Methoden. Handelt es sich bei dem Antigen um ein Hapten mit einer Größe von weniger als 1.000 Da, bindet der Antikörper das ganze Hapten. Reagiert ein Antikörper mit einem größeren Antigen, z.B. einem Protein, so interagiert er nur mit komplementären Strukturen des Proteins. Diese Reaktion zwischen Antikörper und Antigen lässt sich zur Quantifizierung geringer Konzentrationen des Antigens und zur Konzentrierung von Antigenen nutzen. In der heutigen Zeit werden verschiedenste immunologische Methoden angewendet. Zwei dieser Quantifizierungsmethoden sind der „Radio Immunoassay (RIA)“ und der „Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)“. Eine weitere Möglichkeit der Nutzung dieser Antikörper-Antigen-Interaktion ist die Aufkonzentrierung von Antigenen in einer Immunaффinitätschromatographie.

1.5.5 Immunassays

Grundlage aller Immunassays (IA) ist eine Antikörper-Antigen Reaktion. Diese Reaktion muss mit Hilfe einer Markierung sichtbar gemacht werden. Markiert werden häufig Analyten oder Sekundärantikörper. Dazu können unterschiedliche Substanzen verwendet werden, die zu unterschiedlichen Arten von IA führen. Es können Enzyme, Radioisotope oder Fluorochrome eingesetzt werden. Wird mit einem Enzym markiert, handelt es sich um einen ELISA. Das Enzym bewirkt einen Farbumschlag, der gemessen werden kann. Diese Art des IAs wurde erstmals 1971 von Engvall und Perlmann beschrieben. Eine andere Möglichkeit eines IAs ist der Radio Immunoassay (RIA). Bei diesem Versuchstyp werden radioaktive Markierungen eingesetzt. Diese Methode wurde 1959 zuerst von Yalow und Bearson praktiziert. Jedoch werden in den meisten Fällen Enzymmarkierungen eingesetzt, da sie sich einfacher handhaben lassen als radioaktive Markierungen. Bei den Enzymmarkierungen handelt es häufig um Meerrettichperoxidase, alkalische Phosphatase und β -Galactosidase

Grob lassen sich die ELISAs in homogene und heterogene ELISAs unterteilen. Beim homogenen ELISA erfolgt keine Trennung von gebundener und ungebundener Phase. Die Aktivität der Enzymmarkierung ist abhängig von der Antikörper-Antigen-Reaktion. Beim heterogenen ELISA erfolgt eine Phasentrennung. Eine Antikörper-Antigen-Bindung wird

indirekt dadurch sichtbar gemacht, dass die kovalent gekoppelten Enzyme aus einem farblosen Chromogen ein farbiges Reaktionsprodukt liefern, das photometrisch bestimmt werden kann.

Die heterogenen ELISAs werden weiter in direkte und indirekte ELISAs unterteilt. Beim direkten ELISA werden die Antigene oder die spezifischen Antikörper direkt mit einem Enzym markiert. Beim indirekten ELISA reagiert zuerst der Antikörper mit dem Antigen. Diese Bindung wird anschließend mit einem markierten Sekundärantikörper nachgewiesen. Konkurriert freies Antigen mit markiertem oder an die Platte gebundenem Antigen, so spricht man von einem kompetitiven ELISA. Zur Bestimmung unbekannter Proben muss im selben Test neben den Proben auch eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen aufgetragen werden. Anhand dieser Konzentrationen kann man Rückschlüsse auf die Konzentration der Proben ziehen und diese exakt bestimmen.

Üblicherweise wird ein Molekül Meerrettichperoxidase (POD) an einen Antikörper gekoppelt. Zu einem stärkeren Farbumsatz, bei gleicher Anzahl von Antikörper-Antigen-Reaktionen, kann die Verwendung eines Amplifizierungssystems führen. Eine Möglichkeit für ein solches System ist das Biotin-Avidin-System oder auch das Biotin-Streptavidin-System. Avidin und Streptavidin sind sehr ähnliche Moleküle. Avidin kommt im Eiweiß und Streptavidin bei *Streptomyces avidinii* vor. Beide Moleküle binden mit sehr hoher Affinität das Vitamin Biotin (Green, 1975) und besitzen dafür jeweils vier Bindungsmöglichkeiten (Diamandis und Christopoulos, 1991). Zur Amplifizierung wird (Strept)avidin mit einer genau definierten Menge von Biotin-POD inkubiert, so dass eine Bindungsstelle für Biotin in dem gebildeten Komplex nicht belegt ist. Dieser (Strept)avidin-Biotin-POD-Komplex kann nun in einem ELISA mit einem biotinierten Antikörper eine Bindung eingehen. Mit einem solchen Verstärkersystem kann die Nachweisgrenze eines ELISA verbessert werden.

1.6 Zielsetzung

Diese Arbeit war Teil des EU-Projektes „Tecacor: Entwicklung eines 2,4,6-Trichloranisol-Biodetektionssystems für Kork-, Wein- und andere Lebensmittelindustrien.“ Es sollten monoklonale Antikörper (mAk) zum Nachweis von TCA hergestellt und ELISAs mit diesen mAk entwickelt werden. Bis zu diesem Zeitpunkt waren keine immunchemischen Methoden oder auch ELISAs zur Bestimmung von TCA bekannt. ELISAs haben mehrere Vorteile gegenüber großtechnischen Verfahren wie GC-MS. Zur Messung ist keine sonderlich teure

Laboraausstattung von Nöten, und die Handhabung ist relativ einfach. Antikörper können eine hohe Affinität und Selektivität für den Analyten besitzen; somit kann daraus ein zuverlässiges Testverfahren aufgebaut werden. Mit einem ELISA auf einer 96er Mikrotiterplatte können einschließlich der Kalibrierkurven bis zu 10 Proben mit dreifacher Wiederholung bestimmt werden. Dies bietet die Möglichkeit, eine große Anzahl von Proben in relativ kurzer Zeit zu messen. Desweiteren können Testverfahren entwickelt werden, die Vorort eingesetzt werden können.

II Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Chemikalien

| | |
|---|-----------------------|
| 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) | Sigma, T-2885 |
| Bicinchinonsäure (BCA) | Sigma, B-9643 |
| Biotin-POD-Konjugat | Sigma, P-9568 |
| Borsäure | Merck, 1.00165 |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Merck, 1.02952 |
| 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 |
| Hämocyanin (KLH) | Roche, 1376320 |
| Harnstoffperoxid | Sigma, U-1753 |
| Hühner-Ovalbumin (OVA) | Sigma, A-5378 |
| Molekularsieb, 0,4 nm | Merck, 1.05707 |
| 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, 1.0649 |
| N-Hydroxysuccinimid (NHS) | Pierce, 24500 |
| N, N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) | Pierce, 20320 |
| Pentachlorbenzol | Riedel de Haen, 35886 |
| Polyethylenglykol (PEG) 1.500 | Roche, 783641 |
| Polyethylenglykol (PEG) 4.000 | Merck, 1.09727 |
| 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 |
| Tetrahydrofuran (THF) | Merck, 1.08107 |
| 2,3,4-Trichloranisol | Riedel de Haen, 36624 |
| 2,3,6-Trichloranisol | Riedel de Haen, 36625 |
| 2,4,6-Trichloranisol (TCA) | Riedel de Haen, 34384 |
| 2,4,6-Trichloranisol (TCA) | Ehrenstorfer, XA17714600 |
| 2,4,6-Trichlorphenol (TCP) | Merck, 8.21158 |
| 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 | Sigma, A-8924 |
| Ziege-anti-Maus-IgG-Biotin | Sigma, B-7401 |
| Ziege-anti-Maus-IgG | Sigma, M-5899 |

2.1.3 Chromatographiereagenzien

| | |
|-------------------------|-------------------------------|
| Protein A high capacity | Bioprocessing, 133-111-324 |
| Protein A-Agarose | Roche, 1719408 |

2.1.4 Zellkulturmedien

Zellkulturmedium

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

| | |
|---------------------------|--------------------------|
| Fötale Kälberserum (FKS) | Biochrom, S0115 |
| Gentamycin | Sigma, G-1272 |
| l-Glutamin | Sigma, G-7513 |
| | Cell Concepts, 5-10K00-H |
| Hypoxanthin | Merck, 104517 |
| Hypoxanthin-Azaserin | Sigma, A-9666 |
| Interleukin 6 (IL-6) | Roche, 1299972 |
| Kanamycinsulfat | Serva, 26898 |
| RPMI 1640 mit Hepes | Cell Concepts, M-L4104-1 |
| Serum freies Medium (SFM) | Gibco, 12045-076 |

Normalmedium (NM)

500 ml RPMI 1640 mit Hepes

55 ml FKS

5,5 ml l-Glutamin

5,5 ml 10^{-3} mol/l Mercaptoethanol (50 ml Mercaptoethanol auf 76 ml H₂O, frisch angesetzt)

Das Normalmedium wird bei -20 °C gelagert.

Hypoxanthin Azaserin (HAZ) -Medium

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

1- bzw. 3-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 (H) -Medium

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

Einfriermedium

70 ml RPMI 1640 mit Hepes

20 ml FKS

12 ml DMSO

1 ml 10^{-3} Mercaptoethanol

2.1.5 Pufferlösungen

Borax/Boratpuffer (pH 8,7)

- 1) 0,2 mol/l H_3BO_4 , 0,05 mol NaCl
- 2) 0,05 mol/l $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$

393 ml von 1) zu 607 ml von 2) geben.

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

- 1) 50 mmol/l NaHCO_3
- 2) 50 mmol/l Na_2CO_3

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 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$
- 2) 40 mmol $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
- 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 H_2O dest.
500 μl 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 H_2O dest. auffüllen und mit NaOH pH-Wert auf 8,5 einstellen.

- 2) Elutionspuffer: 0,1 mol/l Citratpuffer, pH 3
21 g Citronensäure-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 mmol Tris-HCl pH 8,0
2) Waschpuffer b) 10 nmol Tris-HCl pH 8,0
3) Elutionspuffer 100 mmol Glycin pH 3,0
4) Neutralisierungspuffer 1,0 mol Tris-HCl pH 8,0

POD-Substrat für ELISA

- 1) Chromogenlösung
1,2 mmol/l TMB
8 mmol/l H₃PO₄
10 % 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 |
| Cl 350 Fermenter | Integra |
| Cryoröhrchen, steril | Greiner |
| Dialyseschlauch | Serva |

| | |
|---|-------------------------------|
| 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, 10 ml, 20 ml, 50 ml, steril | Greiner, Sarstedt |
| Plastikspritzen 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml | Braun |
| Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml | Eppendorf |
| Sterilfilter 0,2 µm, 0,4 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

| | |
|---|-------------------|
| 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 |
| Mikroprozessor pH-Meter, Portamess 752 | Knick |
| Mikrotiterplatten-Waschautomat, PW 96 | Tecan |
| Objektführung (Mikroskop) | Hundt |
| Peristaltische Pumpe, P3 | Pharmacia |
| Rührzelle 8010 mit Membran XM 50 > 50.000 MW | Filtron |
| Schüttler, Vortex VF 2 | Janke & Kunkel |
| 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

2.2 Methoden

2.2.1 Konjugat-Synthese

2,4,6-Trichloranisol (TCA) ist mit einem Molekulargewicht von 212 Da nicht in der Lage, eine Immunantwort auszulösen. Als Hapten muss es zuerst an ein Trägerprotein gekoppelt werden. Die Synthese an die Trägerproteine erfolgte über die Carbodiimid-Methode. Dabei wird eine Carboxylgruppe des Haptens mit einem Lysinrest des Proteins gebunden (Abb. 3). Da TCA nicht über eine Carboxylgruppe verfügt, musste diese angefügt werden. Dazu standen mehrere Positionen am Benzolring des TCA zur Auswahl. Es wurden drei unterschiedliche TCA-Haptene von Dr. Pilar Marco (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona) synthetisiert (Abb. 4). Diese Haptene wurden an die Trägerproteine gekoppelt. Zur Immunisierung wurde an KLH, zur Beschichtung im ELISA an BSA gebunden. Die Konjugatsynthese erfolgte für BSA und KLH analog. Als organisches Lösungsmittel wurde Tetrahydrofuran (THF) eingesetzt. Um eventuell vorhandenes Wasser zu entziehen, wurde THF über ein Molekularsieb (0,4 μm) gegeben. Dadurch entstand getrocknetes THF.

30 μmol des Haptens wurden in 117 μl trockenem THF gelöst. Dazu wurden 75 μmol NHS, und 150 μmol DCC, die ebenfalls jeweils in 59 μl trockenem THF gelöst wurden zugegeben und 2 $\frac{1}{2}$ h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff durch 10minütige Zentrifugation bei 10.000 U/min entfernt. Der Überstand wurde tropfenweise einer Proteinlösung (10 mg BSA oder KLH pro 10 μmol Hapten, in Borax/Boratpuffer, pH 8,7, 4,75 ml Puffer pro mg Protein) zugesetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Konjugate wurden mit viermaliger Dialyse gegen 0,01 mol PBS gereinigt und anschließend in Aliquots bei - 20 °C gelagert.

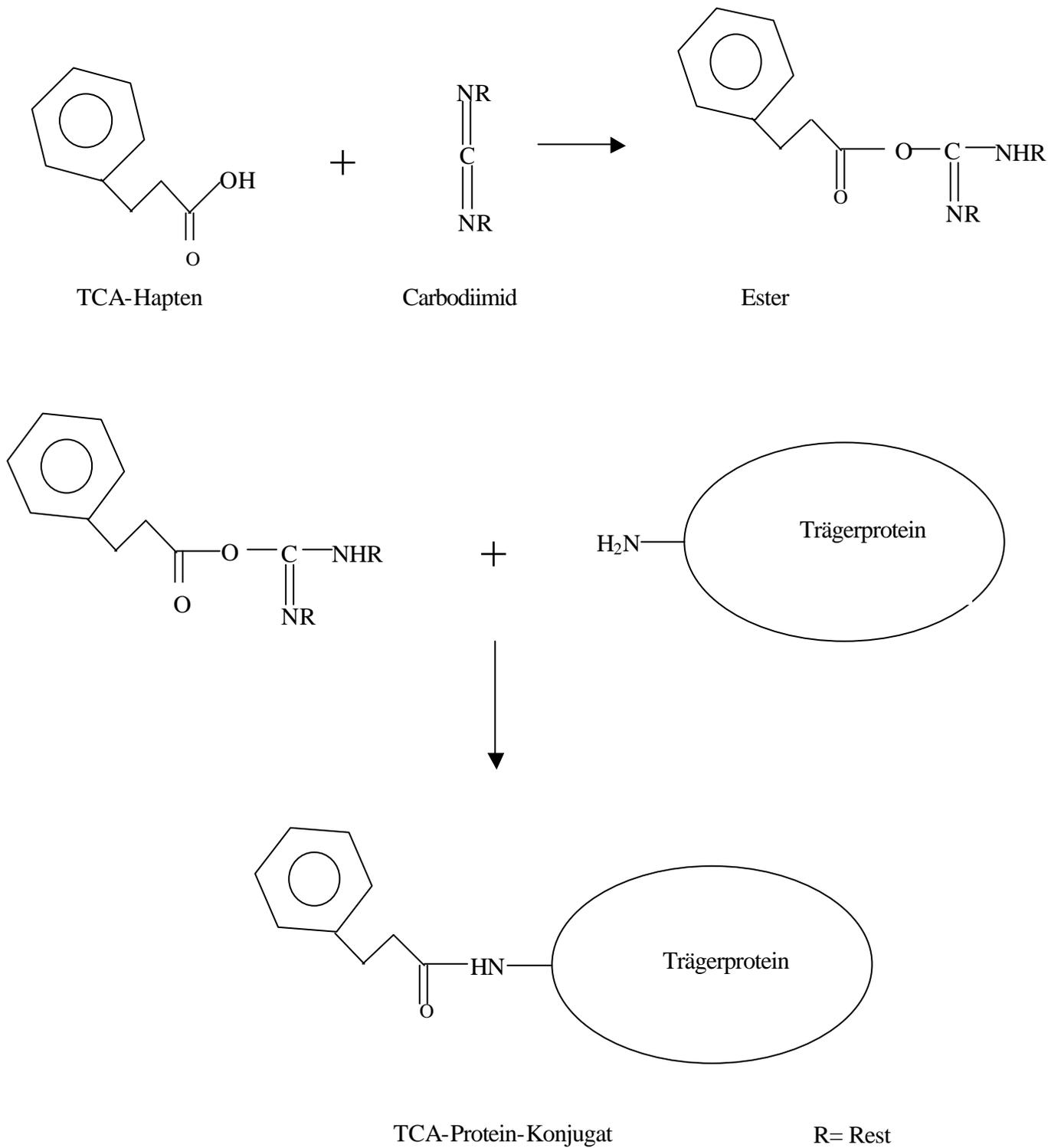
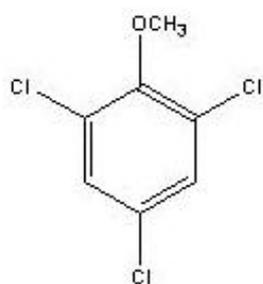
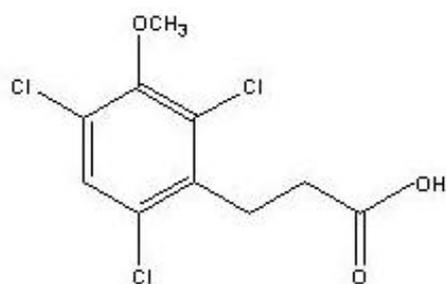


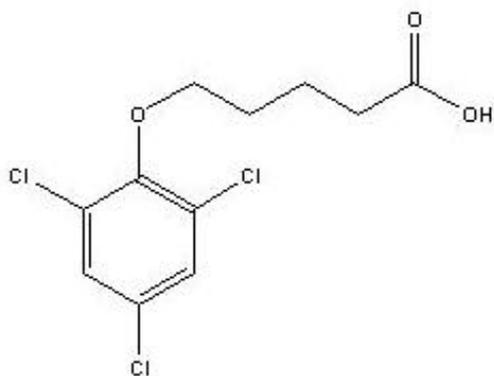
Abbildung 3: Schematische Kopplung von TCA-Haptenen an Trägerproteine.



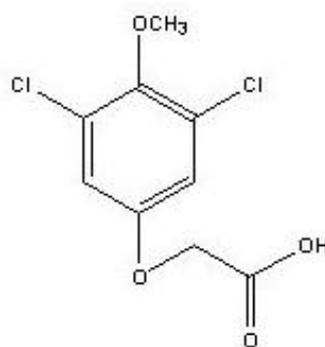
2,4,6-Trichloroanisol



Hapten A



Hapten B



Hapten C

Abbildung 4: 2,4,6-Trichloroanisol (TCA), Hapten A, Hapten B und Hapten C.

2.3 Konjugat-Charakterisierung

2.3.1 Bestimmung des Proteingehalts

Der Proteingehalt der Konjugate wurde photometrisch bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ oder durch einen BCA-Test ermittelt. Zur photometrischen Bestimmung des Proteingehaltes wurde auch eine Standardreihe bekannter Proteinkonzentration gemessen.

Der BCA-Test nutzt die Fähigkeit von Proteinen, alkalisches Kupfer (II) zu Kupfer (I) zu reduzieren. Dies ist abhängig von der Proteinkonzentration. Bicinchinonsäure erkennt äußerst sensitiv Kupfer (I) und bildet damit einen lilafarbenen Komplex, der photometrisch bei $\lambda = 562 \text{ nm}$ gemessen werden kann. Die Durchführung des BCA-Tests erfolgte auf einer 96er Mikrotiterplatte. Dazu wurde eine Standardreihe (50 μl pro Kavität) unterschiedlicher Proteinkonzentrationen und die zu messenden Proben (50 μl pro Kavität) aufgetragen. Die Standardreihe und die Proben wurden in PBS gelöst. Die Proben wurden unterschiedlich verdünnt, um in den Konzentrationsbereich der Standards zu gelangen.

Die BCA-Lösung wurde mit 4 % Kupfersulfatpentahydrat-Lösung (50:1) gemischt und aufgetragen (200 μl pro Kavität). Anschließend folgte eine 30minütige Inkubation bei 37 °C. Vor der Messung im Photometer bei $\lambda = 562 \text{ nm}$ kühlte die Platte für 15 Minuten bei Raumtemperatur (Rt) ab. Die Absorption bei 562 nm ist direkt proportional zur Proteinkonzentration. Die Standards ergaben in einem linearen Koordinatensystem eine Gerade, anhand der die Konzentrationen der Proben bestimmt werden konnten.

2.3.2 Bestimmung des TCA-Gehalts

Der TCA-Gehalt der verschiedenen Konjugate wurde mit der Cariusmethode oder mit MALDI-TOF (s.u) bestimmt. Allgemein wird bei der Cariusmethode der Halogen- oder Schwefelgehalt von organischen Substanzen mit AgNO_3 und konzentrierter HNO_3 bestimmt (Ehrenberger und Gorbach, 1973). Man gibt die abgewogene Substanz mit HNO_3 in ein „Bombenrohr“. Dieses wird erhitzt und in einem Ofen für 3-6 h bei 250 – 300 °C gehalten. Danach sind die organischen Verbindungen zerstört, und es haben sich Silberhalogenide gebildet, die bestimmt werden können.

Bei MALDI-TOF handelt es sich um eine „Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation-Flugzeitmassenspektrometrie“. Dabei wird eine „schonende“ Desorption/Ionisation der

Analytmoleküle durch den sogenannten MALDI-Prozess herbeigeführt. Die gebildeten Ionen können durch Kopplung zu verschiedenen Massenspektrometern detektiert werden, wobei sich die Flugzeitmassenspektrometrie besonders anbietet. Um ein Ionensignal zu erhalten, wird die gelöste Probe mit der Lösung einer geeigneten Matrix gemischt und auf einem Probenhalter zur Kristallisation gebracht. Im Hochvakuum ($< 10^{-4}$ Pa) wird die Probe mit gepulstem Laserlicht von wenigen Nanosekunden Dauer bestrahlt. Daraufhin kann die Desorption und Ionisation der Analytmoleküle erfolgen.

2.3.3 Bestimmung der Hapten-Dichte

Die Hapten-Dichte, das Verhältnis von gekoppeltem TCA-Hapten zum Trägerprotein, wurde folgendermaßen berechnet.

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

| | |
|--------------|---------------------------------------|
| m (Hapten) | = Masse des gekoppelten Haptens |
| m (Protein) | = Masse des Trägerproteins |
| MG (Hapten) | = Molekulargewicht des TCA-Hapten |
| MG (Protein) | = Molekulargewicht des Trägerproteins |

2.4 Herstellung polyklonaler Antikörper

Polyklonale Antikörper wurden in Kaninchen hergestellt. Mehrere polyklonale Antiseren wurden von Dr. Pilar Marco (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona) zur Verfügung gestellt. Sie dienen als Grundlage für die Entwicklung eines Screeningverfahrens für mAk und zur Überprüfung der Antikörpertiter in Mausantiseren nach erfolgter Immunisierung. Durch die Überprüfung dieser Titer kann der Immunisierungserfolg belegt werden. Mit diesen polyklonalen Antiseren wurde folgender ELISA entwickelt.

Beschichten: 200 µl TCA-Hapten-BSA (5 µg/ml) in Carbonatpuffer, über Nacht bei 4 °C

Blockierung: 300 µl 2 % OVA in PBS, 1,5 h bei 4 °C

| | |
|-------------------|---|
| 1. Immunreaktion: | 100 µl TCA-Standards und 100 µl Antiserum (1:50.000 in PBS) 1 h bei 4 °C |
| 2. Immunreaktion: | 200 µl Ziege-anti-Kaninchen-IgG-POD (1:10.000 in PBS), 1 h bei 4 °C |
| Enzymreaktion: | 200 µl Substrat und Chromogen, 15 min bei Raumtemperatur |
| Abstoppen: | 50 µl 2 N H ₂ SO ₄ |
| Messung: | Photometer Lambda = 450 nm |

2.5 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Für die Zellkultur standen separate Räume zur Verfügung, in denen sich jeweils eine Sterilbank befand (Gelaire, Laminair). Die Zellen wurden in Brutschränken (Heraeus) bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Ein Umsetzen auf ein nächst größeres Kulturgefäß erfolgte, wenn 2/3 des Ausgangsgefäßes bewachsen waren (visuelle Kontrolle). Ein Bewuchs von 2/3 entspricht 10⁶ Zellen pro ml (Harlow und Lane, 1988). Das Nährmedium wurde im Normalfall alle zwei bis drei Tage gewechselt. Bei schwachem Bewuchs wurde die Periode zwischen den Mediumswechseln verlängert. Zellen wurden als Sicherheitsreserve oder nach Beendigung der Zellkultur 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).

2.6 Herstellung monoklonaler Antikörper

2.6.1 Immunisierung

Die Immunisierung weiblicher CD-1 Mäuse (Charles River, Sulzfeld) erfolgte mit den unterschiedlichen TCA-Hapten-KLH-Konjugaten. Jeder Maus wurde nur eine Art Immunkonjugat verabreicht. Zum Zeitpunkt der ersten Immunisierung waren die Tiere ungefähr 50 Tage alt. Dazu wurden 100 µl Immunkonjugat in PBS mit 120 µl komplettem Freund's Adjuvans emulgiert. Eine größere Menge von Adjuvans als Immunkonjugat führt zu

einer stabilen „Wasser in Öl“-Emulsion (Hurn und Chantler, 1980). Die korrekte Herstellung der Emulsion erkannte man bei Ablage eines Tropfens Emulsion auf einer Wasseroberfläche. Blieb der Tropfen intakt, handelte es sich um eine stabile „Wasser in Öl“-Emulsion. Löste sich der Tropfen hingegen rasch auf, sollte eine neue Emulsion hergestellt werden. Tabelle 2 zeigt das Immunisierungsschema von Mäusen mit KLH-Hapten A, B oder C.

Tabelle 2: Immunisierungsschema für Mäuse mit KLH-Hapten A, B oder C.

| Zeitpunkt | Arbeitsschritt |
|-----------------------|---|
| 1. Woche | Immunisierung mit 100 µl Konjugat (0,1mg) und 120 µl cFA |
| 2. Woche | Blutabnahme |
| 5. Woche | Immunisierung mit 100 µl Konjugat (0,1 mg) und 120 µl iFA |
| 6. Woche | Blutabnahme |
| 9. Woche | Immunisierung mit 100 µl Konjugat (0,1 mg) und 120 µl iFA |
| 10. Woche | Blutabnahme |
| 13. Woche | Immunisierung mit 100 µl Konjugat (0,1 mg) und 120 µl iFA |
| 14. Woche | Blutabnahme |
| 17. Woche | Immunisierung mit 100 µl Konjugat (0,1 mg) und 120 µl iFA |
| 18. Woche | Blutabnahme |
| 21. Woche | Immunisierung mit 100 µl Konjugat (0,1 mg) und 120 µl iFA |
| 7 Tage vor der Fusion | Immunisierung mit 200 µl Konjugat |
| 5 Tage vor der Fusion | Immunisierung mit 200 µl Konjugat |
| 3 Tage vor der Fusion | Immunisierung mit 200 µl Konjugat |
| 1 Tag vor der Fusion | Immunisierung mit 200 µl Konjugat |
| 25 Woche | Fusion |

cFA = komplettes Freund's Adjuvans; iFA = unkomplettes Freund's Adjuvans

Die Mäuse wurden intraperitoneal immunisiert. Eine Woche bis zehn Tage nach jeder Immunisierung wurden 20-40 µl Blut aus der Schwanzvene entnommen. Dieses Blut wurde anschließend ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Danach wurde der geronnene Blutkuchen vom Serum durch Zentrifugation getrennt. Diese Seren lagerte man bei - 20 °C. Bei Bedarf wurden sie für einen ELISA aufgetaut. Weitere Immunisierungen erfolgten in Abständen von vier Wochen. Bei allen Immunisierungen, außer der ersten, wurde nicht-komplettes Freund's Adjuvans verwendet. Fünf Tage vor der Zellfusion wurden täglich Boosterimmunisierungen mit vierfacher Immunkonjugatmenge ohne Freund's Adjuvans durchgeführt.

2.6.2 Gewinnung der Milzzellen

Die immunisierte Maus wurde durch zervikale Dislokation getötet und mit Ethanol desinfiziert. Alle folgenden Schritte fanden unter sterilen Bedingungen statt. Zur Entnahme der Milz wurde die Bauchdecke geöffnet und die Milz herausgeschnitten. Diese wurde mit 5 ml RPMI 1640 gewaschen, und anhaftende Fettreste wurden entfernt. Anschließend wurde die Milz mit einer Kanüle perforiert, und die B-Lymphozyten wurden mit 15 ml RPMI 1640 aus der Milz in eine Petrischale gespült. Die Zellsuspension wurde aufgenommen, und zur Zerstörung von Zellaggregaten wurde sie gegen die Wand eines 50 ml Zentrifugenröhrchens gespült. Im Anschluss folgte die Zellfusion.

2.6.3 Zellfusion

Die gewonnenen B-Lymphozyten wurden mit Myelomzellen der Linie PAI-B₃ Ag8I fusioniert. Diese Myelomzellen produzieren selbst keine Antikörper, zeichnen sich aber durch ein gutes Wachstum aus. Eine Milz enthält ungefähr 10⁸ B-Lymphozyten. Auf eine Zählung dieser Zellen wurde verzichtet, um nicht zufällig die gesuchten Zellen zu entfernen und somit zu vernichten.

Die Myelomzellen wurden in großen Zellkulturflaschen (225 cm²) 10 Tage zuvor in NM herangezogen. Zwei bis drei gut bewachsene große Zellkulturflaschen enthalten ca. 10⁸ Zellen. Die Myelomzellen wurden durch Abklopfen aus den Zellkulturflaschen gewonnen und in 20 ml RPMI 1640 vereint. Anschließend wurde ihre Zellzahl mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Im Gegensatz zu lebenden Zellen nehmen tote Zellen Trypanblau auf. Lebende Zellen erschienen leuchtend und wurden gezählt. Die Gewinnung der Milz- und Myelomzellen erfolgte nach Verfahren von Giersch (1993 a und b).

Die Myelomzellen (5×10^7) wurden zu den B-Lymphozyten gegeben und 5 Minuten bei 800 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen nahm man in 10 ml RPMI 1640 auf. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 5 Minuten mit 800 U/min. Es schloss sich die Entfernung des Überstandes an. Diesmal wurde das Zellgemisch aber mit einer Pasteurpipette trockengesaugt, um eine spätere Verdünnung des Fusogens zu vermeiden. Über einen Zeitraum von einer Minute gab man PEG 1.500 bei 37 °C unter permanentem Rühren zu. Danach wurde für eine weitere Minute bei 37 °C gemischt, gefolgt von der Zugabe von 4 ml RPMI 1640 (37 °C) innerhalb von 4 Minuten unter ständigem Weiterrühren. Daraufhin wurden weitere 10 ml RPMI 1640 (37 °C) dem Gemisch zugesetzt. Es schloss sich eine zehnminütige Inkubation bei 37 °C an. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 20 ml Normalmedium mit 10 % Condimed aufgenommen. 70 % der Fusion wurden für einen Tag in einer großen Zellkulturflasche kultiviert und anschließend eingefroren. Die verbliebenen 30 % wurden auf vier Zellkulturplatten (96 Kavitäten pro Platte) ausgesät.

2.6.4 HAZ-Selektion

Die nicht eingefrorenen 30 % der Fusion wurden beginnend mit dem darauffolgenden Tag einer HAZ-Selektion unterzogen. HAZ-Medium bewirkt, dass nur noch Hybridomzellen in der Kultur überleben können. Nicht fusionierte Myelomzellen mit einem starken Wachstum würden in Kürze die Hybridomzellen überwuchern. Sie werden durch HAZ-Medium vergiftet.

Ein Tag nach der Fusion wurde jeder Kavität ein Tropfen dreifach konzentriertes HAZ-Medium mit 10 % Condimed zugegeben. Das Zellwachstum wurde täglich mit einem Umkehrmikroskop kontrolliert. Bei starkem Wachstum wurde das Medium zum ersten Mal nach drei Tagen gewechselt. Wuchsen die Zellen langsamer, wurde erst nach sieben Tagen gewechselt. Dieser Tausch wurde mit einfach konzentrierten HAZ-Medium mit 10 % Condimed durchgeführt. Zwei weitere Wechsel mit einfach konzentriertem HAZ-Medium und 10 % Condimed folgten im Abstand von 3 Tagen. Die einzelnen Kavitäten wurden permanent auf eventuelle Kontaminationen geprüft. Nach Beendigung der HAZ-Selektion wurde auf H-Medium umgestellt. Über eine Spanne von zwei bis drei Mediumswechseln wurde einfach konzentriertes H-Medium mit 10 % Condimed verwendet. Jeder Mediumswechsel erfolgte im Abstand von zwei bis drei Tagen. Nach dieser Phase wurde eine

Umstellung auf NM vollzogen. Nun wurden auch keine weiteren Wachstumsstoffe zugegeben.

2.6.5 Screening

Nach maximal 14 Tagen in Zellkultur gehen B-Lymphozyten, die auch Antikörper herstellen können, zu Grunde. Ab diesem Zeitpunkt wurde auf das Vorhandensein TCA-spezifischer Antikörper getestet. Der Überstand jeder einzelnen Kavität wurde auf die Anwesenheit TCA-spezifischer mAk im ELISA mit einem Überschuss TCA und einer Kontrolle ohne TCA getestet. Der dafür entwickelte ELISA wurde in 96er Mikrotiterplatten durchgeführt. Somit konnte eine Zellkulturplatte auf zwei 96er Mikrotiterplatten getestet werden. Der für das Screening entwickelte ELISA sah wie folgt aus (und Abb. 5):

| | |
|-------------------|---|
| Beschichten: | 1 µg/ml BSA-Hapten A, B oder C (200 µl pro Kavität in Carbonatpuffer), über Nacht bei 4 °C |
| 1. Immunreaktion: | PBS bzw. 1.000 µg/l TCA-Standard (100 µl pro Kavität in PBS) und Zellkulturüberstand (90 µl), 1 h Raumtemperatur (Rt) |
| 2. Immunreaktion: | Ziege-anti-Maus IgG Fc-spezifischer Sekundärantikörper markiert mit Meerrettichperoxidase (zg-ms-POD) (200 µl pro Kavität) 1:10.000 in PBS, 1h bei Rt |
| Farbreaktion: | Substrat und Chromogen (200 µl pro Kavität), 15 min bei Rt |
| Abstoppen: | 2 N H ₂ SO ₄ (50 µl pro Kavität) |
| Messung: | Lambda = 450 nm im Photometer |

Auf die ersten drei Schritte dieses ELISA folgten jeweils Waschschrte mit dreimal 350 µl PBS-Waschpuffer je Kavität im Mikrotiterplattenwaschautomat. Die Platten konnten nach

dem Beschichten direkt verwendet werden, oder sie wurden bei -20°C gelagert. Dieser ELISA wurde mindestens fünf Mal über einen Zeitraum von drei Wochen durchgeführt.

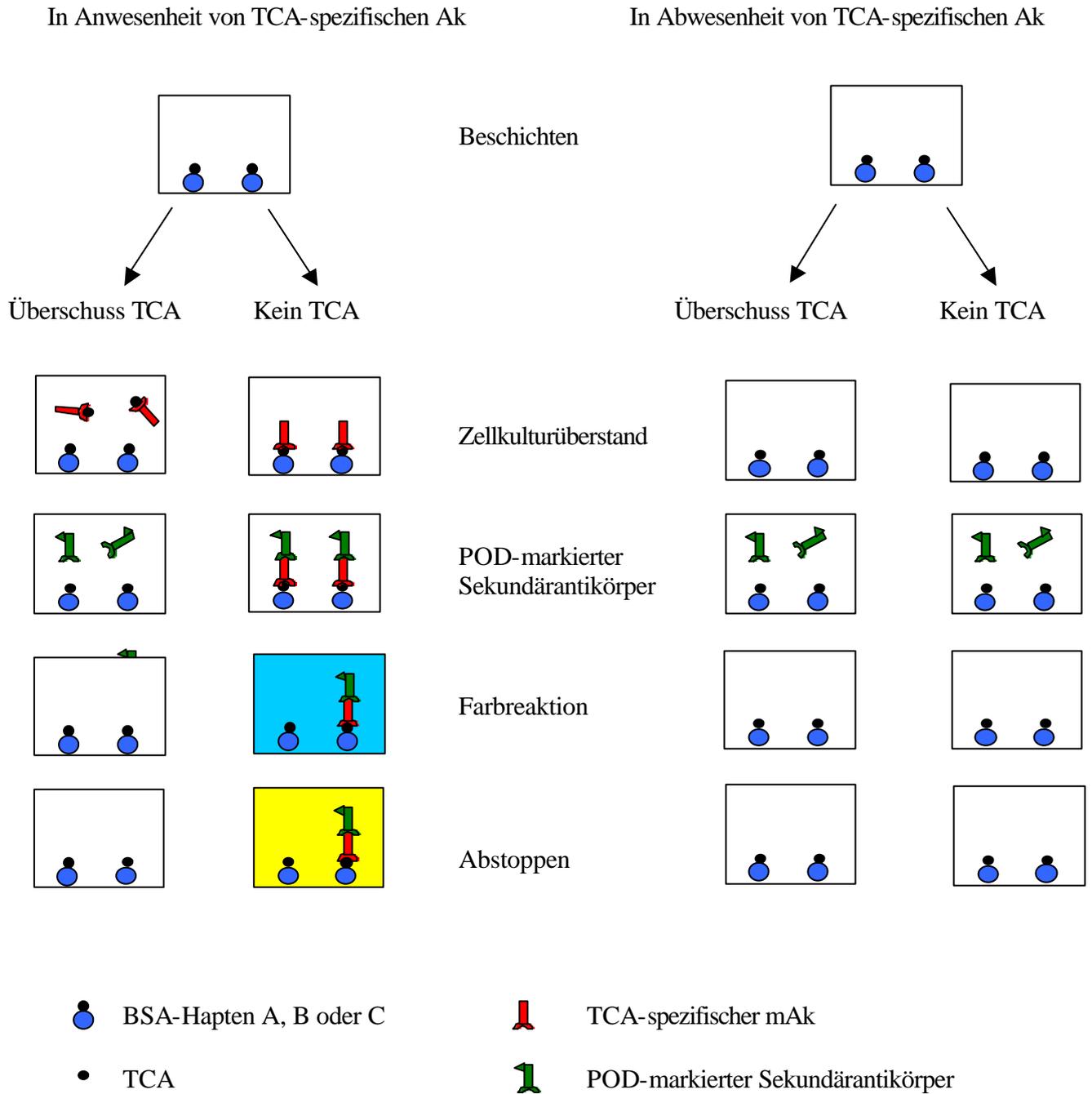


Abbildung 5: Screeningverfahren für TCA-spezifische monoklonale Antikörper.

Allgemein gilt für alle hier beschriebenen ELISAs, dass sich an die Farbreaktion nie ein Waschschritt anschloss. Die Farbreaktion wurde immer mit 50 µl 2 N H₂SO₄ pro Kavität beendet. Die Farbreaktion würde ohne die Beendigung mit H₂SO₄ immer weiter fortlaufen, bis schließlich der entstandene lichtempfindliche, blaue Charge-Transfer-Komplex zerfällt. Dieser Komplex ist durch die POD-katalysierte radikalische Oxidation von TMB entstanden. H₂SO₄ wandelt den Charge-Transfer-Komplex in das stabile 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diimoniumion um (Gallati und Pracht, 1985).

2.6.6 Klonierung

Nach der Fusion und der darauffolgenden Aussaat liegen in den einzelnen Kavitäten der Klonplatten Zellgemische unterschiedlicher Hybridomzellen vor. Für die Herstellung mAk ist aber eine einheitliche Zellpopulation Voraussetzung. Diese Zellpopulation ist Nachkomme einer einzigen Zelle. Zur Profilierung einer solchen monoklonalen Population wird zuerst eine Vereinzlung oder Klonierung der antikörperproduzierenden Zellen durchgeführt. Dazu wurden Zellen, die im oben genannten Screening über den gesamten Zeitraum TCA-spezifische Antikörper herstellten, aus den jeweiligen Kavitäten entnommen und kloniert. Als Klonierungsverfahren wurde die Einzelzellablage ausgewählt.

Bei der Einzelzellablage wurden die ersten vier Kavitäten einer 96er Klonplatte mit jeweils 150 µl NM aufgefüllt. Anschließend wurden Zellen aus der zu klonierenden Ausgangskavität aufgewirbelt. 50 µl Zellsuspension wurden entnommen und in die erste mit NM gefüllte Kavität der Klonplatte gegeben und gut durch Einsaugen und Abgeben mit einer Pipette gemischt. Aus dieser Kavität wurden nun wiederum 50 µl entnommen und in die nächste Kavität überführt. Dort folgte wieder ein Durchmischen und eine anschließende Entnahme von 50 µl Zellsuspension. So wurde bis zum Erreichen der vierten Kavität verfahren. Es entstand eine Verdünnungsreihe von Zellen. Diese Verdünnungsreihe wurde unter dem Umkehrmikroskop betrachtet, und es wurde diejenige Kavität gesucht, in der sich im Sichtfeld bei 100facher Vergrößerung fünf bis 10 Zellen befanden. Waren in allen Kavitäten mehr als die gewünschten fünf bis 10 Zellen vorhanden, wurden weitere Verdünnungsschritte notwendig. Die Kavität mit der passenden Zellzahl wurde durchgemischt, um auf dem Boden haftende Zellen in Suspension zu bringen. 30 µl wurden entnommen, und in die erste Reihe der Klonplatte wurden möglichst zentral flache Tropfen abgelegt. Diese Reihe wurde unter dem Umkehrmikroskop kontrolliert. Es sollte möglichst eine Zelle in jedem einzelnen Tropfen vorhanden sein. War dies nicht der Fall, so wurde zur Einzelzellablage eine andere

Ausgangsverdünnung gewählt. Nach der mikroskopischen Kontrolle wurde jede Kavität mit 200 µl NM mit 10 % BM-Condimed aufgefüllt. In die verbliebenen Reihen der Klonplatte wurde nach diesem Verfahren jeweils ein Tropfen abgelegt. Nach jeder Reihe erfolgte eine visuelle Kontrolle und eine anschließende Zugabe von 200 µl NM mit 10 % BM-Condimed. Nun wurde die Platte für fünf bis sieben Tage im Brutschrank kultiviert. Dann folgte ein Mediumswechsel, wiederum mit NM mit 10 % BM-Condimed. Vor diesem Wechsel wurde die Anzahl wachsender Klone pro Kavität ermittelt. Ab diesem Zeitpunkt wurde ein NM-Wechsel alle zwei bis drei Tage durchgeführt. War eine ausreichende Anzahl von Zellen in den einzelnen Kavitäten vorhanden, wurde auf eine Zugabe von zusätzlichen Wuchsstoffen verzichtet. Ab diesem Zeitpunkt wurde das oben aufgeführte Screeningverfahren zum Nachweis von TCA-spezifischen Antikörpern wiederholt durchgeführt. Die Zellen der Kavitäten, die positiv getestet wurden und in denen anfänglich nur ein Klon wuchs, wurden weiter kultiviert. Ein Teil diente der Reklonierung, der andere Teil wurde bei entsprechender Zellzahl auf größere Kulturgefäße umgesetzt. War ein ausreichendes Quantum von Zellen vorhanden, wurden sie als Sicherheitsreserve eingefroren.

2.6.7 Massenproduktion von monoklonalen Antikörpern

Die Massenproduktion mAk wurde in dem Biofermentersystem Miniperm, im Biofermenter CL 350 (Abb. 6) oder in großen Zellkulturflaschen (225 cm²) durchgeführt. Miniperm ist die Weiterentwicklung der Dialyseröhrensysteme. Es besteht aus einem Produktions- und einem Versorgungsmodul. Produktions- und Versorgungsmodul sind durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt, die unterschiedliche Ausschlussgrößen besitzen kann. Es wurde eine Membran mit einer Porengröße von 30 kDa gewählt. IgG-Moleküle mit einer Größe von 146 kDa können also diese Membran nicht passieren. Die antikörperherstellenden und sezernierenden Zellen befinden sich im Produktionsmodul. Die produzierenden Zellen können ebensowenig wie die Antikörper die Membran passieren. Im Versorgungsmodul befindet sich das Medium. Nährstoffe aus diesem Medium können durch die Membran diffundieren und somit die Versorgung der Zellen sicherstellen. Miniperm ist ein bewegliches System. Zur optimalen Versorgung der Zellen muss es auf eine Drehvorrichtung gestellt werden. Auf dieser Vorrichtung werden die Zellen mit 4 U/min im Brutschrank kultiviert.

Bei dem Biofermenter CL 350 handelt es sich um ein ähnliches System wie Miniperm. Es ist ebenfalls in einen Produktions- und Versorgungsbereich unterteilt. Zellen und Antikörper sind durch eine semipermeable Membran (Ausschlussgröße 10 kDa) vom Versorgungsmodul

a) CL 350



b) Miniperm



Abbildung 6: Darstellung des Fermenters CL 350 a) und des Fermenters Miniperm b).

getrennt. Bei diesem System handelt es sich im Gegensatz zum Miniperm Fermenter um ein statisches System. Es wird keine weitere Drehvorrichtung benötigt.

Um die Minipermkultur zu beginnen, müssen ungefähr 2×10^6 Zellen zur Verfügung stehen. Diese Zellen wurden in Zellkulturflaschen (225 cm^2) kultiviert. War eine adäquate Zellzahl vorhanden, wurde von NM auf serumfreies Medium (SFM) umgestellt. Dies geschah in einer Adaptionsphase von drei Schritten. Beim ersten Wechsel setzte man NM mit 25 % SFM ein. Bei den darauffolgenden Wechseln im Abstand von zwei bis drei Tagen wurde zuerst NM mit 50 % SFM und anschließend NM mit 75 % SFM verwendet. Nach dem nächsten Wechsel, der nur noch mit SFM vollzogen wurde, wurden die Zellkulturflaschen abgeklopft. Die Zellen vereinte man in 35 ml SFM. Es folgte die Entnahme eines Aliquots von 100 μl , das zur Ermittlung der Zellzahl durch Trypanblaufärbung in einer Neubauer-Zählkammer diente. Die 35 ml Zellsuspension wurde in ein Produktionsmodul überführt, und das Versorgungsmodul wurde mit 350 ml SFM aufgefüllt. Nach jeweils zwei bis drei Tagen wurde die Zellzahl im Produktionsmodul bestimmt. Bei ausreichenden Zellzahlen erntete man 5 ml. Befanden sich die Zellen in einem starken exponentiellen Wachstum, so wurden auch 10 ml oder 15 ml aus dem Produktionsmodul entnommen. In der entnommenen Suspension befanden sich sowohl Zellen als auch Antikörper. Diese Suspension wurde bei 5.000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde zur späteren Aufreinigung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Die geernteten Zellen wurden verworfen.

Die Ak-Herstellung im CL 350 Fermenter wurde ebenfalls mit SFM durchgeführt. Die Aufzucht und die Umstellung der Zellen auf SFM erfolgte analog der im Miniperm. Ebenfalls wurden 2×10^6 pro ml in das Produktionsmodul gegeben. Dieses hat ein maximales Volumen von 15 ml. Die Versorgungseinheit wurde mit 350 ml SFM befüllt. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Mediumswechsel mit 350 ml SFM und eine Ak-Ernte. Zur Gewinnung der Ak mussten alle Zellen entnommen werden. Sie wurden bei 800 U/min abzentrifugiert und anschließend in 15 ml neuem SFM resuspendiert und ins Produktionsmodul zurück überführt. Bei jeder Ak-Ernte wurde die Zellzahl mit Trypanblau in einem Hämocytometer bestimmt. Zur Massenproduktion in Zellkulturflaschen wurden Zellen aufgetaut. Diese wurden in eine Zellkulturflasche (225 cm^2) gegeben und in NM kultiviert. Mediumswechsel wurden alle zwei bis drei Tage durchgeführt. Nach zwei bis drei Wechseln mit NM wurde auf SFM umgestellt.

Die Umstellung auf SFM erfolgte entsprechend der zur Minipermproduktion notwendigen Umstellung. Sobald eine Flasche gut bewachsen war, wurde sie abgeklopft und auf zwei andere Zellkulturflaschen verteilt. Nach jedem Wechsel mit SFM wurde der Zellkulturüberstand aufgefangen und anschließend mit 5.000 U/min abzentrifugiert. Der abzentrifugierte Überstand wurde bei -20 °C gelagert.

2.6.8 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur sicheren Lagerung von Zellen wurden diese entweder bei -80 °C in einem Gefrierschrank oder bei -196 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Eine Lagerung bei -80 °C ermöglicht eine Verwahrung von bis zu einem Jahr. In flüssigem Stickstoff hingegen können Zellen unbegrenzt gelagert werden. Deswegen wurden Zellen maximal für eine Dauer von zwei bis drei Monaten bei -80° C aufbewahrt.

Zur Sicherheit wurden Aliquots der Zellen nach jedem wichtigen Schritt (z.B. Klonierung) eingefroren. Dazu wurde eine Zellsuspension aus den Kavitäten von Zellkulturplatten oder aus Zellkulturflaschen in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Daraufhin folgte ein fünfminütiger Zentrifugationsschritt mit 800 U/min. Der Überstand wurde dekantiert, und die Zellen wurden in einer definierten Menge Einfriermedium aufgenommen. Das Einfriermedium sollte möglichst eine Temperatur von 0 °C besitzen, denn es enthält DMSO. DMSO bewirkt einen Schutz vor der Bildung von Eiskristallen im Inneren der Zellen, es ist aber bei höheren Temperaturen zelltoxisch. Jeweils 1,5 ml Suspension aus Zellen und Einfriermedium wurde in jeweils ein Kryoröhrchen übertragen. Um ein späteres Aufplatzen der Kryoröhrchen durch die Ausdehnung des Inhalts bei Abkühlung zu verhindern, wurde jeweils nur mit 1,5 ml befüllt, und es wurden Kryoröhrchen mit Deckelinnengewinde gewählt. Die gefüllten Kryoröhrchen wurden in eine zuvor auf 4 °C vorgekühlte Einfrierbox, die mit Isopropanol gefüllt war, überführt. Anschließend wurde die Einfrierbox bei -80 °C aufbewahrt. Isopropanol führte zu einer kontinuierlichen Temperaturabsenkung im Inneren der Box von einem Grad pro Minute. Nach einem Tag wurden die Kryoröhrchen in einen Stickstofftank zur Endlagerung überführt.

Bei Bedarf wurden die Zellen aufgetaut. Aufgrund der Toxizität von DMSO sollten die Zellen bis zur Entfernung des DMSO nur knapp über 0 °C erwärmt werden. Dazu wurde das entsprechende Kryoröhrchen unter 37 °C temperierten Wasser gedreht, bis nur noch ein kleiner Eisklumpen in der Zellsuspension nicht aufgetaut war. Diese Suspension wurde nun in

10 ml RPMI 1640 (4 °C) überführt und für 10 Minuten inkubiert. Durch die Inkubation hatte das DMSO die Möglichkeit aus den Zellen zu diffundieren. Anschließend wurden die Zellen in NM aufgenommen. Am darauffolgenden Tag folgte ein Mediumswechsel.

2.6.9 Subklassenbestimmung

Die Subklassenbestimmung dient der Charakterisierung der mAk. Die Subklasse ist bedeutsam, um das beste Verfahren zur Aufreinigung der mAk zu wählen. Dadurch wird die Gewinnung einer größtmöglichen Menge von mAk gewährleistet.

Da im Screening ein IgG-spezifischer Sekundärantikörper eingesetzt wurde, konnte es sich bei den gewonnenen mAk nur um Antikörper der Klasse IgG handeln. Die IgG-Subklasse und der Leichkettentyp (Lambda oder κ) wurde mit folgendem Sandwich-ELISA bestimmt:

| | |
|-------------------|---|
| Beschichten: | 250 μ l Ziege-anti-Maus-IgG (5 μ g/ml) in Carbonatpuffer, über Nacht bei 4 °C |
| 1. Immunreaktion: | 200 μ l Zellkulturüberstand, 30 min bei 37 °C |
| 2. Immunreaktion: | 200 μ l Kaninchen-anti-Maus-IgG subklassenspezifische Ak, 1:5 in PBS verdünnt, 30 min bei 37 °C |
| 3. Immunreaktion: | 200 μ l Ziege-anti-Kaninchen-IgG-POD, 1:10.000 in PBS, 30 min bei 37 °C |
| Farbreaktion : | 200 μ l Substrat und Chromogen, 15 min bei Rt |
| Abstoppen: | 50 μ l 2 N H ₂ SO ₄ |
| Messung: | Lambda = 450 nm im Photometer |

Auf die ersten vier Schritte dieses ELISA folgten jeweils Waschschrte mit dreimal 350 μ l PBS-Waschpuffer je Kavität im Mikrotiterplattenwaschautomat. Nach dem Beschichten war es möglich, die Platten bei -20 °C zu lagern. Dazu wurden sie einfach ausgeschüttet. Bei Bedarf wurden sie bei 4 °C im Kühlschrank 10 Minuten aufgetaut. Der ELISA wurde dann wie oben beschrieben fortgesetzt.

2.7 Reinigung und Konzentrierung monoklonaler Antikörper

Alle mAk wurden über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Diese Chromatographie wurde mit Protein A durchgeführt. Protein A ist ein Staphylokokkenprotein. Es bindet stark an den Fc-Teil von Antikörpern. Besonders gut werden IgG2a und IgG2b gebunden. Aber auch alle anderen IgG-Subklassen werden gebunden. Die reversibel immobilisierten Ak lassen sich über pH-Stufengradienten eluieren. IgG1 löst sich bei pH 6-8, IgG2a bei pH 4,5-6, IgG2b bei pH 3,5-4,5 und IgG3 bei 4,5-6. Zur Vereinfachung kann aber auch generell bei pH 3 eluiert werden.

Zur Aufreinigung wurden mAk in serumfreiem Medium (SFM) kultiviert. Es sollte kein Serum im Medium enthalten sein, da Seren IgG enthalten. Dieses Fremd-IgG wird dann ebenfalls mit den mAk aufgereinigt und konkurriert mit den gewünschten IgG um die begrenzten Bindeplätze am Protein A. Dadurch kann eine geringere Menge mAk aufgereinigt werden. Eine affinitätschromatographische Trennung von Fremd-IgG und mAk ist möglich. Rinder-IgG eluiert bei pH-Werten knapp unter 8 von Protein A.

Vor jeder Aufreinigung wurde der Zellkulturüberstand (ZKÜ) abzentrifugiert (5.000 U/min, 10 min). Dadurch wurden Zellen oder Zellpartikel aus dem ZKÜ entfernt. Danach erfolgte eine Filtration (Porengröße 0,2 μ m) zur Abtrennung von eventuell nicht entfernten Zellen oder Zellpartikeln.

Aufgereinigt wurde über Prosep A und Protein A-Agarose. Bei Prosep A ist Protein A an Glasperlen mit kontrollierter Porengröße immobilisiert. Eine Protein A-Säule wurde mit 2 ml von Prosep A gefüllt. Bei der Aufreinigung mit Protein A-Agarose wurde eine Säule mit 2 ml Protein A-Agarose befüllt. Vor der Aufreinigung sollte der IgG-Gehalt des zu reinigenden ZKÜ bestimmt werden. Prosep A ist in der Lage, pro ml 13 mg IgG1 zu binden. Ein ml Protein A-Agarose kann 10 bis 20 mg reines IgG in Abhängigkeit der IgG-Subklasse binden.

Allgemein wurden ZKÜ und Puffer durch eine peristaltische Pumpe zur Säule transportiert. Die Durchflussgeschwindigkeit der verschiedenen Lösungen betrug jeweils 4 ml/min. Nachdem die Lösungen die Säule passiert hatten, wurden sie in einem Durchflussphotometer bei 280 nm gemessen. Dieses Photometer war mit einem Schreiber verbunden, der den Proteingehalt notierte.

2.7.1 Aufreinigung über Prosep A

Der zuvor aufbereitete ZKÜ wurde mit 5 N NaOH auf pH 8,5 eingestellt. Anschließend wurde die Prosep A-Säule mit 5-10 fachen Säulenvolumen Bindungspuffer (Boratpuffer, pH 8,5) äquilibriert. Detektierte der Photometer kein Protein, und zeichnete der Schreiber eine gerade Grundlinie, so wurde ZKÜ über die Säule geschickt. Hatte der ZKÜ die Säule passiert, lief Bindungspuffer über diese, bis im Photometer kein Protein mehr erkannt wurde. Nun wurde das immobilisierte IgG durch Elutionspuffer (Citratpuffer, pH 3,0) gelöst. Der gewonnene Antikörper wurde sofort zur pH-Neutralisierung mit Tris (2 mol/l) auf pH 7-7,5 gebracht. Der pH-Wert des Elutionspuffers würde in kurzer Zeit die IgG-Moleküle irreversibel denaturieren. Anschließend wurde die Säule mit HCl (pH 1,5) gereinigt. Gelagert wurde sie in PBS mit 0,02 % NaN_3 bei 4 °C. NaN_3 diente als Konservierungsmittel. Die gewonnene Antikörpermenge wurde im Photometer bei $\lambda = 280$ nm bestimmt. Eine photometrische Messung konnte erfolgen, da kein Fremdprotein vorhanden war. Ein mg Ak hat eine Absorption von 0,8 bei $\lambda = 280$ nm. Als Nullprobe diente Citratpuffer mit Tris.

2.7.2 Aufreinigung über Protein A-Agarose

Eine Säule wurde mit 2 ml Protein A-Agarose befüllt. Zu Beginn der Aufreinigung wurde die Säule mit dem fünffachen Säulenvolumen von Waschpuffer (I) äquilibriert. Danach wurde der ZKÜ aufgetragen, der zuvor mit Neutralisationspuffer auf pH 7,5 eingestellt wurde. Nach dem ZKÜ durchflossen 10 ml Waschpuffer (I) die Säule. Im Anschluss wurde Waschpuffer (II) eingesetzt. Dieser reinigte die Säule, bis im Photometer kein Protein mehr detektiert wurde. Anschließend wurden die gebundenen Ak mit dem Elutionspuffer gelöst. 2ml der Ak-Elutionspufferlösung wurden in 8 ml Neutralisationspuffer aufgenommen. Die IgG-Konzentration des Eluats wurde anschließend ebenfalls im Photometer bei 280 nm bestimmt. HCl (pH 1,5) wurde für die Reinigung der Säule nicht mehr benötigt.

2.7.3 Bestimmung der Antikörperkonzentration

Immunglobulinkonzentrationen wurden mit zwei unterschiedlichen Verfahren bestimmt. Handelte es sich um reines IgG ohne Fremdprotein, so konnte direkt im Photometer bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ gemessen werden. Wurde hingegen in einem Zellkulturüberstand (ZKÜ) die Antikörperkonzentration determiniert, so musste aufgrund des vorhandenen Fremdproteins (Rinder-IgG, BSA) eine Konzentrationsbestimmung mit einem Sandwich-ELISA durchgeführt werden. Dieser Sandwich-ELISA ist in der Lage, geringere IgG-Konzentrationen als die photometrische Messung zu erkennen. Bei einem ELISA müssen zur Quantifizierung unbekannter Proben auch Standards bekannter Konzentrationen aufgetragen werden, ohne die eine Bestimmung der Proben unmöglich wäre. Die Standards waren Verdünnungen einer bekannten IgG-Konzentration. Der Sandwich-ELISA zur Bestimmung der Antikörperkonzentration bestand aus den nachfolgenden Schritten.

| | |
|-------------------|---|
| Beschichten: | 250 μl Ziege-anti-Maus-IgG ($5\mu\text{g/ml}$) in Carbonatpuffer, über Nacht bei 4°C |
| 1. Immunreaktion: | 200 μl IgG-Standards in PBS und 200 μl ZKÜ in unterschiedlichen Verdünnungen, 1 h bei Rt |
| 2. Immunreaktion: | 200 μl Ziege-anti-Maus-IgG-POD, (1:10.000 in PBS), 1 h bei Rt |
| Farbreaktion: | 200 μl Substrat und Chromogen, 15 min bei Rt |
| Abstoppen: | 50 μl 2 N H_2SO_4 |
| Messung: | $\lambda = 450 \text{ nm}$ im Photometer |

Den ersten drei Schritten dieses ELISA folgte jeweils ein Waschschriff mit dreimal 350 μl PBS-Waschpuffer im Mikrotiterplattenwaschautomat. Nach dem Beschichten war es möglich,

die Platten bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu lagern. Dazu wurden sie einfach ausgeklopft und eingefroren. Bei Bedarf wurden die benötigten Platten für 10 Minuten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank aufgetaut.

2.7.4 ELISA-Entwicklung

Mäuse wurden mit drei unterschiedlichen TCA-Hapten-Konjugaten immunisiert. Drei verschiedene mAk gegen die drei verschiedenen TCA-Hapten-Konjugate wurden gewonnen, und unterschiedliche ELISAs wurden entwickelt.

Nach den einzelnen Inkubationsschritten im ELISA war eine Phasentrennung erforderlich. Diese wurde im Mikrotiterplattenwaschautomat mit jeweils dreimal $350\text{ }\mu\text{l}$ PBS-Waschpuffer durchgeführt. Nach dem Blockierungsschritt musste nicht unbedingt ein Waschschrift folgen. Das überschüssige Blockierungsreagenz konnte auch durch einfaches Ausschütten entfernt werden. Sofern dies jedoch nicht explizit erwähnt ist, erfolgte ein Waschschrift. Nach Beendigung der Farbreaktion erfolgte die Messung bei $\text{Lambda} = 450\text{ nm}$ im Photometer. Farbreaktion und anschließendes Abstoppen mit Schwefelsäure erfolgten im Zeittakt. Dadurch wurde jeder Kavität die gleiche Zeitspanne zur Farbentwicklung gegeben. Volumenangaben in den verschiedenen ELISA-Formaten beziehen sich auf die einzelne Kavität.

TCA ist nicht in der Lage, an die Polystyroloberfläche der Mikrotiterplatte zu binden. Deshalb mussten zur Entwicklung eines ELISAs die Haptene an Trägerproteine gekoppelt werden. Als Trägerprotein wurde BSA verwendet, das gute Bindungseigenschaften zu Polystyrol besitzt und sich vom Trägerprotein Hämocyanin unterscheidet, das zur Immunisierung eingesetzt wurde.

Die beschriebenen ELISAs stellen die optimierten Formate dar. Bei jeder ELISA-Entwicklung wurden unterschiedliche Varianten in den einzelnen Inkubationsschritten getestet. Es wurden unterschiedliche Beschichtungskonzentrationen untersucht. Aus verschiedenen Blockierungsmittel wurde das Blockierungsmittel mit den besten Blockierungseigenschaften gewählt. TCA-spezifischer und Sekundärantikörper wurden in diversen Konzentrationen eingesetzt. Abbildung 7 zeigt ein Schema für einen kompetitiven ELISA, das für die drei folgenden ELISAs gültig ist.

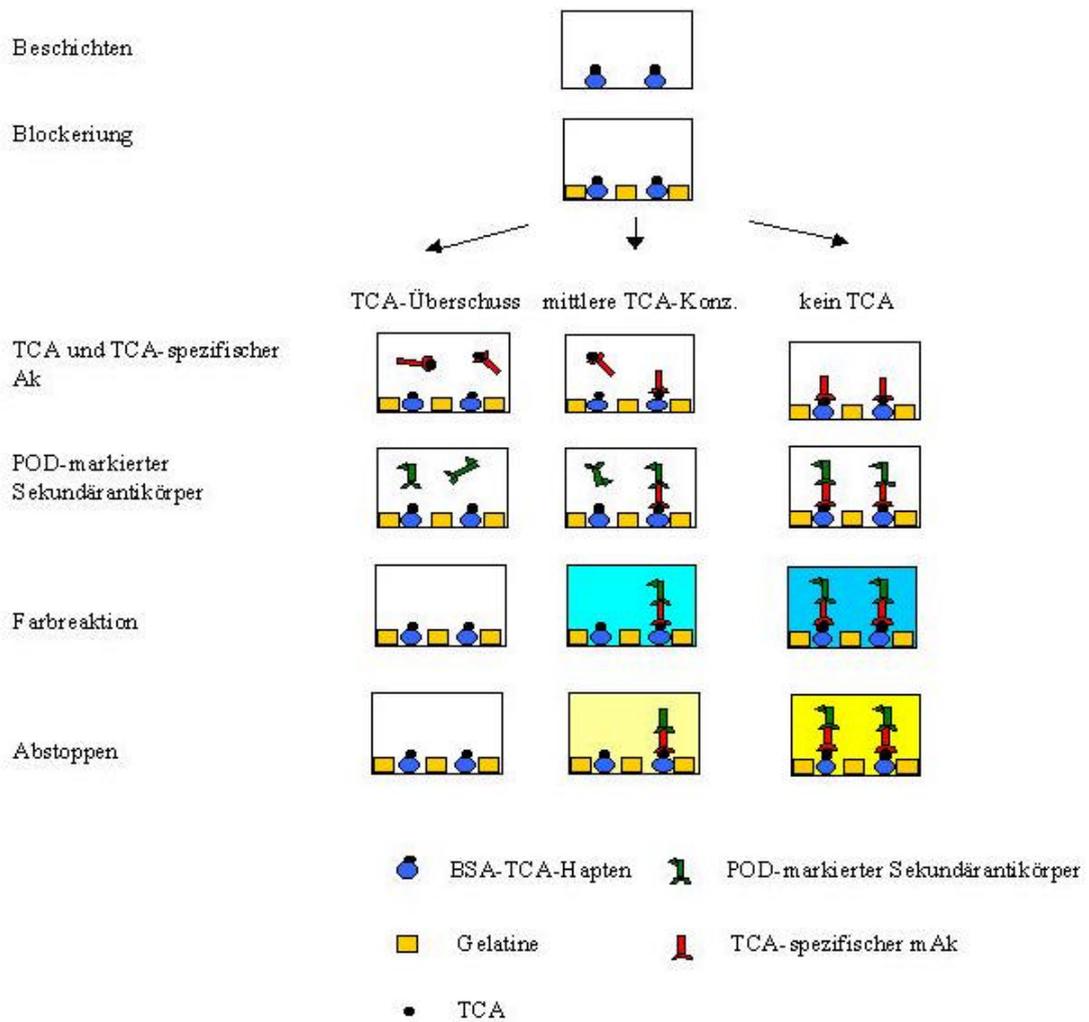


Abbildung 7: TCA-ELISA mit monoklonalen Antikörpern.

2.7.5 Kompetitiver ELISA mit Hapten A-spezifischen monoklonalen Antikörpern

Mit den gewonnenen Hapten A-spezifischen mAk wurde dieser kompetitive ELISA entwickelt. Dabei konkurriert freies TCA mit an BSA gebundenem Hapten A. Zur Durchführung dieses ELISAs waren folgende Arbeitsschritte notwendig.

| | |
|-------------------|--|
| Beschichten: | 200 µl BSA-Hapten A (5 µg/ml) in Carbonatpuffer, über Nacht bei 4 °C |
| Blockieren: | 300 µl 2 % OVA in PBS, 90 min bei 4 °C |
| 1. Immunreaktion: | 100 µl TCA-Standards und 100 µl mAk, 1 h bei Rt |
| 2. Immunreaktion: | 200 µl Ziege-anti-Maus-IgG-POD (Fc-spezifisch), 1:10.000 in PBS, 1 h bei Rt |
| Farbreaktion: | 200 µl Substrat und Chromogen, 15 min im Dunkeln bei Rt |
| Abstoppen: | 50 µl 2 N H ₂ SO ₄ |
| Messung: | Lambda = 450 nm im Photometer |

2.7.6 Kompetitiver ELISA mit Hapten B-spezifischen monoklonalen Antikörpern

Mit den mAk (Hbab), die durch die Immunisierung gegen Hapten B entstanden sind, wurde folgender, kompetitiver ELISA entwickelt.

| | |
|-------------------|---|
| Beschichten: | 200 µl BSA-Hapten B (1 µg/ml) in Carbonatpuffer, über Nacht bei 4 °C |
| Blockierung: | 300 µl Magermilchpulver (1 %) in PBS, 90 min bei Rt |
| 1. Immunreaktion: | 100 µl TCA-Standards und 100 µl Hbab, 1:15.000 in PBS, 90 min bei Rt |

| | |
|-------------------|--|
| 2. Immunreaktion: | 200 µl Ziege-anti-Maus-IgG-POD, 1:40.000 in PBS, 1 h bei Rt |
| Farbreaktion: | 200 µl Substrat und Chromogen, 15 min im Dunkeln bei Rt |
| Abstoppen: | 50 µl 2 N H ₂ SO ₄ |
| Messung: | Lambda = 450 nm im Photometer |

2.7.7 Kompetitiver ELISA mit Hapten C-spezifischen monoklonalen Antikörpern

Der Hapten C-spezifischen mAk (Rami) wurde zur Entwicklung des folgenden, kompetitiven ELISA genutzt.

| | |
|-------------------|--|
| Beschichtung: | 200 µl BSA-Hapten C (1 µg/ml) in Carbonatpuffer, über Nacht bei 4 °C |
| Blockierung: | 300 µl Gelatine (3 %) in PBS, 90 min bei Rt |
| 1. Immunreaktion: | 100 µl TCA-Standards in PBS und 100 µl Rami, 1:10.000 in PBS, 90 min bei Rt |
| 2. Immunreaktion: | 200 µl Ziege-anti-Maus-IgG-POD, 1:5.000 bis 1:20.000 in PBS, 1 h bei Rt |
| Farbreaktion: | 200 µl Substrat und Chromogen, 15 min im Dunkeln bei Rt |

| | |
|------------|---|
| Abstoppen: | 50 μ l 2 N H ₂ SO ₄ |
| Messung: | Lambda = 450 nm im Photometer |

2.7.8 Kompetitiver Hapten C-ELISA mit ABC-Amplifizierungssystem

(Standardverfahren)

Dieser ELISA war bis zur zweiten Immunreaktion dem ELISA ohne ABC-System identisch. Der POD-markierte Sekundärantikörper wurde gegen einen biotinierten Sekundärantikörper ausgetauscht. Danach erfolgte eine Inkubation mit Streptavidin-POD. Streptavidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin. Es wurden Versuche mit einem Streptavidin-POD vorgekoppelten Komplex sowie freiem Streptavidin und Biotin-POD durchgeführt. Der Hapten C-ELISA mit diesem Verstärkersystem wurde nach folgendem Schema ausgeführt.

| | |
|------------------------|--|
| Beschichten: | 200 μ l BSA-Hapten C (1 μ g/ml) in Carbonatpuffer, über Nacht bei 4 °C |
| Blockierung: | 300 μ l Gelatine (3 %) in PBS, 90 min bei Rt |
| 1. Immunreaktion: | 100 μ l TCA-Standards in PBS und 100 μ l Rami, 1:15.000 in PBS, 90 min bei Rt |
| 2. Immunreaktion: | 200 μ l Ziege-anti-Maus-IgG-Biotin, 1:20.000 in PBS mit 1 % BSA, 1 h bei Rt |
| Streptavidin-Kopplung: | 200 μ l Streptavidin-POD, 1:40.000 in PBS mit 1 % BSA, 1 h bei Rt im Dunkeln |
| Farbreaktion: | 200 μ l Substrat und Chromogen, 15 min bei Rt im Dunkeln |

Abstoppen: 50 μ l 2 N H₂SO₄

Messung: Lambda = 450 nm im Photometer

Nach der zweiten Immunreaktion konnte der ELISA auch wie folgt durchgeführt werden.

Streptavidin-Kopplung: Präinkubation von einem Teil Streptavidin (0,01 μ g/ml) und vier Teil Biotin-POD (0,0025 μ g/ml) in PBS, 30 min in einem Reaktionsgefäß und anschließend 30 min auf der Platte jeweils im Dunkeln inkubieren

Farbreaktion: 200 μ l Substrat und Chromogen, 15 min bei Rt im Dunkeln

Abstoppen: 50 μ l 2 N H₂SO₄

Messung: Lambda = 450 nm im Photometer

Abbildung 8 zeigt den kompetitiven TCA-ELISA mit Hapten C-spezifischen mAk und dem Verstärkersystem.

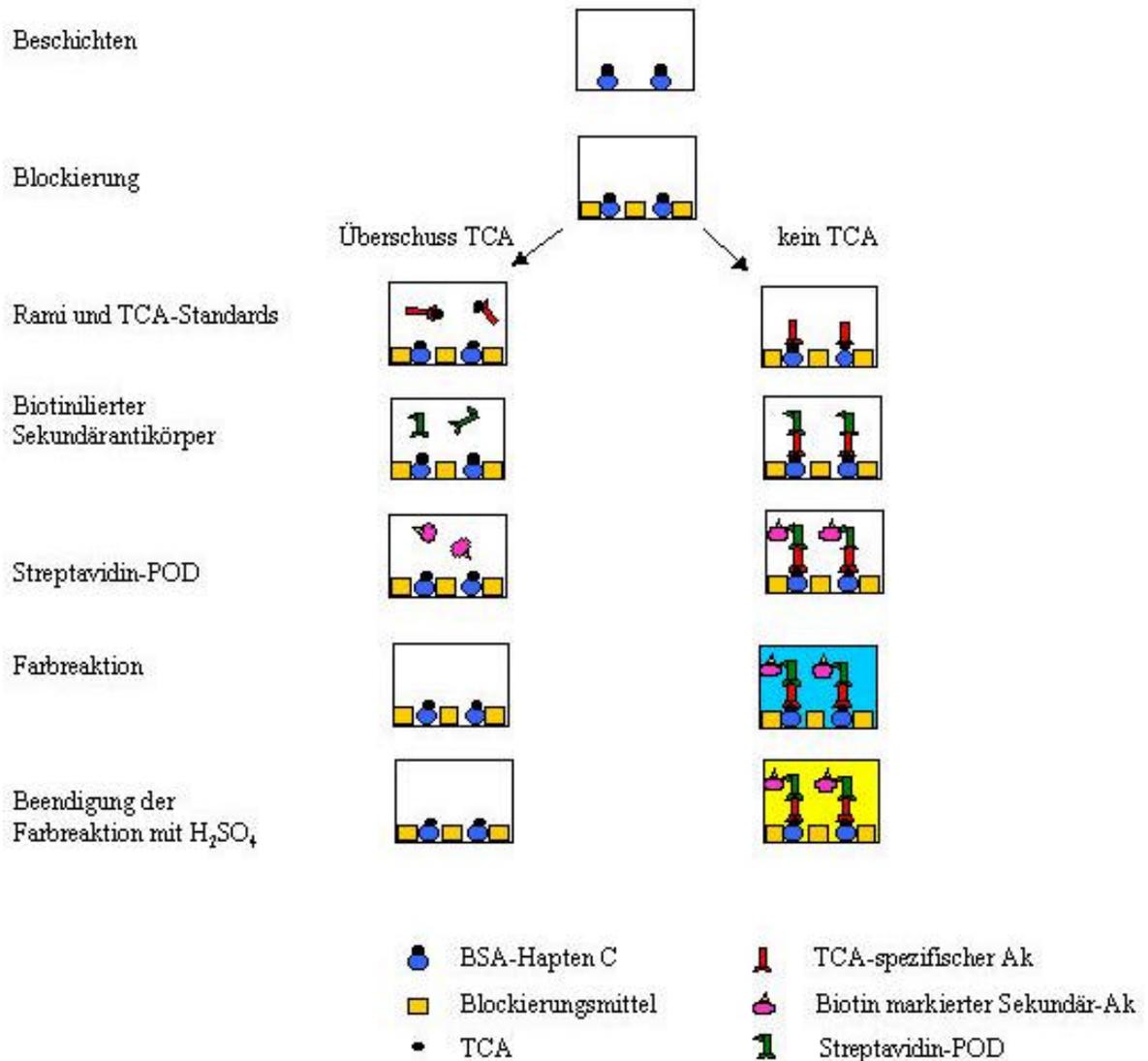


Abbildung 8: TCA-ELISA mit Verstärkersystem.

2.7.9 Auswertung der ELISAs

Die ELISAs wurden anhand der Erstellung eines Diagramms in einem Koordinatensystem ausgewertet. Die TCA-Konzentrationen wurden in der X-Achse logarithmisch und die Absorptionen in der Y-Achse linear aufgetragen. Es entstand ein halblogarithmisches Koordinatensystem, in dem die Eintragung der TCA-Konzentrationen und der dazugehörigen Absorptionen einen sigmoiden Kurvenverlauf ergaben. Mit dem 4-Parameter-logistischen Modell (Rodbarb und Hutt, 1974; Dudley et al., 1985) wurde eine sigmoide Ausgleichskurve durch die Messpunkte gelegt.

Zur Auswertung der einzelnen ELISAs und zum Vergleich mehrerer ELISA-Graphen mussten die unterschiedlichen Werte transformiert werden. Die Absorptionen wurden in % B/B₀ umgerechnet. Dies bedeutet, die maximale Absorption wird als 100 % und die minimale Absorption wird als 0 % gesetzt. Alle anderen Absorptionen werden in Prozent zu der maximalen und minimalen Absorption berechnet. Die % B/B₀-Transformation lautet wie folgt:

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

A = Absorptionswert eines Standards

A_{min} = minimale Absorption, maximale TCA-Konzentration

A_{max} = maximale Absorption, Nullwert

Bei einem kompetitiven ELISA ist die Absorption umgekehrt proportional zur Konzentration des Analyten. Die maximale Absorption entspricht dem Nullwert. Mit steigenden Konzentrationen nimmt die Absorption ab, bis sie bei der höchsten TCA-Konzentration ihren geringsten Wert (A_{min}) erreicht. Im Bereich zwischen 20 und 80 % zeigt die Ausgleichskurve einen nahezu linearen Verlauf. Dies ist der Bereich, in dem eine Messung vorgenommen werden kann (Robarb, 1971), wobei bei 50 % B/B₀, dem Testmittelpunkt, der exakteste Messpunkt liegt. Wird der Bereich zwischen 20 und 80 % als Messbereich angenommen, so gibt der 20 % B/B₀-Wert die größte Konzentration an, die mit diesem Test gemessen werden kann. Viel wichtiger hingegen ist bei den TCA-ELISAs der 80% B/B₀-Wert, der der geringsten Konzentration entspricht, die gemessen werden kann.

Zur mathematischen Auswertung einer Kurve können auch andere Rechenmodelle oder Definitionen der Nachweisgrenze herangezogen werden. So kann als Nachweisgrenze die Stoffmenge definiert sein, die noch bestimmt werden kann und sich signifikant vom Nullwert unterscheidet (Ebel und Kamm, 1983). Eine andere Möglichkeit bietet die 3S-Definition (Niessner, 1994; Bruun *et al.*, 2000). Dabei wird die durchschnittliche Standardabweichung aller Messwerte mit drei multipliziert und von der maximalen Absorption abgezogen.

Bei einem nicht kompetitiven ELISA ist hingegen die Absorption direkt proportional zur Konzentration. Die maximale Absorption entspricht der größten Analyt-Konzentration, die minimale Absorption dem Nullwert (Marx, 1997).

2.8 Kreuzreaktivität oder Querempfindlichkeit

Unter Kreuzreaktivität wird die Fähigkeit eines Antikörpers verstanden, andere Substanzen als den Analyten zu erkennen. Substanzen mit ähnlicher Struktur wurden in den beschriebenen ELISAs auf ihre Interaktion mit den spezifischen mAk untersucht. Dazu wurden in jedem ELISA TCA-Standards und Standards der eventuell kreuzreagierenden Stoffe aufgetragen. Ansonsten wurden die ELISAs wie beschrieben durchgeführt. Führt man einen ELISA mit unterschiedlichen Analyten durch, so ergeben sich mehrere Kurven. Zum Vergleich dieser Kurven muss eine Normierung erfolgen. Die Kurven wurden am Testmittelpunkt (50 % B/B₀) verglichen. Die Kreuzreaktivität wurde wie folgt berechnet:

$$\% \text{ KR} = \frac{\text{Konzentration des Analyten bei 50 \% B/B}_0}{\text{Konzentration des kreuzreagierenden Analyten bei 50 \% B/B}_0}$$

Die Bestimmung der Kreuzreaktivitäten ist für eine spätere Auswertung des ELISAs wichtig. Sind kreuzreagierende Substanzen in einer Proben vorhanden, so verfälschen sie das Ergebnis. Der kreuzreagierende Stoff kann in Abwesenheit des Analyten ein positives Signal liefern.

Im ELISA kann an der Querempfindlichkeit eines mAk nichts geändert werden. Die Spezifität des mAk ist während der Immunisierungsphase entstanden. Bei bekannten Kreuzreaktivitäten kann nur das Testformat so verändert werden, dass die Querempfindlichkeiten zu vernachlässigen sind.

2.8.1 Probenmessung

Die ELISAs mit den mAk Rami und Hbab wurden zur Probenmessung eingesetzt. Dazu wurden die ELISA wie beschrieben durchgeführt. Neben der auf jeder Platte vorhandenen Standardreihe wurden Proben in unterschiedlichen Verdünnungen aufgetragen.

2.8.2 Weinproben

Es handelte sich um Weiß- und Rotwein, der zuvor sensorisch auf das Nichtvorhandensein von TCA geprüft wurde. Anschließend wurde eine definierte Konzentration TCA zugesetzt. Von dieser Stammlösung wurden verschiedene Verdünnungsstufen in PBS hergestellt. Jede Probe wurde im ELISA mit dreimaliger Wiederholung gemessen. Ansonsten wurden die ELISAs wie beschrieben durchgeführt.

2.8.3 Korkproben

Kork, der nicht mit TCA kontaminiert war, wurde klein gehäckselt und anschließend in 99 % Ethanol 24 h extrahiert (1 g Kork in 10 ml Ethanol). Der Extrakt wurde filtriert, und eine definierte Menge TCA wurde zugegeben. Es wurden unterschiedliche Verdünnungsstufen in PBS angesetzt und im ELISA gemessen. Eine Probe wurde pro ELISA mit dreimaliger Wiederholung gemessen.

III Ergebnisse

3.1 Konjugatcharakterisierung

TCA ist mit einem Molekulargewicht von 212 Da nicht in der Lage, eine Immunantwort auszulösen. Aus diesem Grunde musste es an ein immunogenes Trägermolekül gekoppelt werden. Hierfür wurde Hämocyanin (KLH) ausgewählt. KLH ist ein Wasserschneckenprotein, das sich aufgrund seiner Verschiedenheit zu Säugetierproteinen zur Immunisierung anbietet. TCA kann jedoch nicht ohne Weiteres an Proteine gekoppelt werden. Es musste eine reaktive Gruppe eingefügt werden, die mit einer chemischen Gruppe des Trägerproteins eine Bindung eingehen konnte. Es wurden drei unterschiedliche TCA-Haptene synthetisiert (Abb. 4, S. 23). Diesen Haptenen wurde jeweils an unterschiedlichen Stellen eine Kohlenstoffkette mit einer endständigen Carboxylgruppe angefügt. Diese Carboxylgruppe ist in der Lage mit Lysinresten eines Proteins zu reagieren. Die Haptensynthesearbeiten wurden von Dr. Pilar Marco (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona) durchgeführt.

Sowohl Beschichtungs- als auch Immunkonjugate wurden mit der Carbodiimid-Methode hergestellt. Alle Konjugate wurden nach der in Kap. 2.2.1 beschriebenen Methode gekoppelt. Bei der Carbodiimid-Kopplung ist darauf zu achten, dass die Aktivierung des Carbodiimids bei neutralen bis schwach saurem pH-Wert vollzogen wird. Bei stark saurem pH-Wert verlangsamt sich die Reaktionszeit durch eine zu schnelle Protonierung der Aminogruppen. Liegt hingegen ein alkalisches Milieu vor, wird das Kopplungsreagenz durch Hydrolyse gespalten (Harlow und Lane, 1988). Zur Immunisierung wurden die TCA-Haptene an KLH und für eine Verwendung im ELISA an BSA gekoppelt.

Zuerst wurden Hapten A Beschichtungs- und Immunkonjugate hergestellt. Es wurde mit der Cariusmethode überprüft, wieviel Hapten A an das jeweilige Protein gebunden hat. KLH besitzt im Gegensatz zu BSA keine einheitliche Größe. Für BSA und KLH wurden folgende Molekulargewichte angenommen.

Tabelle 3: Molekulargewichte von KLH und BSA.

| | |
|------|---|
| KLH: | $4,5 \times 10^5$ g/mol bis $1,3 \times 10^7$ g/mol |
| BSA: | $6,6 \times 10^5$ g/mol |

Die Bestimmung mit der Carius-Methode lieferte die folgenden Haptendichten für Kopplungen von Hapten A an KLH und an BSA (Tab. 4).

Tabelle 4: Chloranalyse von BSA-Hapten A, KLH-Hapten A und -Hapten C.

| | |
|------|---------------------------------------|
| BSA: | 24,5 Hapten A / BSA-Molekül |
| KLH: | 333 bis 9.653 Hapten A / KLH-Molekül |
| KLH: | 535 bis 15.325 Hapten C / KLH-Molekül |

Es wurde berechnet (Kap. 2.3.3), wieviel Hapten A theoretisch an KLH hätte binden müssen (Menge des eingesetzten Hapten A und Menge des eingesetzten KLH). Dabei ergaben sich die folgenden theoretischen Haptendichten (Tab. 5). An KLH haben ca. 85 % aller Haptene gebundenen, an BSA nur 0,6 %.

Tabelle 5: Theoretische Haptendichten für BSA-Hapten A und KLH-Hapten A.

| | |
|------|---------------------------------------|
| BSA: | 3889 Hapten A / BSA-Molekül |
| KLH: | 386 bis 11.333 Hapten A / KLH-Molekül |

KLH-Hapten C-Konjugate wurden ebenfalls durch Chloranalyse bestimmt. Tabelle 4 zeigt desweiteren die Syntheserate für Hapten C an KLH bei einer Carbodiimid-Kopplung.

BSA-Hapten A- und BSA-Hapten C-Konjugate wurden ebenfalls über die Carbodiimid-Kopplung synthetisiert. Bei dieser Synthese wurde jedoch 10mal weniger Hapten für die gleiche Quantität BSA eingesetzt, um Beschichtungskonjugate mit geringer Haptendichte zu erhalten. Der Hapten-Gehalt dieser Konjugate wurde mit Hilfe von MALDI-TOF bestimmt. Abbildung 8 zeigt das Spektrum von BSA-Hapten A und BSA sowie von BSA-Hapten C und BSA. Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse der MALDI-TOF Bestimmung.

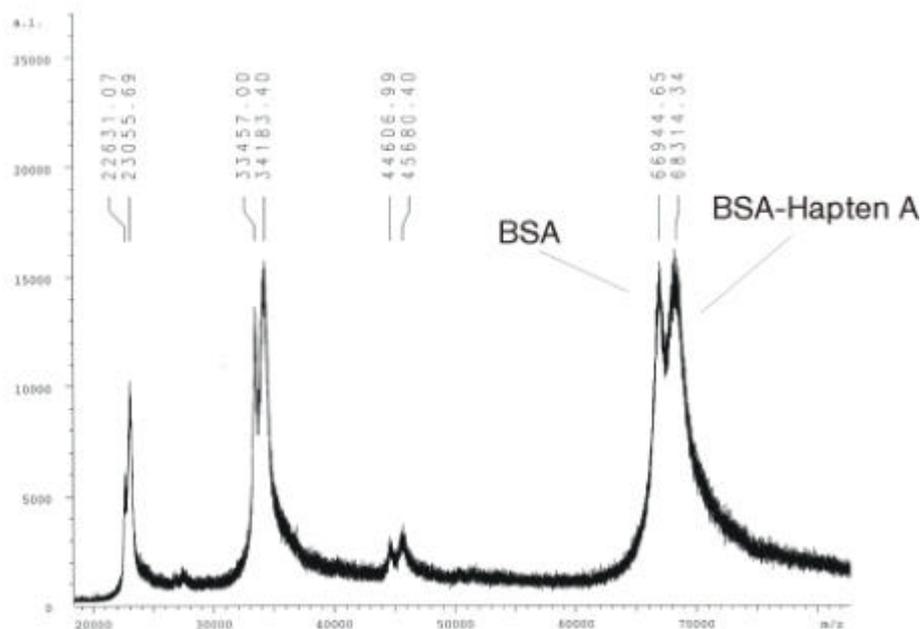
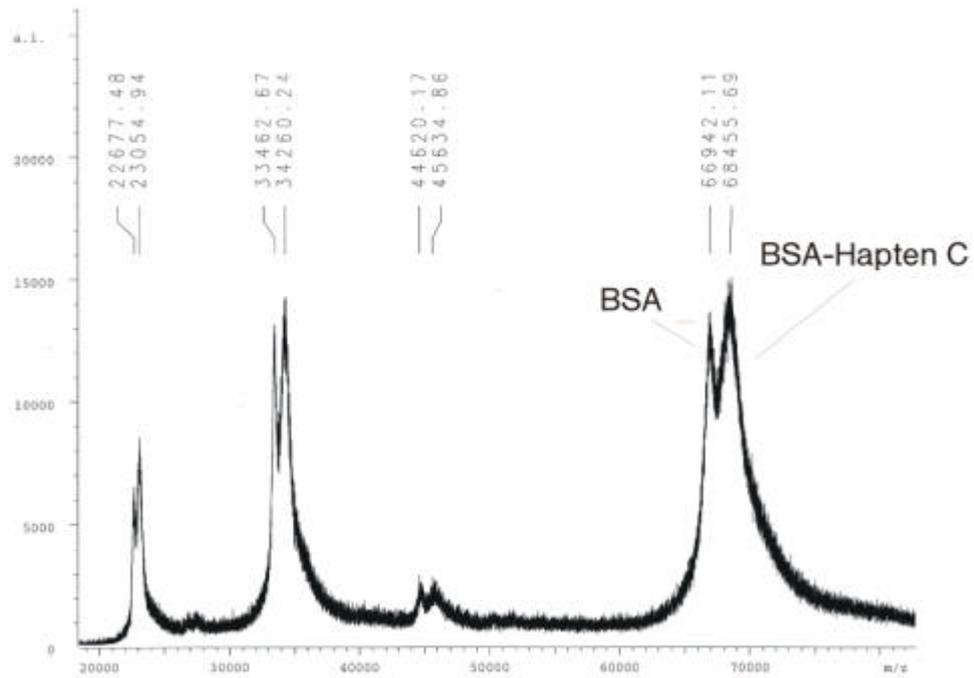


Abbildung 9: MALDI-TOF Analyse von BSA-Hapten C und -Hapten A Konjugaten im Vergleich zu reinem BSA.

Tabelle 6: Bestimmung der Hapten-Dichte mit MALDI-TOF.

| | |
|-----------|----------------------------|
| Hapten A: | 4,80 Haptene / BSA-Molekül |
| Hapten C: | 6,03 Haptene / BSA-Molekül |

Eine Messung von KLH-Konjugaten konnte mit MALDI-TOF nicht durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Molekulargewichte können KLH-Konjugate nicht mit MALDI-TOF bestimmt werden.

Alle weiter hergestellten Immunkonjugate wurden nach den beschriebenen Verfahren hergestellt. Deshalb wurde auf eine Messung mit dem Cariusverfahren oder mit MALDI-TOF verzichtet. Die Funktionalität dieser Immunkonjugate wurde im Nachhinein durch vorhandene Antikörper in den Seren der immunisierten Tiere bestimmt. Alle Seren zeigten eine gute TCA-spezifische Reaktion. TCA-spezifische mAk waren jeweils vorhanden. Es ist davon auszugehen, dass das Vorhandensein TCA-spezifischer Antikörper auf eine gute Qualität der Immunkonjugate schließen lässt.

Alle nicht mit der Cariusmethode oder mit MALDI-TOF gemessenen Beschichtungskonjugate wurden unter Verwendung der ELISAs getestet. Da eine Beschichtung mit den gemessenen Konjugaten zu denselben Ergebnissen führte, wie eine Beschichtung mit nicht gemessenen Konjugaten, wurde eine gleiche Kopplungsrate vorausgesetzt.

Der Proteingehalt aller Konjugate wurde durch BCA-Tests bestimmt. Dies war im Falle der Beschichtungskonjugate für einen standardisierten Einsatz im ELISA notwendig. Der Proteingehalt der Immunkonjugate wurde ebenfalls mit BCA-Tests festgestellt. Dadurch konnte bei jeder Immunisierung die exakt festgelegte Menge an Konjugat verabreicht werden. Tabelle 7 zeigt den Proteingehalt verschiedener Konjugate.

Tabelle 7: Proteingehalt verschiedener Konjugate.

| Konjugat | Proteingehalt |
|--------------|---------------|
| BSA-Hapten A | 1,5 mg/ml |
| KLH-Hapten A | 0,7 mg/ml |
| KLH-Hapten C | 1,0 mg/ml |
| BSA-Hapten A | 2,3 mg/ml |
| BSA-Hapten C | 1,5 mg/ml |

3.2 Polyklonale Antikörper

3.2.1 Polyklonale Kaninchenantisera

Polyklonale Kaninchenantisera wurden von Dr. Pilar Marco (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona) geliefert. Diese Antiseren dienen dem Aufbau eines ELISA mit mAk. Auch sind sie zur Entwicklung eines Screeningsystems für mAk essentiell. Mit dem Kaninchenserum K75/2 wurde ein kompetitiver ELISA (Kap.2.4) entwickelt. Abbildung 10 zeigt das Ergebnis dieses ELISAs. Die ersten vier Inkubationsschritte (Beschichten, Blockieren, 1. Immunreaktion, 2. Immunreaktion) wurden alle bei 4 °C durchgeführt. Eine Erhöhung der Inkubationstemperaturen führte zu einer sehr schnell ablaufenden Farbreaktion. Der Graph zeigt, dass mit steigender TCA-Konzentration die Absorption abnimmt. Die im Antiserum enthaltenen TCA-spezifischen Ak wurden mit zunehmender TCA-Konzentration vom freien TCA gebunden und banden nicht mehr an die beschichteten BSA-Hapten-Konjugate. Es ist zwischen maximaler TCA-Konzentration und dem Nullwert ein Absorptionsunterschied von 80 % festzustellen. Der Testmittelpunkt (IC₅₀-Wert) liegt bei ca. 260 µg/l TCA. Die Nachweisgrenze für TCA (IC₈₀-Wert) beträgt bei diesem ELISA 30 µg/l.

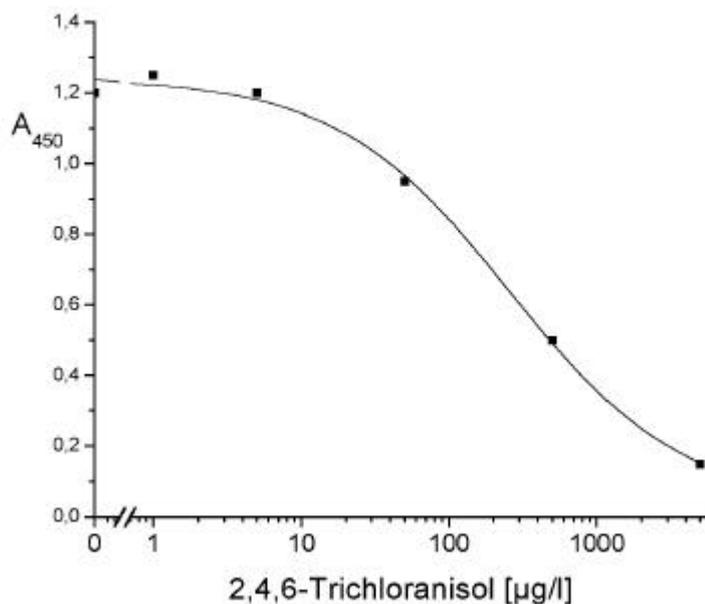


Abbildung 10: TCA-ELISA mit einem polyklonalen Kaninchenantiserum.

3.2.2 Polyklonale Mausantiseren

Es wurden unterschiedliche Mäuse mit unterschiedlichen TCA-Haptenen immunisiert. Vier Mäuse wurden mit KLH-Hapten A, drei Mäuse mit KLH-Hapten B und 8 Mäuse mit KLH-Hapten C geimpft. Die Immunisierung und die Blutabnahme erfolgte wie in Kap. 2.6.1 beschrieben. Es wurde über einen Zeitraum von sechs Monaten immunisiert, um möglichst spezifische und hochaffine Antikörper zu erhalten. Nach jeder Blutabnahme wurde Serum gewonnen. Dieses Serum wurde auf das Vorhandensein von TCA-spezifischen Ak untersucht. Die Seren wurden mit den in Kap. 2.4 beschriebenen ELISA getestet. Dieser ELISA unterschied sich von dem beschriebenen ELISA durch den Verwendung von Mausantiseren und dem Sekundärantikörper. Es wurde ein gegen Maus-IgG gerichteter POD-markierten Sekundärantikörper eingesetzt.

Tabelle 8: Anzahl immunisierter und fusionierter Mäuse.

| | Immunisierte Mäuse | Fusionen |
|------------------------------|--------------------|----------|
| Hapten A | 4 | 3 |
| Hapten B | 4 | 1 |
| Hapten C | 8 | 3 |
| kein Immunogen (Fusionstest) | | 1 |

Die Abbildungen 11-13 zeigen ELISAs, die mit Mausantiseren durchgeführt worden sind, die von Immunisierungen mit Hapten A, Hapten B und Hapten C stammen.

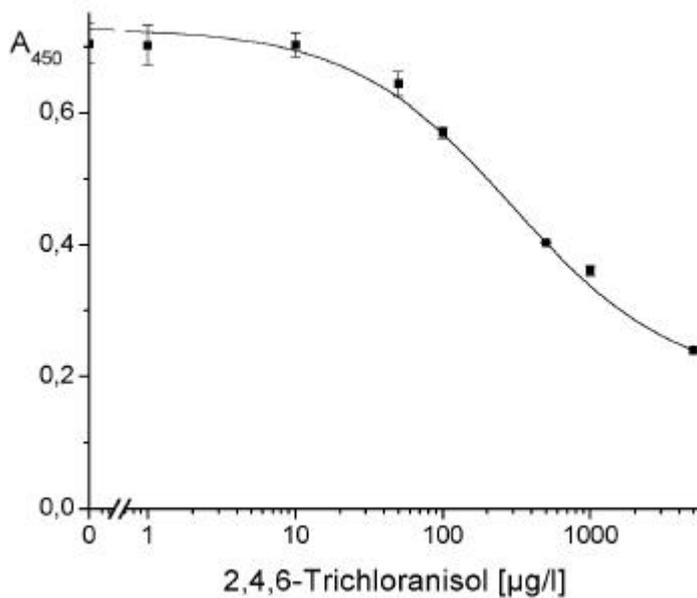


Abbildung 11: TCA-ELISA mit einem polyklonalen Mausantiserum (Immunisierung mit Hapten A).

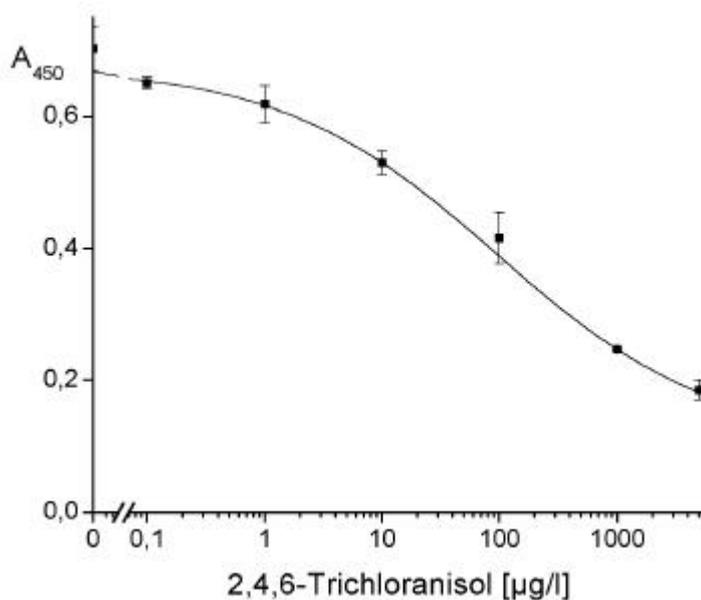
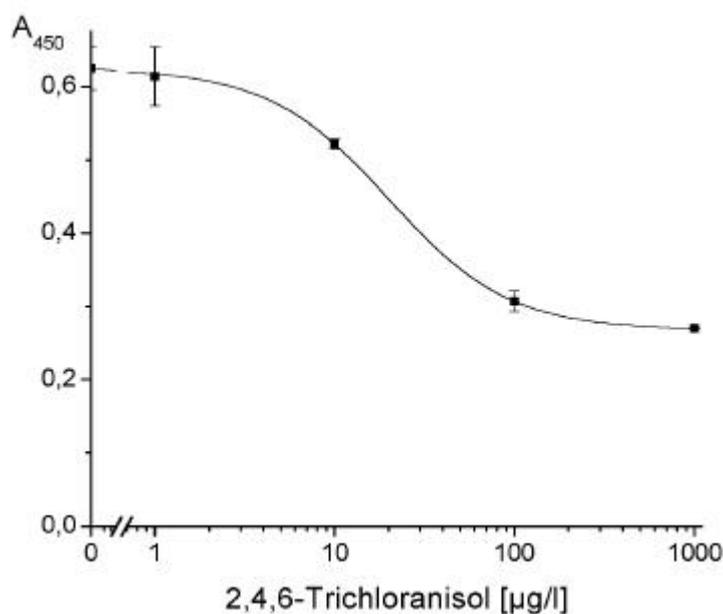


Abbildung 12: TCA-ELISA mit einem polyklonalen Mausantiserum (Immunisierung mit Hapten C).

Diese Seren zeigten eine TCA-spezifische Reaktion. Die polyklonalen Antikörper ließen sich sehr gut im ELISA mit TCA verdrängen. Die Mäuse, die diese TCA-spezifische Reaktion zeigten, wurden für die Fusion eingesetzt. Durch die TCA-spezifische Reaktion wurde auch der Immunisierungserfolg belegt.



**Abbildung 13: TCA-ELISA mit einem polyklonalen Mousantiseraum
(Immunisierung mit Hapten B).**

Die unterschiedlichen Immunisierungen waren erfolgreich, da TCA-spezifische Antikörper im Serum vorhanden waren. Alle drei aufgeführten Resultate (Abb. 11-13) von ELISAs mit polyklonalen Mousantiseraum stammen von Blutabnahmen nach der sechsten Immunisierung. Der ELISA, der mit einem Serum gegen Hapten A durchgeführt wurde, zeigt eine Nachweisgrenze von 46 µg/l TCA und einen Testmittelpunkt von 287 µg/l TCA. Die Immunisierung mit Hapten B (Abb. 13) führte zu einem Serum, das einen IC₈₀-Wert für TCA von 7 µg/l und einen IC₅₀-Wert von 20 µg/l ergab. Durch eine Immunisierung mit Hapten C (Abb. 12) wurde eine Nachweisgrenze von 5 µg/l TCA und ein Testmittelpunkt von 97 µg/l TCA erzielt.

Seren von einem Tier von unterschiedlichen Blutabnahmen wurden nicht miteinander verglichen. Unterschiedliche Seren haben unterschiedliche Eigenschaften. So müsste für jedes Serum der ELISA optimiert werden, um eine exakte Aussage zu treffen. Auch ist die gewonnene Serummenge sehr gering und reicht nicht aus, um mehrere ELISAs durchzuführen.

3.3 Monoklonale Antikörper

Insgesamt wurden 8 Mäuse fusioniert. Für die Fusionen wurden Mäuse eingesetzt, deren Serum im ELISA (Kap. 3.2.2) eine gute Reaktion mit TCA aufwies. Bei den ersten Fusionen, bei denen nur wenige Klone wuchsen, wurde PEG 4.000 verwendet. Marx (1997) erzielte mit diesem Fusogen hohe Ausbeuten an wachsenden Klonen. Es stellte sich heraus, dass das verwendete Fusogen (PEG 4.000) oxidiert war, und dadurch die sehr geringe Ausbeute an Klonen bedingt war. Bei den nächsten Fusionen, die zur Erstellung dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurde auf PEG 1.500 umgestellt. PEG 1.500 konnte im Gegensatz zu PEG 4.000 gebrauchsfertig bezogen werden. Die Masse von PEG ist für den Fusionserfolg von geringer Bedeutung. PEG mit Massen zwischen 1.500 und 6.000 wurde erfolgreich für Fusionen eingesetzt (Fazekas und Scheidegger, 1980). PEG 1.500 ist auf eine hohe Fusionseffizienz getestet (Boehringer Mannheim, Herstellerangabe). Bei den Fusionen mit oxidiertem PEG waren 2 % der Kavitäten bewachsen, bei einer Testfusion mit PEG 1.500 beinhalteten 60 % der Kavitäten wachsende Zellen. Bei späteren Fusionen waren 60 - 80 % aller Kavitäten mit Hybridomzellen bewachsen.

70 % der Fusion wurden bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. 30 % wurden auf vier 96er Klonplatten ausgesät. Es wurde nicht mehr als 30 % der Fusionsprodukte kultiviert, um ein ordentliches Arbeiten mit der Fusion zu erlauben. Nach einwöchiger Kultivierung wurden die 30 % der Fusion einer HAZ-Selektion unterworfen. HAZ- wurde HAT-Medium vorgezogen, da das im HAT-Medium vorhandene Aminopterin lichtempfindlich und auch bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nicht länger als sechs Monate lagerfähig ist (Goding, 1996). Desweiteren ist Azaserin, das im HAZ-Medium enthalten ist, in einer wesentlich geringeren Dosis wirksam, als das im HAT-Medium vorhandene Aminopterin.

Auf eine Bestimmung wachsender Klone wurde verzichtet. Diese Bestimmung hätte nur vor dem ersten Mediumswechsel erfolgen können, da bei jedem Mediumswechsel die Zellen der einzelnen Kavitäten durchgewirbelt werden. Danach ist es unmöglich zu erkennen, ob die Zellen den gleichen Ursprung haben. Der erste Mediumswechsel wurde mit Beginn der HAZ-Selektion durchgeführt. Zu jenem Zeitpunkt wuchsen aber auch B-Lymphozyten und Myelomzellen in den Kavitäten. Vor allen die nicht von den Hybridomzellen zu unterscheidenden Myelomzellen hätten das Ergebnis einer Klonzahlbestimmung, um eine nicht vorhandene Anzahl von Klonen nach oben geschraubt. Eine exakte Bestimmung der Klonzahl ist erst mit Beendigung der HAZ-Selektion möglich, wenn sich nur Hybridomzellen

in den Kavitäten der Aussaatplatten befinden. Zu diesem Zeitpunkt ist der Ursprung der Zellen aber nicht mehr feststellbar.

3.3.1 Screening

Nach Abschluss der HAZ-Selektion wurden die ZKÜ auf das Vorhandensein TCA-spezifischer Ak untersucht. Das zeitliche Ende der HAZ-Selektion fiel in diesem Falle mit dem Ende der Überlebensfähigkeit von B-Lymphozyten in Zellkultur zusammen. B-Lymphozyten stellen ebenso wie Hybridomzellen Ak her, werden jedoch wegen ihrer begrenzten Überlebensfähigkeit nicht in das Screening mit einbezogen. Es wurden Ak von Hybridomzellen gesucht, die im eine unbegrenzte Produktion ermöglichen. Als Screeningverfahren wurde der in Kap 2.6.5 beschriebene ELISA eingesetzt. Bei diesem ELISA wurde jeweils ZKÜ aus einer Kavität auf sein Verhalten mit BSA-TCA-Konjugaten in Anwesenheit von TCA (Überschuss 1.000 µg/l) und in Abwesenheit von TCA getestet. Ein Überschuss von TCA wurde gewählt, um nach Möglichkeit alle an die Konjugate gebundenen Ak zu verdrängen. Bei allen Fusionen stellte sich heraus, dass bewachsene Kavitäten über einen gewissen Zeitraum ein positives Signal liefern können, jedoch danach keine TCA-spezifische Reaktion mehr festgestellt werden kann. Dies hängt damit zusammen, dass Hybridomzellen nach einiger Zeit die Ak-Produktion einstellen können. Erst nach zwei bis drei Wochen entsteht eine Zellkultur mit einer stabilen Zellpopulation. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Aussaatplatten mindestens über einen Zeitraum von zwei bis drei Wochen (fünf bis sieben Screening) getestet. Positive Kavitäten wurden, wenn ausreichend Zellen vorhanden waren, sowohl kloniert als auch auf nächst größere Zellkulturgefäße umgesetzt. Die ZKÜ dieser Gefäße wurde ebenfalls wieder einem Screening unterworfen. Bei den hier besprochenen Fusionen handelt es sich nur um die Fusionen, die zu einer antikörperherstellenden Zelllinie führten.

Kavitäten, die im Screening ein positives Signal auf TCA zeigten, wurden durch Einzelzellablage kloniert. Bewachsene Kavitäten dieser Einzelzellablagen wurden ebenfalls auf TCA-spezifische Antikörper getestet. Dieses Screening wurde dreimal durchgeführt. Kavitäten, die dreimal eine TCA-spezifische Reaktion zeigten, wurden vermehrt und in mehreren Aliquots als Sicherheitsreserve eingefroren.

3.3.2 ELISA-Entwicklung mit monoklonalen Antikörper gegen Hapten A

Während des Screenings nach Ak, die durch Immunisierung mit Hapten A entstanden sind, wurde eine Zelllinie entdeckt, die über einen längeren Zeitraum eine TCA-spezifische

Reaktion zeigte. Diese Zelllinie wurde einmal kloniert, stellte aber nach sechs Wochen die Antikörperproduktion ein. Es konnte so viel ZKÜ gewonnen werden, dass mehrere ELISAs durchgeführt werden konnten. Der ZKÜ wurde nicht aufgereinigt, da nicht ausreichende Mengen für eine Aufreinigung vorhanden waren. Er wurde im ELISA verdünnt in PBS aufgetragen. Abbildung 14 zeigt das Ergebnis dieses ELISAs. Die Nachweisgrenze (IC_{80} -Wert) für TCA liegt bei 1,5 mg/l, der Testmittelpunkt (IC_{50} -Wert) bei 3,5 mg/l.

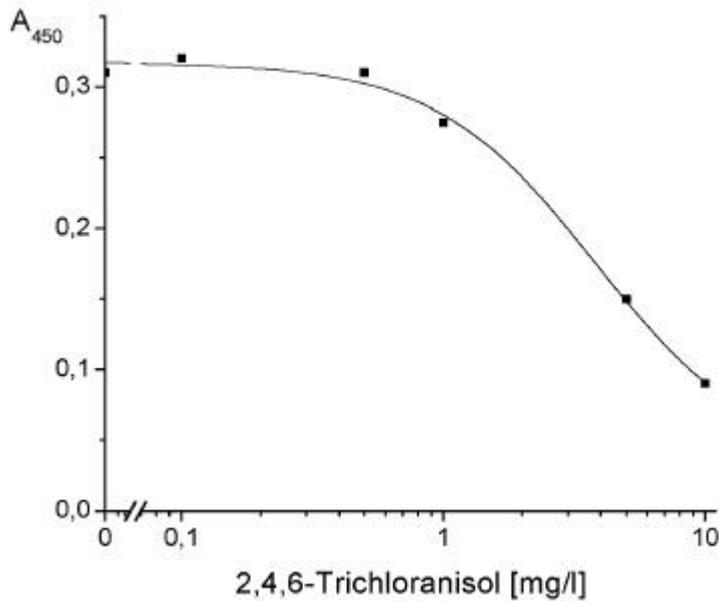


Abbildung 14: TCA-ELISA mit mAk gegen Hapten A.

3.4 Entwicklung eines TCA-ELISAs mit dem monoklonalen Antikörper Rami

Die ersten Schritte der ELISA-Entwicklung wurden mit ZKÜ durchgeführt. Aufgrund der begrenzten Lagerfähigkeit von ZKÜ und des unterschiedlichen IgG-Gehaltes unterschiedlicher ZKÜ-Chargen wurde im späteren Verlauf der ELISA-Entwicklung nur noch aufgereinigter mAk verwendet. Bei der ELISA-Entwicklung wurden verschiedene Konzentrationen der Beschichtungskonjugate, unterschiedliche Blockierungsmittel, verschiedene Konzentrationen des TCA-spezifischen mAk Rami und des POD-markierten Sekundarantikörper untersucht.

ELISA-Platten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,5-5 mg/ml) BSA-Hapten C beschichtet. Dabei stellte sich eine Konzentration von 1 µg/ml BSA-Hapten C als optimal heraus (siehe ELISA Kap. 2.7.7). Geringere Konzentrationen führten zu einer verminderten Nachweisgrenze. Größere Konzentrationen als 1 µg/ml BSA-Hapten C bewirkten im Endeffekt einen Anstieg der Absorption. Dieser Anstieg führte aber zu einem Sensitivitätsverlust des ELISA. 1 µg/ml BSA-Hapten C wurde als optimale Konzentration zum Beschichten für alle weiteren ELISA mit dem mAk Rami gewählt.

Um eine unspezifische Bindung an der Polystyroloberfläche der Mikrotiterplatte zu verhindern, wurde nach dem Beschichtungsschritt im ELISA ein Blockierungsschritt eingefügt. TCA-spezifische Antikörper sollten nur an das Beschichtungskonjugat binden. Es wurden unterschiedliche Blockierungsreagenzien (Magermilchpulver, OVA, BSA, Gelatine) eingesetzt und untersucht. Dabei stellte sich Gelatine als bestes Blockierungsmittel heraus (Abb. 15). Gelatine bewirkt im Vergleich zu BSA ein niedrigeres Hintergrundrauschen (A_{\min}). Magermilchpulver (MMP) hat hingegen störende Einflüsse und kann in diesem ELISA nicht eingesetzt werden. Desweiteren wurde Gelatine in verschiedenen Konzentrationen getestet. Zwischen einem und drei % Gelatine waren keine Unterschiede im ELISA festzustellen. In diesem Konzentrationsbereich lag auch die optimale Konzentration für Gelatine. Um zu überprüfen, ob der mAk Rami nur an Gelatine bindet, wurden Kavitäten ohne Beschichtungskonjugat nur mit Gelatine inkubiert. Danach wurde der ELISA wie in Kap. 2.7.7 beschrieben fortgesetzt. Bei der Auswertung dieses Versuches zeigte sich kein

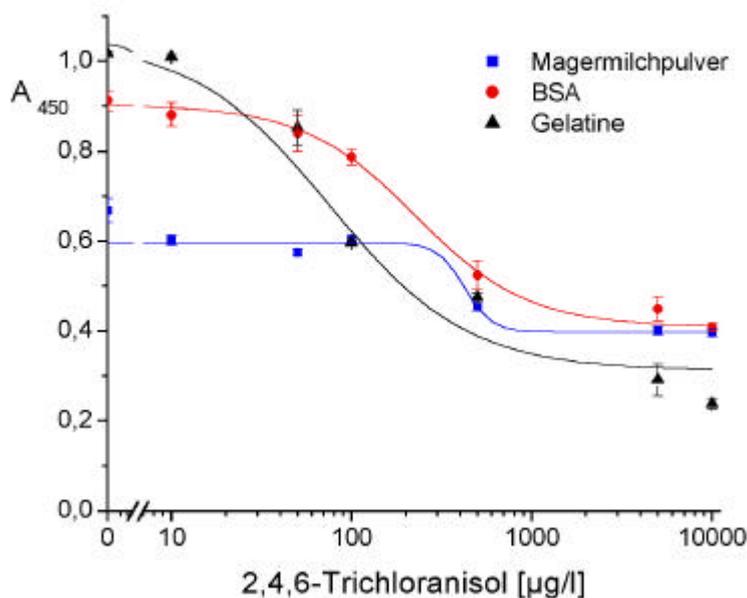


Abbildung 15: Unterschiedliche Blockierungsmittel im TCA-ELISA mit dem mAk Rami.

erhöhtes Hintergrundrauschen, was darauf schließen ließ, dass der mAk Rami nicht an Gelatine bindet. Außerdem wurde das Bindungsverhalten des Sekundärantikörpers an Beschichtungs- und Blockierungsreagenz untersucht. Der Sekundärantikörper zeigte weder Bindungsfähigkeit an das Beschichtungskonjugat noch an Gelatine.

Der nächste Schritt der ELISA-Entwicklung bestand in der Bestimmung der optimalen Ak-Konzentrationen. Dazu wurde der TCA-spezifische mAk Rami in dem in Kap. 2.7.7 beschriebenen ELISA in unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen. Es wurde die Verdünnungsstufe gesucht, die die beste Nachweisgrenze für TCA und den besten Testmittelpunkt ermöglicht. Als beste Verdünnungsstufe für den mAk Rami (1 mg/ml Stammlösung) ergab sich 1:15.000.

Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Es wurde die Konzentration gesucht, die ein möglichst geringes Hintergrundrauschen mit einer maximalen Absorption um die 1,0 ermöglicht. Es stellte sich heraus, dass sich eine maximale Absorption um 1,0 mit dem eingesetzten Sekundärantikörper nicht erreichen ließ. Die maximale Absorption pendelte sich um 0,5 ein. Eine Absorptionssteigerung durch geringere Verdünnung des Sekundärantikörpers führte zu Sensitivitätsverlusten. Die optimale Verdünnungsstufe des Sekundärantikörpers lag bei 1:5.000 bis 1:20.000. Es musste bei jeder

neuen Sekundärantikörpercharge eine Titerbestimmung durchgeführt werden, um für den neuen Antikörper die optimale Konzentration zu ermitteln. Die Sekundärantikörperchargen gleicher Produktnummer schwankten in ihrer Verdünnung, in der sie im ELISA eingesetzt werden konnten. Die Bindungseigenschaften des Sekundärantikörpers mit den Beschichtungskonjugaten und Gelatine wurden überprüft. Dazu wurde ebenfalls der in Kap. 2.7.7 beschriebene ELISA ohne TCA-Standards und dem mAk Rami durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass der Sekundärantikörper weder eine Reaktion mit den Beschichtungskonjugaten noch mit Gelatine eingeht.

3.4.1 Optimierter TCA-ELISA für Hapten C-spezifische mAk

Die oben angeführten Untersuchungen führten zu dem in Kap. 2.7.7 beschriebenen optimierten TCA-ELISA mit dem mAk Rami. Beschichtet wurde mit 1 µg/ml BSA-Hapten C, gefolgt von einem Blockierungsschritt mit 3 % Gelatine. Es schloss sich die erste Immunreaktion mit dem mAk Rami und TCA-Standards an. Diese Immunreaktion wurde von POD-markierten Sekundärantikörpern detektiert, die mit Substrat und Chromogen eine Farbreaktion lieferten. Dieser optimierte ELISA führte zu der in Abbildung 16 aufgeführten Kalibrationskurve.

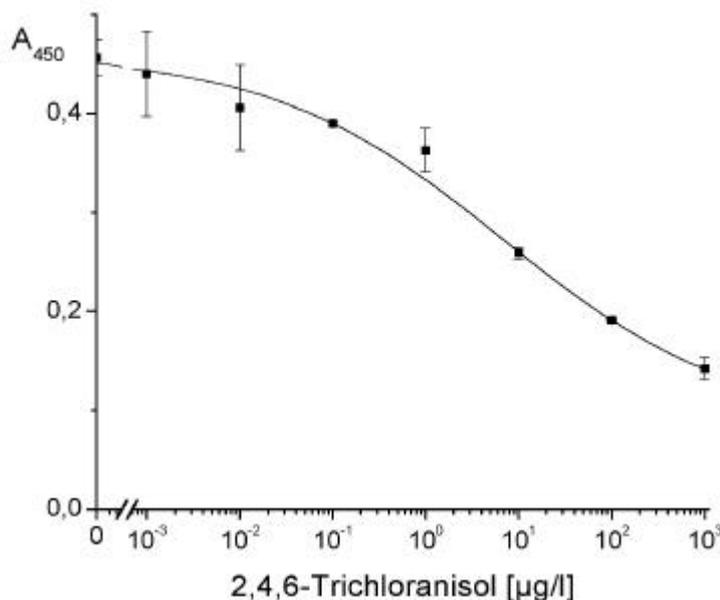


Abbildung 16: Optimierter TCA-ELISA mit dem mAk Rami.

Der Testmittelpunkt liegt bei ca. 4 µg/l und die Nachweisgrenze bei 0,133 µg/l TCA. Zur Steigerung der Sensivität und der Absorption wurde ein Verstärkersystem eingeführt.

3.4.2 Ethanolverträglichkeit

Da Wein Ethanol enthält und Kork mit Ethanol extrahiert wurde, wurde die Verträglichkeit des mAk Rami mit Ethanol überprüft. Dazu wurde der in Kap. 2.7.7 beschriebene ELISA eingesetzt und in einem Punkt verändert: TCA-Standards wurden nicht in PBS, sondern in PBS mit einem definierten Anteil Ethanol verdünnt. In Abbildung 17 werden zwei unterschiedliche Kalibrationskurven miteinander verglichen. Eine Verdünnung der TCA-Standards nur in PBS und eine Verdünnung der TCA-Standards in PBS mit 10 % Ethanol. Die Absorption sinkt bei einer Verdünnung der TCA-Standards in PBS mit 10 % Ethanol von 0,5 auf 0,375 (Abb. 17). Die Nachweisgrenze dieses ELISA verschlechtert sich von 0,1 $\mu\text{g/l}$ TCA auf ca. 5 $\mu\text{g/l}$ TCA, d.h. es ist ein deutlicher Sensitivitätsverlust zu verzeichnen. In Abbildung 18 sind Ergebnisse eines ELISA mit TCA-Standards in 1 und in 5 % zu sehen. Eine Verdünnung in 1 und 5 % Ethanol führt zu keinen Verlusten der maximalen Absorption, jedoch zu signifikanten Minderungen der Nachweisgrenze und des Testmittelpunktes.

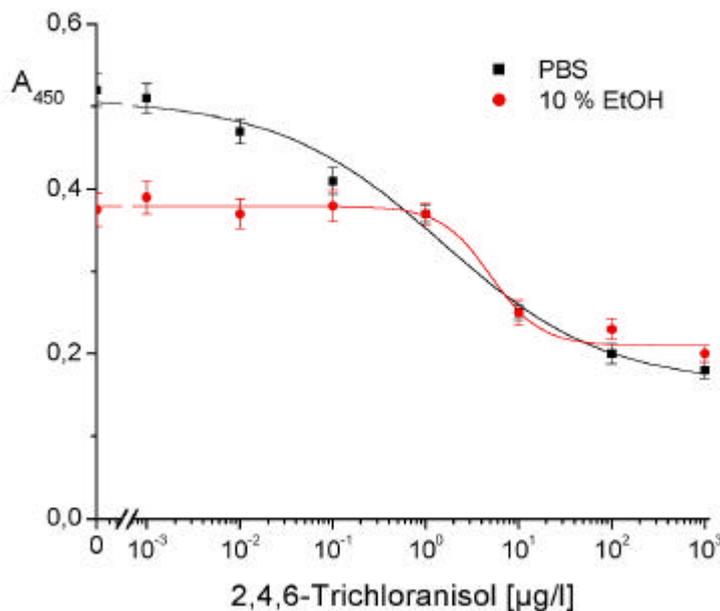


Abbildung 17: TCA-ELISA mit dem mAk Rami in PBS und in 10 % Ethanol.

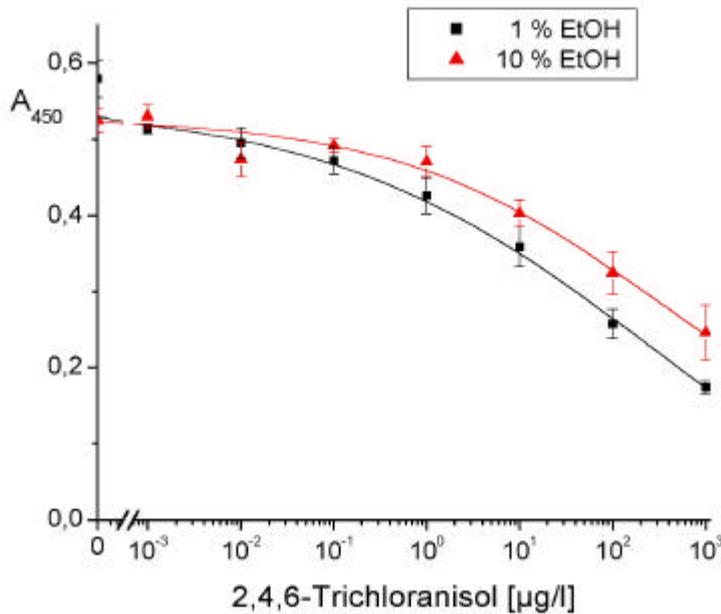


Abbildung 18: TCA-ELISA mit dem mAk Rami und TCA in 1 und 5 % Ethanol.

3.4.3 TCA-ELISA mit Verstärkersystem

Zur Verbesserung der Nachweisgrenze wurde ein Verstärkersystem mit Streptavidin-Biotin eingesetzt (vgl. Abb. 8). Der POD-markierte Sekundärantikörper wurde durch einen biotinierten Ak ersetzt. Im nächsten Schritt wurde Streptavidin-POD zugegeben. Bereits gekoppeltes Streptavidin-POD zeigte die gleiche Sensitivitätssteigerung wie Streptavidin, das mit Biotin-POD präinkubiert werden musste (eigene Untersuchungen an Ak gegen Vitellogenin). Da bei identischer Sensitivitätssteigerung durch die Verwendung von Streptavidin-POD ein Inkubationsschritt weniger als bei dem Gebrauch von Streptavidin und Biotin-POD notwendig ist, wurde bereits gekoppeltes Streptavidin-POD vorgezogen. Die Steigerung der Farbreaktion beruht auf dem größeren Umsatz von Substrat durch POD. An einem mit POD-markiertem Sekundärantikörper befindet sich ein Molekül POD. Im Gegensatz dazu können mehrere Moleküle Biotin an solche Antikörper binden, an die wiederum mehrere Streptavidin-POD-Konjugate koppeln können. Pro biotiniertem Antikörper kann mehr POD gekoppelt werden.

Durch den Einsatz des ABC-Verstärkersystems konnte die Nachweisgrenze des mAk Rami auf ca. 20 ng/l TCA gesenkt werden (Abb. 19 und 20). Der Testmittelpunkt lag bei 6 µg/l TCA. Die Absorption wurde um 0,2 nach oben geschoben. Die Nachweisgrenze im ELISA

mit Verstärkersystem variierte von 0,02 (Abb. 19) bis 0,07 $\mu\text{g/l}$ TCA. In Abbildung 20 ist eine Nachweisgrenze von 0,07 $\mu\text{g/l}$ und ein Testmittelpunkt von 1,5 $\mu\text{g/l}$ TCA zu erkennen.

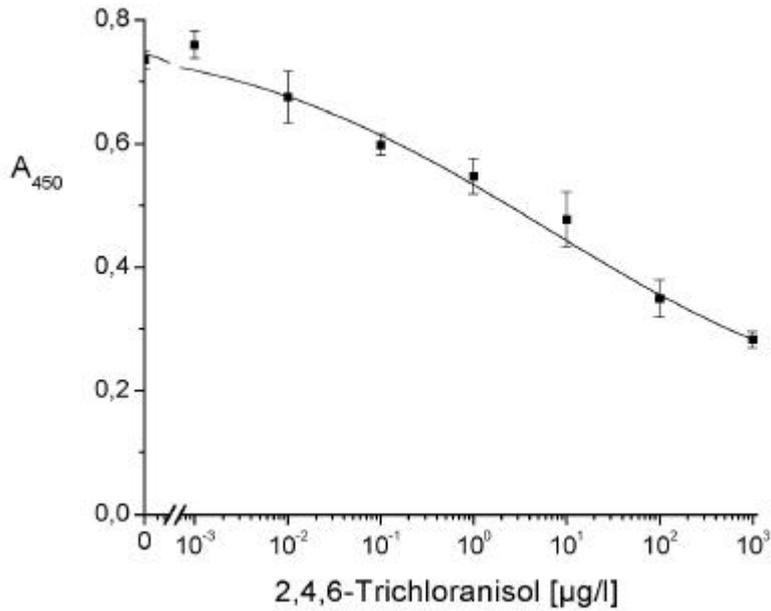


Abbildung 19: TCA-ELISA mit Verstärkersystem.

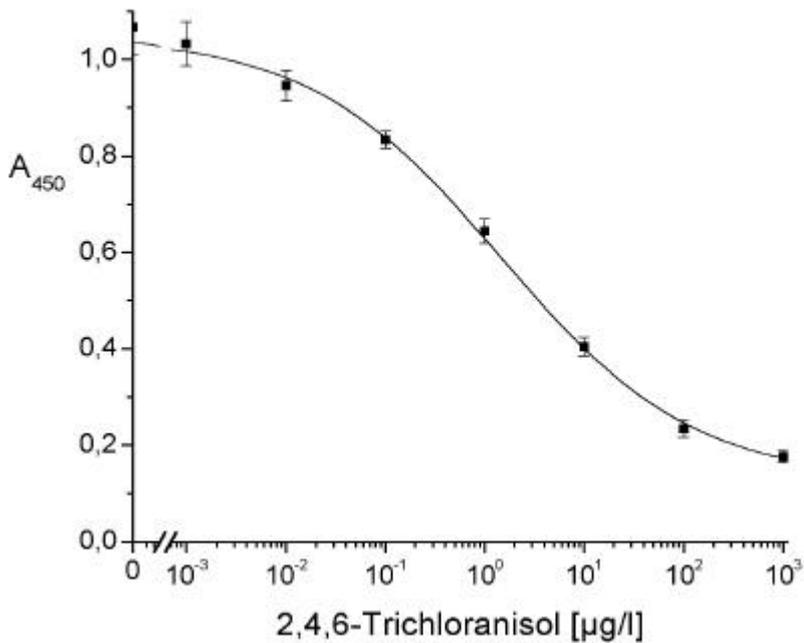


Abbildung 20: TCA-ELISA mit Verstärkersystem.

3.4.4 Kreuzreaktivitäten

Unter Kreuzreaktivität oder Querempfindlichkeit eines Ak versteht man die Eigenschaft dieses Ak, andere Stoffe als den Zielanalyten zu binden. Bei der Bestimmung der Kreuzreaktivität wird die Bindung des Ak mit dem Zielanalyten und mit einem oder mehreren anderen Substanzen verglichen. Es wurde das Bindungsverhalten des mAk Rami mit TCA strukturell ähnlichen Substanzen, wie anderen Choranisolen und Chlorphenolen bestimmt. Dazu wurde der in Kap. 2.7.7 beschriebene ELISA eingesetzt. Außer der TCA-Standardreihe wurden auch Standardreihen der eventuell kreuzreagierenden Substanzen in den selben Konzentrationen wie die TCA-Standardreihe aufgetragen. Anschließend wurde am Testmittelpunkt verglichen. Tabelle 9 zeigt die berechnete Querempfindlichkeiten des mAk Rami. Die größte Kreuzreaktivität von 137 % wurde zu Pentachlorphenol festgestellt. Die nächst größeren Querempfindlichkeiten von 71 % zeigten 2,3,4-Trichloranisol und Pentachlorbenzol. 2,3,6-Trichloranisol, das sich nur in einer Position eines Chloratoms von 2,3,4-Trichloranisol unterscheidet, weist im Gegensatz zu 2,3,4-Trichloranisol eine um 53 % niedrigere Kreuzreaktivität von 18 % auf.

Tabelle 9: Kreuzreaktivitäten des mAk Rami

| | Kreuzreaktivität |
|----------------------|------------------|
| 2,4,6-Trichloranisol | 100 % |
| 2,3,4-Trichloranisol | 71 % |
| 2,3,6-Trichloranisol | 18 % |
| Pentachlorphenol | 137 % |
| Pentachlorbenzol | 71 % |
| 1,3,5-Trichlorbenzol | 0 % |
| 2,4,6-Trichlorphenol | 25 % |

3.5 Entwicklung eines TCA-ELISA mit dem Hapten B-spezifischen monoklonalen Antikörper Hbab

Der mAk Hbab ist aus einer Immunisierung mit KLH-Hapten B hervorgegangen. Es handelt sich um einen mAk, der von einer anderen Zelllinie als der mAk Rami hergestellt wird. Aus diesen Gründen musste für diesen mAk eine neue Bestimmung der Testparameter für den ELISA vorgenommen werden. Die einzelnen Inkubationsschritte des ELISA wurden ähnlich wie für den mAk Rami durchgeführt. Die überprüften Testparameter waren verschiedene Beschichtungskonzentrationen von BSA-Hapten B, unterschiedliche Blockierungsreagenzien, und verschiedene Konzentrationen des mAk Hbab und des POD-markierten Sekundärantikörpers.

Zur Beschichtung im ELISA wurden BSA-Hapten B-Konjugate eingesetzt. Diese Konjugate wurden in unterschiedlichen Verdünnungsstufen (0,5- 5 µg/ml) getestet. Dabei wurde eine Konzentration von 1 µg/ml als optimale Konzentration zur Beschichtung der ELISA-Platten ermittelt. Der nächste Schritt war die Bestimmung des besten Blockierungsmittels.

Dazu wurden unterschiedliche Blockierungsmittel (Gelatine, BSA, OVA, Magermilchpulver) in dem in Kap. 2.7.6 beschriebenen ELISA eingesetzt. In Abbildung 21 werden die Ergebnisse einer Blockierung mit OVA und Gelatine verglichen. Es ließ sich feststellen, dass eine Blockierung mit Gelatine zu einer stärkeren Steigung der Kurve im linearen Bereich führt. Eine Blockierung mit OVA bewirkt eine geringere Steigung, hat aber im Vergleich zu Gelatine den Vorteil einer besseren Nachweisgrenze von TCA. Der Testmittelpunkt für den ELISA mit OVA-Blockierung in Abbildung 21 beträgt 0,3 µg/l, die Nachweisgrenze für TCA ca. 0,01 µg/l. Eine Gelatineblockierung bewirkt einen IC_{50} -Wert von 0,82 µg/l und einen IC_{80} -Wert von 0,08 µg/l TCA. Aufgrund der niedrigeren Nachweisgrenze wurde OVA als Blockierungsmittel gewählt. Zwischen Blockierungen mit BSA, OVA und Magermilchpulver bestand kaum ein Unterschied. Sie konnten mit gleichem Erfolg im ELISA eingesetzt werden. In Abbildung 22 wird das Ergebnis einer Blockierung mit OVA in unterschiedlichen Konzentrationen dargestellt.

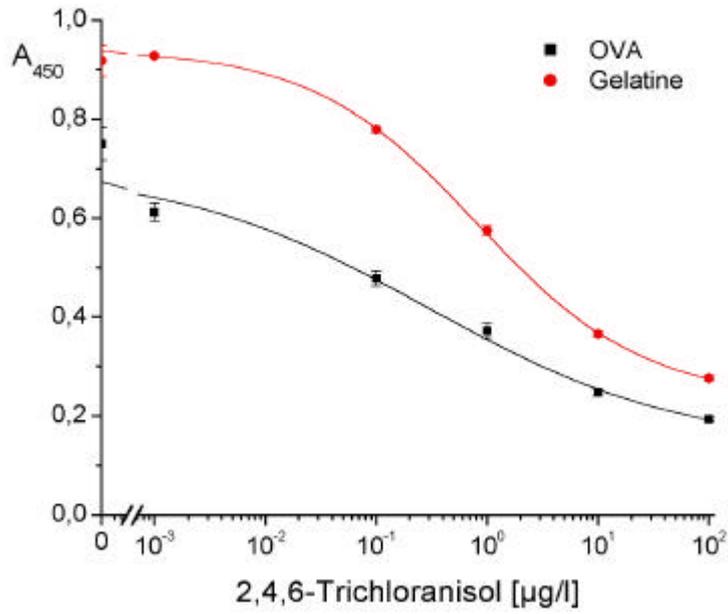


Abbildung 21: TCA-ELISA mit dem mAk Hbab und OVA und Gelatine als Blockierungsmittel.

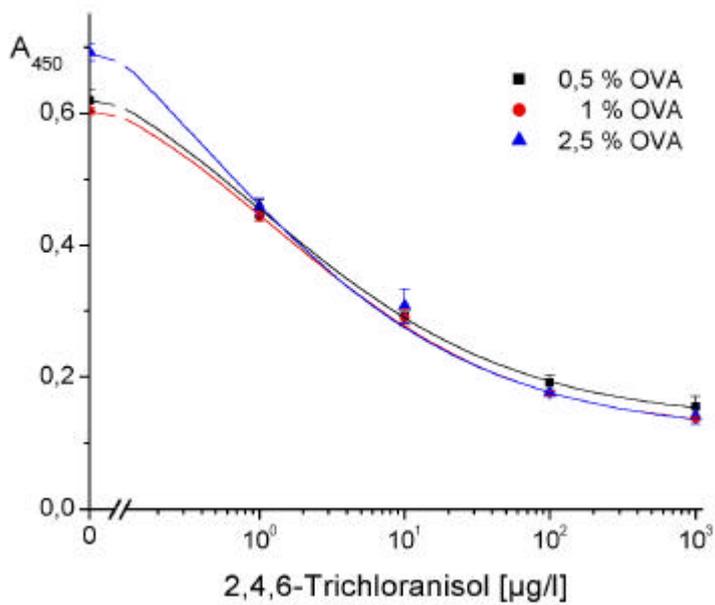


Abbildung 22: TCA-ELISA mit dem mAk Hbab und OVA in verschiedenen Konzentrationen.

Es ist zu erkennen, dass die verschiedenen OVA-Konzentrationen kaum einen Einfluss auf den ELISA haben. Eine Blockierung mit 2,5 % OVA zeigt eine um 0,06 höhere Absorption, dies war aber nur auf diesen ELISA beschränkt. Es wurde eine Konzentration von 1 % OVA als Standardkonzentration zum Einsatz im ELISA ausgewählt.

Nach Bestimmung der optimalen Beschichtungskonzentrationen und Ermittlung des besten Blockierungsmittel wurden die Antikörperkonzentrationen gesucht, die am besten für diesen ELISA geeignet sind. Es wurde der TCA-spezifische mAk Hbab in verschiedenen Verdünnungen im ELISA eingesetzt. Der ELISA wurde wie in Kap. 2.7.6 beschrieben durchgeführt. Einzige Veränderung war die Konzentration des TCA-spezifischen mAk Hbab. Als Stammlösung diente 1 mg/ml Hbab. 1:1.000 erwies sich als die optimale Verdünnung. Sie führte zu einer maximalen Absorption von ca. 1,0 bei einem Hintergrundrauschen von 0,15. Eine Verdünnung von 1:2.000 bedeutete eine leicht verminderte maximale Absorption bei fast identischem Hintergrundrauschen (Abb. 23).

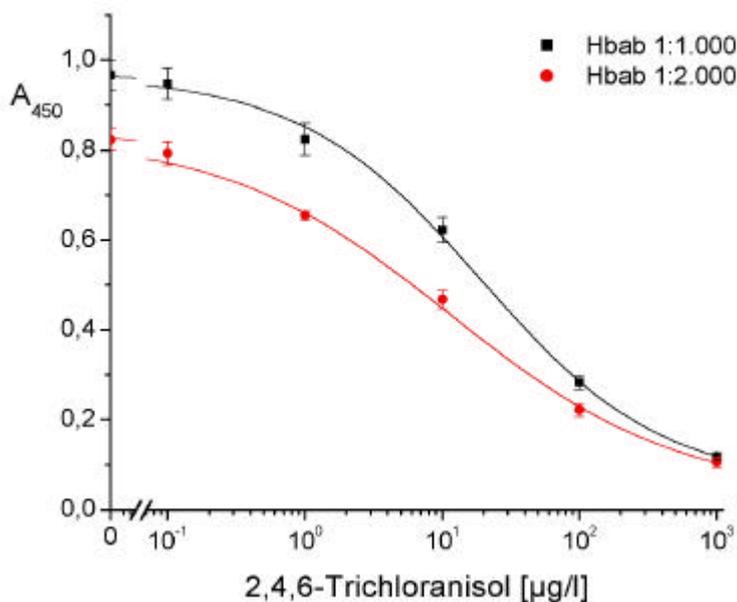


Abbildung 23: TCA-ELISA mit dem mAk Hbab in zwei unterschiedlichen Verdünnungen.

Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls in verschiedenen Verdünnungsstufen in dem in Kap. 2.7.6 aufgeführten ELISA eingesetzt. Dabei stellte sich ebenfalls heraus, dass für jede Sekundärantikörpercharge eine neue Titerbestimmung erfolgen musste, um die optimale Verdünnungsstufe für den jeweiligen Sekundärantikörper zu finden. Die beste Verdünnung für den POD-markierten Sekundärantikörper lag zwischen 1:20.000 und 1:40.000. Abbildung

24 zeigt die Ergebnisse eines ELISA mit 2 Verdünnungsstufen des Sekundärantikörpers. Der mAk Hbab war 1:1.000 verdünnt. Es war mit dem eingesetzten Sekundärantikörper nicht immer eine Absorption von 1 erreichbar. Grund dafür sind höchstwahrscheinlich Qualitätsschwankungen zwischen den einzelnen Sekundärantikörperchargen.

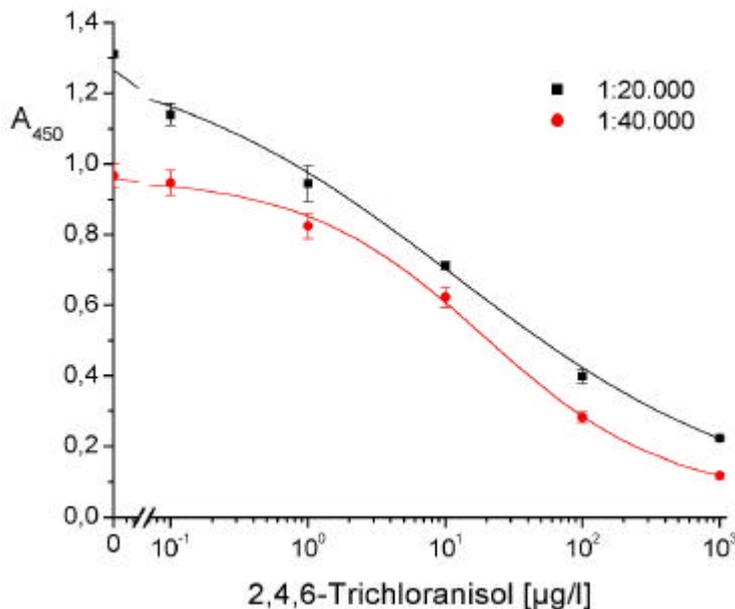


Abbildung 24: TCA-ELISA mit dem mAk Hbab und dem Sekundärantikörper in zwei verschiedenen Verdünnungen.

3.5.1 Optimierter TCA-ELISA mit dem mAk Hbab

Die Verbesserung der einzelnen Inkubationsschritte führte zu dem in Kap. 2.7.6 beschriebenen optimierten TCA-ELISA mit dem mAk Hbab. ELISA-Platten wurden mit 1 µg/ml BSA-Hapten B beschichtet. Es folgte eine Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 1 % BSA. Im Anschluss wurden TCA-Standards und der mAk Hbab inkubiert. Diese primäre Immunreaktion wurde mit einem POD-markiertem Sekundärantikörper unter Verwendung von Substrat und Chromogen sichtbar gemacht. Das Resultat dieses optimierten ELISA ist aus Abbildung 25 entnehmbar. Die Nachweisgrenze für TCA liegt bei 0,01 µg/l, der Testmittelpunkt ist bei 27 µg/l. Aufgrund des niedrigen IC₈₀-Wertes von 0,01 µg/l für TCA wurde auf die Einführung eines Verstärkersystems verzichtet. Die Nachweisgrenze lag unter der geforderten Nachweisgrenze von 0,25 µg/l, und war somit ohne Verstärkersystem für die Analytik vollkommen ausreichend.

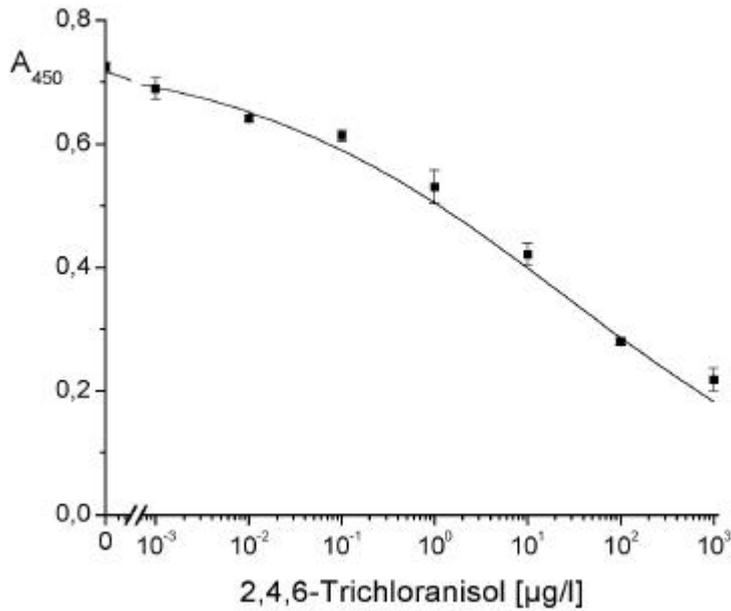


Abbildung 25: Optimierter TCA-ELISA mit dem mAk Hbab.

3.5.2 Kreuzreaktivitäten des monoklonalen Antikörpers Hbab

Der TCA-ELISA (Kap. 2.7.6) wurde dazu verwendet, die Querempfindlichkeiten des mAk Hbab zu bestimmen. Dazu wurden TCA-Standards und Standards des eventuell kreuzreagierenden Stoffes auf einer ELISA-Platte aufgetragen. Ansonsten wurde der ELISA wie beschrieben durchgeführt. Es wurden von denselben Substanzen wie auch bei dem mAk Rami die Kreuzreaktivitäten bestimmt (Tab. 10).

Tabelle 10: Kreuzreaktivitäten des mAk Hbab.

| | Kreuzreaktivität |
|----------------------|------------------|
| 2,4,6-Trichloranisol | 100 % |
| 2,3,4-Trichloranisol | 45 % |
| 2,3,6-Trichloranisol | 143 % |
| Pentachlorphenol | 4 % |
| Pentachlorbenzol | 87 % |
| 1,3,5-Trichlorbenzol | 0 % |
| 2,4,6-Trichlorphenol | 0 % |

Die größte Kreuzreaktivität mit 143 % wurde zu 2,3,6-Trichloranisol festgestellt. Im Gegensatz dazu wurde zu 2,3,4-Trichloranisol nur eine Kreuzreaktivität von 45 % gemessen. Keine Querempfindlichkeiten wurden zu 1,3,5-Trichlorbenzol und 2,4,6-Trichlorphenol festgestellt.

3.5.3 Ethanolverträglichkeit

Wie auch der mAk Rami wurde der mAk Hbab auf seine Verträglichkeit mit Ethanol untersucht. Der ELISA mit dem mAk Hbab wurde mit Standards in 0, 1 und in 5 % Ethanol durchgeführt (Abb. 26). Die Ethanolverträglichkeit wurde überprüft, da bei einer späteren Probenmessung sowohl in Kork- als auch in Weinproben Ethanol enthalten ist.

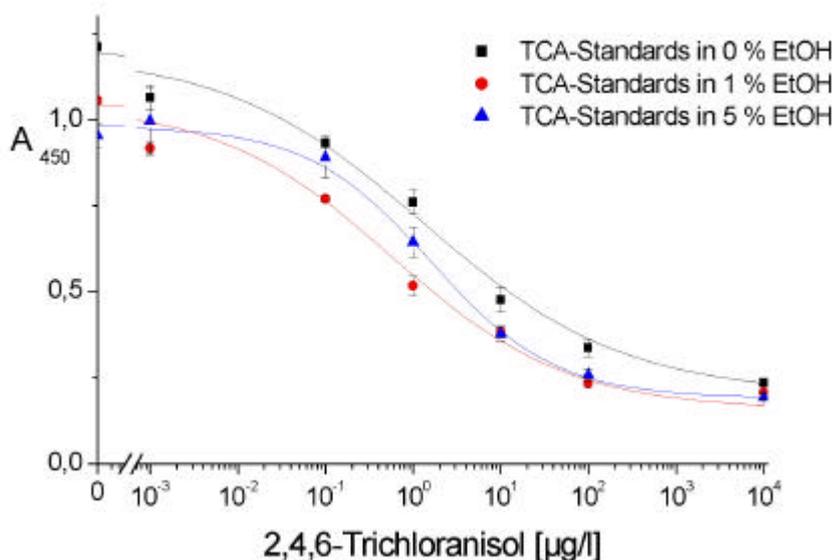


Abbildung 26: TCA-ELISA mit dem mAk Hbab in verschiedenen Ethanolkonzentrationen.

Die maximale Absorption nimmt mit steigendem Ethanolgehalt ab. Die Nachweisgrenze für TCA liegt bei allen drei Ethanolkonzentrationen im selben Bereich. Ohne Ethanol liegt sie in Abbildung 26 bei 0,035 µg/l TCA, mit 5 % Ethanol bei 0,023 µg/l.

3.6 Probenmessung mit dem mAk Rami und Hbab

Der TCA-ELISA mit dem mAk Rami wurde zur Messung von Weinproben eingesetzt. Dazu wurde Wein, der sensorisch auf das Nichtvorhandensein von TCA geprüft wurde, mit einer definierten Menge an TCA versetzt. Dieser Weinstandard wurde 1/100 in PBS verdünnt.

Tabelle 11: Wiederfindung von TCA bei der Messung von Weinproben mit dem mAk Rami und Hbab (Mittelwerte mit Standardabweichung n = 3).

| zugegebenes TCA | Detektion mit Rami ($\mu\text{g/l}$) | Detektion mit Hbab ($\mu\text{g/l}$) |
|---------------------|--|--|
| 1 $\mu\text{g/l}$ | $1,48 \pm 0,07$ | $1,36 \pm 0,36$ |
| 10 $\mu\text{g/l}$ | $8,85 \pm 0,9$ | $6,7 \pm 1,5$ |
| 100 $\mu\text{g/l}$ | $95,6 \pm 11$ | $103,6 \pm 13,04$ |

Dabei stellte sich heraus, dass der Hintergrund bei Weiß- oder Rotweinproben sehr hoch ist. Erst ab einer Verdünnungsstufe von 1:100 fielen die Proben in einen messbaren Bereich. Tabelle 11 zeigt, dass damit brauchbare Ergebnisse erzielt werden.

Mit dem mAk Hbab wurden auch Korkproben gemessen. Korkproben wurden wie folgt vorbereitet. Ein Gramm kleingehäckselter Kork, der ebenfalls sensorisch auf das Nichtvorhandensein von TCA überprüft wurde, wurde 24 h bei Zimmertemperatur in 10 ml 99 % Ethanol extrahiert. Dabei stellte sich heraus, dass 10 ml Ethanol fast nicht ausreichten, um 1 g Kork komplett aufzunehmen. Nach der Extraktion wurde der Überstand filtriert, anschließend wurde TCA zugesetzt. Es wurden wiederum unterschiedliche Verdünnungsstufen angesetzt, die im ELISA bestimmt wurden. TCA-Standards und die zu messenden verdünnten Korkextrakte und Weinproben wurden mit dem in Kap. 2.7.6 erwähnten ELISA bestimmt. Korkextrakt ergab bei einer 1:20 Verdünnung eine Wiederfindung von 80 % des zugegebenen TCA. Bei einer Verdünnung von 1:50 wurden 125 % des enthaltenen TCA wiedergefunden (Tab. 12). Korkextrakte wurden nicht weiter als 1:50 verdünnt, da die Wiederfindung bei dieser Verdünnung im Bereich des zugegebenen TCA lag. Kork- und Weinproben wurden innerhalb eines ELISAs mit dreifacher Wiederholung gemessen. Die Standardabweichung des Mittelwertes dieser Dreifachmessung lag zwischen 10 und 15 %.

Tabelle 12: Wiederfindungsraten von zugesetztem TCA bei einer Messung von Korkproben mit dem mAk Hbab.

| Verdünnung | Korkextrakt (Wiederfindung) |
|---------------|-----------------------------|
| 1:20 (4 µg/l) | 80 % |
| 1:50 (1 µg/l) | 125 % |

Beide mAk können zur Messung von Realproben eingesetzt werden. Es ist möglich mit beiden mAk Weinproben zu bestimmen. Mit dem mAk Hbab können weiterhin auch Korkproben gemessen werden. Es wurde soviel TCA dotiert, so dass sich der TCA-Gehalt der Proben im Testmittelpunkt der ELISAs befand. Dort ist eine Messung am exaktesten durchzuführen.

3.7 Massenproduktion

Eine Massenproduktion des Hapten A-mAk konnte nicht durchgeführt werden, da die Zelllinie nach sechs Wochen keine mAk mehr herstellte. Bei denen in den nächsten Kapiteln charakterisierten mAk, handelt es sich um zwei verschiedene mAk. Der eine ist aus einer Immunisierung mit Hapten C hervorgegangen (Rami) und der andere durch eine Immunisierung mit Hapten B (Hbab).

Zur Massenproduktion wurden die Zelllinien Rami und Hbab in großen Zellkulturflaschen (225 cm²) herangezogen. Es erfolgte eine einwöchige Umstellung von Normalmedium (NM) auf serumfreies Medium (SFM). NM enthält einen hohen Anteil an Proteinen (3,5-4,5 mg/ml) (Marx, 1997), hauptsächlich BSA (60 %) und Rinder-IgG. Diese Proteine können störend im ELISA auftreten. Rinder-IgG kann durch Affinitätschromatographie entfernt werden. Es lässt sich bei einem pH-Wert von 8 von Protein A lösen (Peters und Baumgarten, 1990). Die unterschiedlichen IgG-Subklassen eluieren erst bei niedrigeren pH-Werten, beginnend mit IgG1 zwischen 6-8 gefolgt von allen anderen Subklassen bei pH-Werten unter 6 (Seppälä *et al.*, 1983). Jedoch konkurrieren Rinder-IgG und Maus-IgG um die vorhandenen Bindungsstellen am Protein A. Es kann weniger Antikörper aufgereinigt werden, da eine geringere Kapazität für Maus-IgG am Protein A vorhanden ist, weil Bindungsplätze von Rinder-IgG belegt sind. Aus diesem Grund und um eventuelle Verunreinigungen der aufgereinigten mAk durch andere Proteine wie BSA zu verhindern, wurde eine Antikörpermassenproduktion in SFM durchgeführt. Die Umstellung von NM auf SFM war

bei beiden massenproduzierten mAk unproblematisch. Es konnte auch ohne Adaptionphase auf SFM umgestellt werden. Mit und ohne Adaptionphase wurde ein sehr gutes Zellwachstum erzielt.

3.7.1 Massenproduktion von Hapten B-spezifischen monoklonalen Antikörpern

Die Massenproduktion des mAk Hbab wurde im Biofermenter Miniperm vollzogen. Alle zwei bis drei Tage wurden mAk geerntet; die Zellzahl wurde im Produktionsmodul bestimmt. Durchschnittlich waren in jedem geernteten ml 0,2 mg mAk enthalten, und es wurde eine maximale Zellzahl von 6×10^6 Zellen pro ml im Produktionsmodul erreicht (Tab. 9).

Tabelle 13: 20tägige Massenproduktion des mAk Hbab im Biofermenter Miniperm.

| | |
|-----------------------------|-------------------|
| max. Zellzahl pro ml | 6×10^6 |
| Zellzahl insgesamt | $2,1 \times 10^8$ |
| max. IgG-Konzentration / ml | 0,2 mg |
| Gesamt-IgG [mg] | 10 |
| Mediumverbrauch in l | 1,75 |

3.7.2 Massenproduktion von Hapten C-spezifischen monoklonalen Antikörpern

Eine Massenproduktion des mAk Rami wurde im Biofermenter Miniperm und im Biofermenter CL 350 durchgeführt. Ausreichende Zellquantitäten wurden zu Beginn der Kultur in die Fermenter gegeben. Alle zwei bis drei Tage erfolgte eine Bestimmung der Zellzahl, und mAk wurden geerntet. Im Fermenter CL 350 wurden nach 17tägiger Kultur 26 mg IgG hergestellt und eine maximale Zelldichte von $5,5 \times 10^6$ Zellen pro ml erreicht. Dies bedeutete, im 15 ml umfassenden Produktionsmodul waren insgesamt $8,25 \times 10^7$ Zellen enthalten. Im Minipermsystem wurden in 21tägiger Kultur 55 mg IgG produziert. Die maximale Zelldichte erreichte 7×10^6 Zellen pro ml. Dies waren insgesamt in 35 ml beinhaltenden Produktionsmodul $2,45 \times 10^8$ Zellen.

In Abbildung 27 und 28 werden die Zellzahlentwicklung und die IgG-Produktion der Massenvermehrung des mAk Rami im Fermenter Miniperm und in CL 350 dargestellt. In

Tabelle 9 werden unterschiedliche Kulturdaten der Massenproduktion im Fermenter CI 350 und im Miniperm nach 16tägiger Kulturdauer verglichen.

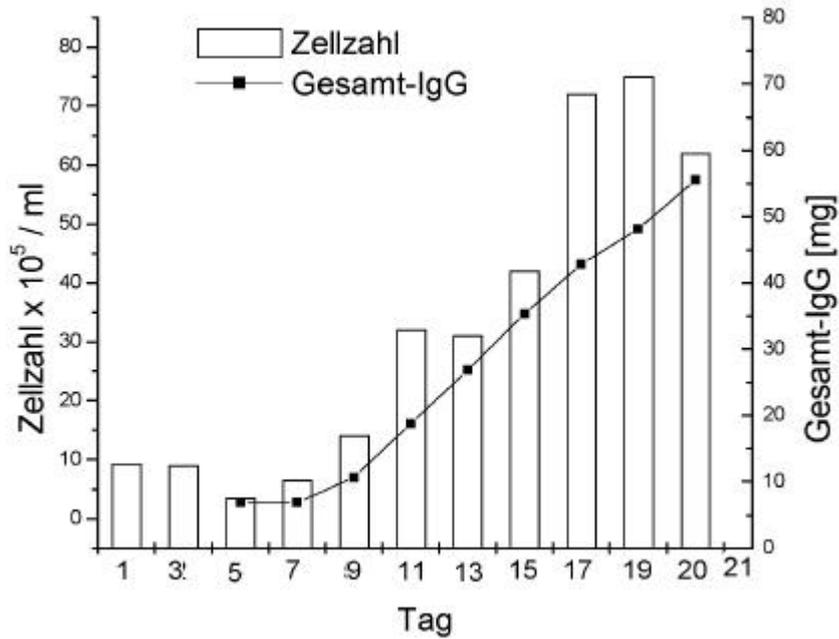


Abbildung 27: Massenproduktion des mAk Rami im Biofermenter Miniperm.

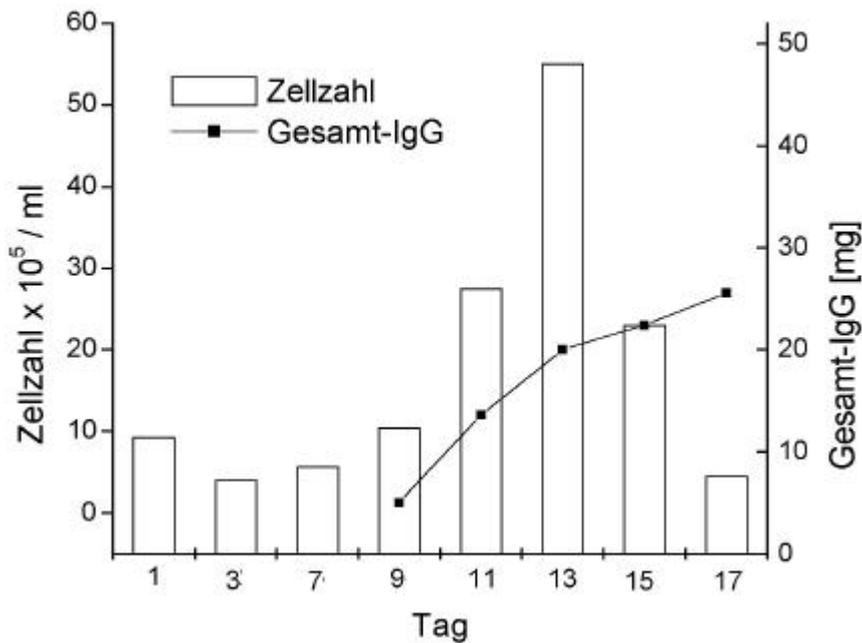


Abbildung 28: Massenproduktion des mAk Rami im Biofermenter CI 350.

**Tabelle 14: Vergleich der Massenproduktion in Miniperm und Cl 350 nach 16 Tagen
Kulturdauer des mAk Rami.**

| | Miniperm | CL 350 |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|
| max. Zellzahl pro ml | $4,2 \times 10^6$ | $5,5 \times 10^6$ |
| Zellzahl insgesamt | $1,5 \times 10^8$ | $0,8 \times 10^8$ |
| max. IgG-Konzentration / ml | 1,3 mg | 0,9 mg |
| Gesamt-IgG [mg] | 36 | 27 |
| Mediumverbrauch in l | 3,15 | 3,15 |

Der mAk Rami produzierte nach 21tägiger Kultur mehr IgG als der mAk Hbab in 20tägiger Kultur bei fast identischer Zellzahl pro ml von 6×10^6 (Hbab) und 7×10^6 (Rami). Rami lieferte eine mit 55 mg Gesamt IgG eine wesentlich größere IgG-Ausbeute als der mAk Hbab mit 10 mg Gesamt-IgG.

Die geernteten Zellkulturüberstände wurden entweder direkt aufgereinigt oder bis zur endgültigen Aufreinigung bei -20 °C gelagert.

3.7.3 Aufreinigung monoklonaler Antikörper

Die mAk wurden über Prosep A oder Protein A-Agarose aufgereinigt. Beide Verfahren zeigten keine Unterschiede und zeigten keine erkennbaren Vor- oder Nachteile. Die Handhabung der beiden Verfahren war identisch. Den einzigen Unterschied machten die eingesetzten Puffer. Abbildung 29 zeigt den Aufreinigungsverlauf von ZKÜ aus NM und SFM. Der Verlauf der Aufreinigung von ZKÜ aus NM zeigt drei Ausschläge (Peaks). Der erste Ausschlag ist auf Proteine des NM zurückzuführen, die nicht von Protein A gebunden werden. Der zweite Ausschlag wurde durch Rinder-IgG hervorgerufen, das mit einem anderen Puffer gleichen pH-Wertes eluiert wurde, und der dritte Ausschlag wurde durch das gewünschte Maus-IgG hervorgerufen.

Der Aufreinigungsverlauf von ZKÜ aus SFM zeigt nur zwei Ausschläge, den ersten durch nicht an Protein A bindende ZKÜ-Proteine und den zweiten durch Maus-IgG. Es fehlt der Ausschlag durch Rinder-IgG, das in SFM nicht vorhanden ist.

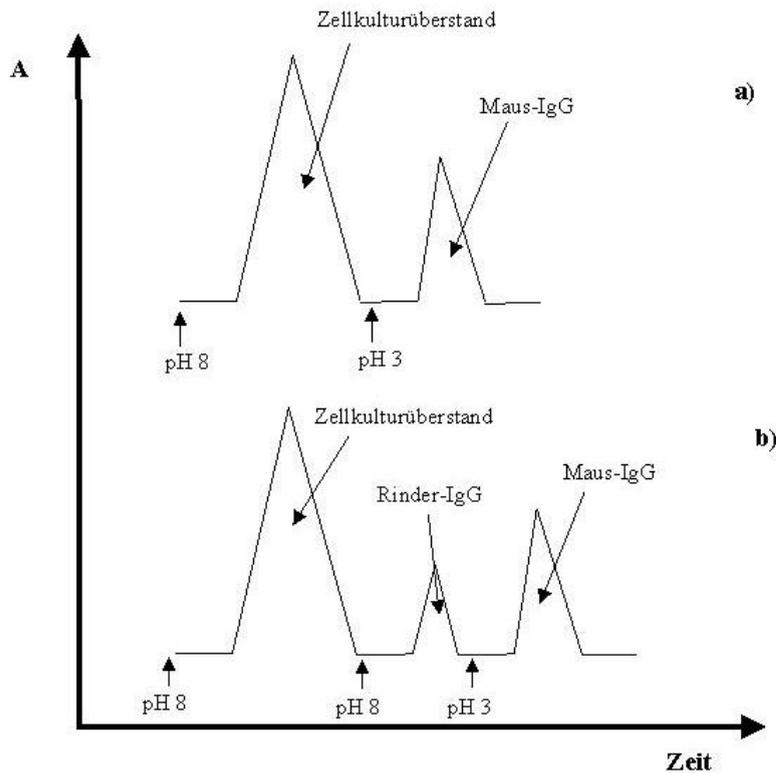


Abbildung 29: Photometrische Bestimmung des Proteingehaltes während der Aufreinigung von Zellkulturüberstand aus serumfreiem Medium (a) und Normalmedium (b).

Die Reinheit der aufgereinigten mAk wurde durch eine SDS-Elektrophorese bestimmt. Dabei werden unterschiedliche Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Es wurden aufgereinigter mAk Rami und Hbab aufgetragen. Abbildung 30 zeigt das Ergebnis dieser Elektrophorese. Es sind nur zwei Banden bei knapp über 150.000 Da zu erkennen, die auf IgG (Größe 146.000 Da) zurückzuführen sind (Brock *et al.*, 1994, Alberts *et al.*, 1999). Es liegen keine weiteren Proteine in den aufgereinigten Chargen vor. Flankiert sind beide mAk von einem Marker.

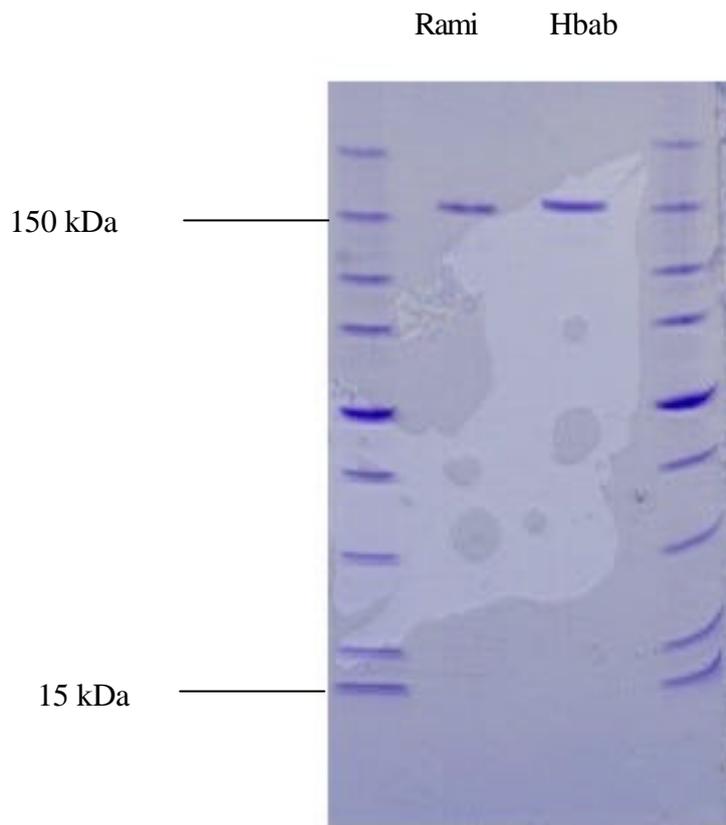


Abbildung 30: SDS-Gel mit dem mAk Rami und Hbab.

Die aufgereinigten mAk Antikörper wurden anschließend lyophilisiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Bei Bedarf wurden sie in H_2O dest. resuspendiert, da sie bereits mit Puffer gefriergetrocknet wurden.

IV Diskussion

TCA gehört zu den Anisolen. Im Gegensatz zu anderen Alkylphenylethern, die teilweise einen angenehmen Geruch besitzen (Beyer und Walter, 1988), bewirkt TCA eine negative geschmackliche Beeinflussung und einen muffigen Geruch. Ein Ursprung von TCA ist die mikrobielle Umsetzung von 2,4,6-Trichlorphenol, für die hauptsächlich Pilze verantwortlich sind. Pilze, die von der Rinde der Korkeiche und während der Herstellung der Korken aus Luftproben der Fabriken isoliert wurden, gehören hauptsächlich zu den Gattungen *Penicillium*, *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Aspergillus*, *Aphanocladium*, *Mucor*, *Monilia* und *Trichoderma* (Lee und Simpson, 1993; Danesh *et al.*, 1997). Es wurde eine Vielzahl von Ak gegen verschiedenste Pilzmetabolite und Pflanzenschutzmittel hergestellt (Pestka, 1988; Maragos und McCormick, 2000), jedoch nicht gegen TCA.

Ziel dieser Arbeit war es, mAk gegen TCA zu gewinnen und damit ELISAs zur Erkennung von TCA zu entwickeln. Die ELISAs sollten eine Nachweisgrenze für TCA liefern, die unter 250 ng/l TCA liegt.

4.1 Immunkonjugate und Immunisierung

TCA ist aufgrund seiner Größe von 212 Da nicht oder nur in Ausnahmefällen in der Lage, eine Immunantwort zu induzieren. Deshalb musste es an ein Trägermolekül gekoppelt werden. Es standen BSA und Hämocyanin zur Verfügung. Hämocyanin wurde ausgewählt, da es als Chromopeptid einer Wassernapfschnecke stark immunogen wirkt. Grund dieser Immunogenität ist wahrscheinlich der große Unterschied der Atmungspigmente von Weichtieren zu Säugetierproteinen (Goding, 1996). Hämocyanin kann im Gegensatz zu BSA mehr Haptene binden, da es über eine wesentlich größere Anzahl freier Lysinreste zur Kopplung verfügt. Es sollen mehrere Haptene an ein Trägerprotein gebunden werden, um eine Immunantwort auszulösen (Roitt, 1995). Es gibt jedoch keine einheitliche Meinung über die notwendigen Kopplungsraten. Erlanger (1980) erzielte mit 8-25 Haptenen je BSA-Molekül eine gute Immunantwort. Giersch (1993b) koppelte 685-2.800 Haptene an Hämocyanin. In einem anderen Fall wurden Kopplungsraten von 800-1.000 erzielt (Rittenburg und Amkraut, 1966). Marx (1997) erreichte eine Hapten-Hämocyanindichte von 4-43. Einen guten Immunisierungserfolg erzielten Wittmann und Hock (1989) durch anfängliche Impfungen mit Immunkonjugaten geringer Haptendichte, gefolgt von Immunisierungen mit Immunkonjugaten hoher Haptendichte. Bei den gemessenen Konjugaten stellte sich eine Haptendichte zwischen 300 und 15.000 heraus. Die große Differenz zwischen diesen zwei Werten liegt an der Heterogenität von Hämocyanin. Durch

Verklumpungen von Proteinuntereinheiten kann das Molekulargewicht von Hämocyanin von 4×10^5 bis $1,4 \times 10^7$ variieren (Holde und Bruggen, 1971). In anderen Untersuchungen wurde beobachtet, dass Immunkonjugate mit einer hohen Haptendichte eine starke Immunantwort auslösen können (Marx, 1997).

TCA wurde an Hämocyanin durch die Carbodiimid-Kopplung gebunden. Dazu musste zuerst eine Carboxylgruppe, die mit den Lysinresten des Atmungspigments reagieren kann, an den Benzolring des TCA angefügt werden. Dazu standen mehrere Positionen zur Verfügung. Die Carboxylgruppe wurde am Ende eines Abstandshalters (Spacer) angeheftet, der aus einer Kohlenstoffkette bestand. Dieser Abstandshalter soll mindestens vier Kohlenstoffatome lang sein, um die Bildung von Antikörpern gegen das Hapten zu ermöglichen (Campbell, 1991). Befindet sich das Hapten zu nah am Trägerprotein, kann es von dessen Domänen umwölbt werden. Dadurch können Antikörper entstehen, die nicht direkt gegen die Struktur des Haptens gerichtet sind. Der Einsatz von Spacern hat sich in vielen Fällen zur Herstellung mAk bewährt. Jede Anfügung eines Spacers führt zu einer anderen chemischen und räumlichen Struktur. Das entstandene Hapten muss nicht mehr exakt dem TCA gleichen. Die entstandenen mAk können beispielsweise gegen das Hapten und nicht gegen TCA gerichtet sein. Es wurden Balb/c Mäuse mit Hapten A, B- und C-Konjugaten immunisiert. Bei Hapten A ist der Spacer am C3-Atom des Benzolringes angebracht, bei Hapten B am C1-Atom und bei Hapten C am C4-Atom. Die drei Haptene zeigten dem Immunsystem jeweils eine andere chemische Struktur. Bei Hapten B wurde Trichlorphenol, bei Hapten A Trichloranisol und bei Hapten C Dichloranisol präsentiert. Diese verschiedenen chemischen Gruppen sind bei der späteren Betrachtung der Kreuzreaktivitäten zu beachten. Auf alle Haptene reagierten die Immunsysteme der Mäuse mit einer Immunantwort. Da, wie bereits erwähnt, Hämocyanin keine einheitliche Größe besitzt, wurde der Kopplungserfolg von Hämocyanin Hapten A- und Hapten C-Konjugaten durch Chloranalyse bestimmt. Der Kopplungserfolg von Hämocyanin Hapten B-Konjugaten wurde indirekt durch den Immunisierungserfolg belegt.

Zur Steigerung der immunogenen Wirkung von Konjugaten werden Adjuvantien eingesetzt. Bei dem verwendeten Adjuvans handelte es sich um das 1937 von Freund *et al.* entwickelte Adjuvans. Dieses Adjuvans gibt es in zwei Darreichungsformen: Einmal als komplettes Adjuvans, bestehend aus Mineralöl, einem Emulgator und abgetötetem *Mycobacterium tuberculosis* sowie als unkomplettes Adjuvans, dem die abgetöteten Bakterien fehlen. Mit der

Verwendung von komplettem Freund's Adjuvans zur Erstimpfung und nicht komplettem Freund's Adjuvans für alle darauffolgenden Immunisierungen wurden besonders gute Resultate erzielt (Hu *et al.*, 1989). Die Adjuvantien wurden zur Immunisierung zu gleichen Teilen mit gelöstem Immunkonjugat gemischt und es wurde eine „Wasser in Öl Emulsion“ hergestellt (Hurn und Chantler, 1980). Die Wirkung von unkomplettem Freund's Adjuvans beruht auf seinem Depoteffekt. Es ermöglicht eine langsame Abgabe des Immunkonjugates. Die in der kompletten Form beinhaltenden Mycobakterien führen zu einer Aktivierung der Makrophagen und der T-Helfer-Zellen und zu einer unspezifischen Produktion von Immunglobulinen. Allgemein wird das Immunsystem stimuliert. Auch in der kompletten Form besitzt Freund's Adjuvans eine Depotwirkung.

Neben Freund's Adjuvans gibt es noch eine Reihe weiterer Adjuvantien, wie z.B. Aluminiumhydroxid. Eine Zugabe von abgetöteten Bakterien (*Bordetella pertussis*) zum Aluminiumhydroxid führt zur Steigerung der Immunantwort. Dieses Adjuvans führte jedoch in vielen Fällen zu einer geringeren Immunantwort als Immunisierungen mit Freund's Adjuvans (Ehrhardt *et al.*, 1991; Giersch, 1993 b).

Ein großer Nachteil von Freund's Adjuvans sind die auftretenden Nebenwirkungen. So kann es zu Entzündungen, Fieber und sogar zu Myelomen kommen (Peters und Baumgarten, 1990; Claasen *et al.*, 1992). Auch bei den zur Erstellung dieser Arbeit durchgeführten Immunisierungen wurde bei den geimpften Mäusen eine fiebrige Reaktion beobachtet, die einige Stunden anhielt. Es wurden darauffolgend keine weiteren Nebenwirkungen bemerkt.

Nicht nur die Art der Immunkonjugate und des Adjuvans bestimmt die Qualität und Affinität der mAk, sondern auch die Dauer der Immunisierung ist ein entscheidender Faktor. Jede Maus besitzt ein begrenztes Repertoire an Antikörpern. Dieses Repertoire ist verantwortlich für die Affinitäten der mAk. Jedoch kommt es im Verlauf einer Immunisierungsphase bei angeregten B-Zellen zu somatischen Mutationen der Gene, die die variablen Bereiche der Ak codieren. Dadurch können Ak entstehen, die sich in ihrer Spezifität und Affinität von den ursprünglich vorhandenen Ak unterscheiden (Allen *et al.*, 1988; Weinand, 1990). Wird über einen längeren Zeitraum immunisiert, werden vor allem die B-Zellen zur Teilung angeregt, die bereits hochaffine Ak herstellen. Mutation und Selektion führen zu der sogenannten Affinitätsreifung (Manser, 1990; Goding, 1996).

Nach der Festlegung der Immunkonjugate, der Immunisierungsdauer und der Adjuvantien wurde die Immunisierungsart und die Blutabnahme bestimmt. Die Immunisierungen wurden intraperitoneal durchgeführt. Diese Art der Immunisierung wurde einer intravenösen Impfung vorgezogen, da die Gefahr eines anaphylaktischen Schocks und einer Embolie bei einer intravenösen Injektion wesentlich größer ist (Harlow und Lane, 1988). Eine intraperitoneale Impfung ist außerdem wesentlich leichter als eine intravenöse Injektion durchzuführen. Polyklonale Mausantiseren wurden zur Überprüfung des Immunisierungserfolges gewonnen. Blut wurde aus der Schwanzvene entnommen. Andere Entnahmemöglichkeiten, wie z.B. eine Punktion im Auge, sind indiskutabel. Es wurde jeweils ausreichend Blut gewonnen, um mehrere ELISAs durchzuführen. Allgemein zeigten die Mausantiseren eine sehr starke TCA-spezifische Reaktion. Auch Immunkonjugatkopplungen, die nicht mit einer Chloranalyse überprüft wurden, waren erfolgreich. Nach Beendigung der erfolgreichen Immunisierungsphasen schlossen sich Zellfusion und -kultur an.

4.2 Fusion und Zellkultur

Zur Herstellung mAk müssen B-Zellen mit Myelomzellen, Krebszellen des Immunsystems, fusioniert werden. mAk können grundsätzlich von den meisten Tierarten gewonnen werden. In den meisten Fällen werden murine mAk hergestellt. Es wurden jedoch auch schon von Kaninchen mAk produziert (Liguori *et al.*, 2001). Einzige Bedingung ist es, dass zur Fusion Myelomzellen der gleichen Tierart zur Verfügung stehen. Die zur Fusion entnommenen B-Zellen müssen sich in der Proliferation zu Plasmazellen befinden, denn nur diese Zellen sezernieren Antikörper. Dies wird durch Immunisierungen hoher Immunkonjugatdosen ohne Adjuvans an jeweils vier bis fünf Tagen vor der Fusion erreicht (Stähli *et al.*, 1980). Deshalb wurde 4 Tage vor jeder Fusion mit Immunisierungen im Abstand von einem Tag begonnen.

Bei den Spendermäusen handelte es sich um Balb/c Mäuse. Die verwendeten Myelomzellen gehörten zur Zelllinie PAI-B₃ Ag81. Diese Zelllinie ist ein Abkömmling der Zelllinie P3X63Ag8.653, die von Balb/c-Mäusen gewonnen wurde. Sie zeichnet sich durch ein stabiles Wachstum auch unter Stressbedingungen und durch hohe Fusionsraten aus (Stocker *et al.*, 1982; Giersch, 1993 b). Eine weitere Bedingung für die Herstellung mAk ist es, dass die zur Fusion bereitstehenden Myelomzellen selbst keine Antikörper herstellen und über einen genetischen Defekt verfügen, der ihnen kein Überleben in einem Selektionsmedium erlaubt. Die Zelllinie PAI-B₃ Ag81 verfügt über die soeben erwähnten Eigenschaften und eignet sich deshalb ideal zur Zellfusion.

Dieses Selektionsmedium kann aus HAT (Hypoxanthin, Aminopterin und Thymin) oder aus HAZ (Hypoxanthin und Azaserin) bestehen. HAZ-Medium besitzt den Vorteil, dass es lichtstabiler und länger lagerbar als HAT-Medium ist (Peters und Baumgarten, 1990). Aus diesen Gründen wurde HAZ-Medium zur Selektion bei allen Fusionen eingesetzt. Außerdem ist HAZ im Vergleich zu HAT in einer wesentlich geringeren Dosis wirksam.

Zur Vorbereitung der Zellfusion wurden die B-Lymphozyten aus der Milz der Spendermäuse entnommen. Diese B-Zellen wurden nach dem Entfernen aus der Milz nicht gezählt. Eine Zählung hätte einen unwiederbringbaren Verlust von B-Zellen mit sich gebracht. Es hätten die B-Lymphozyten zur Zählung entnommen werden können, die die spezifischen mAk produzieren. Eine Milz enthält ca. 10^8 B-Lymphozyten pro Milz. Diese Quantität von B-Lymphozyten wurde zu den abgezählten Myelomzellen (5×10^7) gegeben und fusioniert. Anschließend wurden 30 % der Fusion auf vier 96er Klonplatten ausgesät. Die verbliebenen 70 % wurden zur späteren Aussaat eingefroren. Wären 100 % der Fusion ausgesät worden, wäre es für eine einzelne Person nicht mehr möglich gewesen, die Arbeit zu verrichten. Mit 30 % Aussaat wurde ein Kompromiss zwischen genügender Aussaatmenge und zu verrichtender Arbeit geschlossen.

Nach der Fusion und vor dem ersten Mediumswechsel war es nicht möglich, die Anzahl wachsender Hybridome in den Aussaatplatten zu bestimmen. Der erste Mediumswechsel erfolgte nach fünf bis sieben Tagen. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich aber auch noch nicht fusionierte Myelomzellen in den Kavitäten der Aussaatplatten. Sie wären bei einer Zählung mit berücksichtigt geworden und hätten die Fusionsrate stark zum Positiven verfälscht. Nach Beendigung der HAZ-Selektion war auch keine Bestimmung einzelner gewachsener Klone durch die vorherigen Mediumswechsel mehr möglich. Ein Mediumswechsel führt zu einem Aufwirbeln von einzelnen Zellhaufen. Es bilden sich mehrere Zellhaufen derselben Zelllinie. Auch dies hätte die Fusionsrate zu stark nach oben geschraubt. Bei anderen Arbeiten zur Herstellung mAk wurden Fusionsraten von ca. 6×10^{-5} Zellen erreicht (Giersch und Hock 1990; Marx, 1997). Dies bedeutet, dass etwa jede 17.000ste Zelle eine Fusion einging. Die Fusionsraten bei dieser Arbeit werden durch Verwendung derselben Fusionsverfahren in diesem Bereich gelegen haben. Bei den einzelnen Fusionen waren 60-80 % aller Kavitäten bewachsen. Es wurden vier positive Zelllinien entdeckt, von denen drei näher charakterisiert wurden. Die Anzahl der bewachsenen Kavitäten ist abhängig von der Dichte der Aussaat. 30 % einer Fusion wurden jeweils auf vier 96er Klonplatten ausgesät. Pullen und Hock (1995) konnten aus zwei Fusionen 3 Klone gewinnen. Schläppi *et al.* (1990) etablierte zwei Klone

aus zwei Fusionen. Es stellte sich heraus, dass kurz nach jeder Fusion mehrere Klone mit TCA reagierten. Die Anzahl dieser positiven Klone nahm jedoch mit fortlaufender Zellkultur ab. Klone können nach einiger Zeit die Herstellung mAk einstellen.

Ein entscheidender Faktor einer Fusion ist das verwendete Fusogen. Für eine Fusion stehen mehrere Fusogene zur Auswahl. Zur Herstellung der ersten mAk wurde ein inaktivierter Sendaivirus eingesetzt (Köhler und Milstein, 1975). Eine moderne Fusionsmethode ist die Elektrofusion. Heute wird aber auch häufig PEG verwendet, da es einfach in der Handhabung ist und höhere Fusionsraten ermöglicht. Es gibt PEG mit unterschiedlichen Molekulargewichten. Allgemein hat sich PEG mit einem Molekulargewicht zwischen 1.500 und 6.000 für erfolgreiche Fusionen empfohlen (Fazekas de St. Groth und Scheidegger, 1980; Gani *et al.*, 1998). In den durchgeführten Fusionen wurde PEG 1500 eingesetzt, das gute Fusionen ermöglichte.

4.3 Screening und Klonierung

Nach der Aussaat der Fusionsprodukte wurde der ZKÜ auf das Vorhandensein TCA-spezifischer mAk untersucht (Screening). Dieses Verfahren soll dem späteren Verwendungszweck der mAk sehr nahe kommen. Deshalb wurde zum Screening ein kompetitiver ELISA verwendet, auf den auch bei der späteren Testentwicklung das Hauptaugenmerk gelegt wurde. Die Kavitäten, die in diesem Screening über einen längeren Zeitraum eine TCA-spezifische Reaktion zeigten, wurden anschließend kloniert. Zur Klonierung wurden Einzelzellablage und Endpunktverdünnung eingesetzt, wobei im späteren Verlauf nur noch die Einzelzellablage zum Einsatz kam. Allgemein kann eine Zelllinie als monoklonal angesehen werden, wenn sie ein- bis zweimal erfolgreich kloniert worden ist (Peters und Baumgarten, 1990). Bei der Endpunktverdünnung wird eine Zellsuspension hergestellt, bei deren Aussaat statistisch eine Zelle in eine Kavität der Aussaatplatte gelangt. Durch Zellverklumpungen kann jedoch mehr als eine Zelle in eine Kavität gelangen (Campbell, 1984). Ein Nachteil der Endpunktverdünnung ist, dass direkt nach der Aussaat keine mikroskopische Kontrolle der ausgesäten Zellzahl erfolgen kann. Diese mikroskopische Überprüfung kann bei der Einzelzellablage durchgeführt werden. Es werden Zellen in kleinen Tropfen in die Kavitäten gelegt, und anschließend wird die Zellzahl pro Kavität mikroskopisch bestimmt. Befand sich genau eine Zelle in der Kavität, aus der der antikörperherstellende Klon hervorgegangen ist, so kann man von Monoklonalität ausgehen.

Durch die mikroskopische Bestimmung der Zellzahl kann auf einige Reklonierungen verzichtet werden. Nach einer einzigen Klonierung kann man von Monoklonalität ausgehen, wenn sich nur eine Zelle in der Kavität befand. Leider ist es jedoch der Fall, dass nach Ablage einzelner Zellen sich diese Zellen trotz Zugabe von Wachstumsfaktoren nicht weiter vermehren lassen und zu Grunde gehen. In diesem Fall muss bei einer erneuten Einzelzellablage die Aussaatdichte bis auf 10 Zellen pro Kavität erhöht werden, um wachsende Klone zu erhalten.

4.4 Monoklonaler Antikörper gegen Hapten A

Die monoklonale Zelllinie, die nach einer Immunisierung gegen Hapten A identifiziert wurde, zeigte nach sechs Wochen keine TCA-spezifische Reaktion mehr. Höchstwahrscheinlich stellte diese Zelllinie die Produktion von Antikörpern aufgrund genetischer Instabilität ein. Hybridomzellen erhalten durch die Fusion einen tetraploiden Chromosomensatz (Baron, 1987). In den darauffolgenden Zellteilungen können Gene entfernt werden. Darunter können auch die Gene fallen, die für die Antikörperproduktion verantwortlich sind. Diese Zellen sind dann nicht mehr in der Lage, Antikörper zu produzieren und sezernieren. Höchstwahrscheinlich wird diese Zelllinie aufgrund dieser Tatsache keine mAk mehr hergestellt haben.

4.5 Massenproduktion monoklonaler Antikörper

Eine Massenproduktion mAk kann in unterschiedlichen Zellkultursystemen durchgeführt werden. Eine andere Möglichkeit der Massenproduktion ist die Aszitesvermehrung in der Bauchhöhle von Mäusen. Diese Art der Massenproduktion ist in Deutschland verboten, aber noch in den Vereinigten Staaten und in Japan Praxis. Der mAk Rami wurde in dem Fermenter Miniperm und in dem Fermenter CL 350 vermehrt. Beide Systeme wurden ausgewählt, da sie eine kostengünstige Möglichkeit für eine Massenproduktion bieten. Der mAk Rami erreichte im Miniperm eine maximale Zelldichte von $7,2 \times 10^6$ Zellen pro ml und eine maximale Antikörperkonzentration von 1,3 mg/ml Erntevolumen. Giersch und Schäpermeier (1998) erzielten mit drei Hybridomzelllinien, die Ak gegen Triazine herstellten, maximale Antikörperkonzentrationen zwischen 0,8 und 2 mg/ml Erntevolumen und eine maximale Zelldichte von 8×10^6 bis $1,2 \times 10^7$ pro ml. Die Antikörperkonzentrationen und die Zelldichten variierten von Zelllinie zu Zelllinie. Falkenberg *et al.* (1993) untersuchten 24 verschiedene Hybridomzelllinien im Miniperm. Es wurden maximale mAk-Konzentrationen von 0,24 bis 5,9 mg/ml Erntevolumen erreicht. Marx *et al.* (2000) ernteten maximal 0,2 mg/ml eines mAk gegen Vitellogenin. Die Ausbeute des mAk Hbab war mit 0,2 mg/ml

wesentlich geringer als die des mAk Rami. 0,2 mg/ml stellen aber keine Ausnahme dar und liegen in den oben erwähnten Bereichen. In dem Fermenter CL 350 konnte in einer 16tägigen Kultur eine maximale Zellzahl von $5,5 \times 10^6$ pro ml und eine maximale Antikörperkonzentration von 0,9 mg/ml Erntevolumen erzielt werden. Jackson *et al.* (1999) ernteten maximal 1,5 mg/ml mAk aus dem Fermenter CL 350.

Im Minipermsystem ist insgesamt eine größere Zellzahl und Ak-Menge aufgrund des größeren Produktionsvolumen vorhanden. Beide Systeme verbrauchen die gleiche Menge an SFM. Allgemein ist aufgefallen, dass im Miniperm ein stärkeres Zellwachstum festzustellen war. Bei jeder Ernte wurden aus beiden Systemen neben den mAk auch Hybridomzellen entfernt. Diese wurden in den Fermenter CL 350 resuspendiert. Ins Miniperm wurden die entfernten Zellen nicht zurückgegeben. Die dadurch aufgetretenen Zellverluste wurden im Miniperm innerhalb kürzester Zeit wettgemacht.

Beide Systeme besitzen einen großen Vorteil, der spätere Arbeiten mit den ZKÜ vereinfacht. Durch die Unterteilung in ein großes Versorgungs- und ein kleines Produktionsmodul ist eine spätere Aufkonzentrierung des ZKÜ nicht nötig. Der bereits konzentrierte ZKÜ kann in relativ kurzer Zeit aufgereinigt werden.

4.6 Aufreinigung monoklonaler Antikörper

Nachdem die mAk in ausreichenden Mengen hergestellt worden sind, wurden sie aufgereinigt. Der spätere Verwendungszweck bestimmt die Reinheit des mAk. So ist z.B. für eine Immunaффinitätschromatographie die absolute Reinheit des mAk unabdingbar. Grundsätzlich ist ein ELISA mit nicht gereinigten ZKÜ durchführbar. Mehrere Gründe sprechen jedoch für die Aufreinigung. So lassen sich aufgereinigte mAk standardisieren und wesentlich besser lagern. Im ZKÜ kommen Proteasen vor, die die mAk zerstören können. Diese Proteasen werden durch die Aufreinigung entfernt.

Zur Aufreinigung mAk können verschiedene Verfahren eingesetzt werden. Die bei dieser Arbeit gewonnenen mAk wurden über Protein A aufgereinigt. Protein A besitzt gute Bindungseigenschaften für Maus-IgG (Roche, Herstellerangabe). Es wurden sowohl mAk aus NM als auch aus SFM aufgereinigt. Es stellte kein Problem dar, Rinder-IgG, das in NM vorkommt, von dem gewünschten Maus-IgG zu trennen. Rinder-IgG eluiert bei einem pH-Wert von 8, der mAk Rami und Hbab (IgG2a und IgG2b) zwischen pH 3,5 und 6 (Peters und Baumgarten, 1990). Protein A bietet eine praktische und zuverlässige Möglichkeit der Aufreinigung mAk. Probleme der Bindung an Protein A treten nur bei Antikörpern der Klasse IgG1 auf. IgG1 lässt sich bei einem pH-Wert von 8 schlecht an Protein A binden. Dieses Problem kann jedoch durch höhere pH-Werte eliminiert werden (Juarez-Salinas und Ott, 1985).

Andere Möglichkeiten der IgG-Aufreinigung bieten die Ammoniumsulfatfällung und Protein G-Aufreinigung (Akerström *et al.*, 1985). Protein G besitzt im Gegensatz zu Protein A wesentlich bessere Bindungseigenschaften für Antikörper der Klasse IgG1.

Aufgereinigte mAk wurden lyophilisiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Rekonstituierte Antikörperchargen, die bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden, zeigten nach einigen Wochen einen Aktivitätsverlust, der auf mikrobielle Kontamination zurückgeführt wurde. Antikörperchargen wurden nach einmaligem Auftauen nach Möglichkeit nicht wieder eingefroren, da bei jedem Einfriervorgang Anteile der Proteine zerstört werden. Nicht aufgereinigter ZKÜ wurde sofort bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren, um die eben erwähnten mikrobiellen Kontaminationen und die Aktivität von Proteasen zu vermeiden. Nach dieser Lagerung wurden keine Aktivitätsverluste beobachtet. Da eine Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ stattfand und kein Aktivitätsverlust zu beobachten war, wurde auf den Einsatz von Proteaseinhibitoren verzichtet. Proteasen werden von fast allen Zellen hergestellt und kommen somit auch in der Kultur von Hybridomazellen vor.

4.7 Charakterisierung monoklonaler Antikörper

Nach erfolgreicher Zellkultur und Aufreinigung der mAk erfolgte eine Charakterisierung der mAk Rami und Hbab. Eine Charakterisierung schafft die Voraussetzung für die Verwendung des mAk. Die drei wesentlichen Punkte der Charakterisierung waren die Testentwicklung, die Kreuzreaktivitäten und die Probenmessung. Es wurden nur kompetitive ELISA entwickelt. Zur Entwicklung eines nicht kompetitiven ELISAs hätte TCA in verschiedenen Konzentrationen an die Mikrotiterplatte gebunden werden müssen. Da TCA aber nicht direkt

an eine Polystyroloberfläche gekoppelt werden kann, hätten Beschichtungskonjugate mit verschiedenen TCA-Konzentrationen oder Verdünnungen einer Stammlösung hergestellt werden müssen. Durch die bereits festgelegten Konzentrationen hätte keine Probenmessung mit einem solchen nicht kompetitiven ELISA erfolgen können. Auch wäre der Aufwand zur Herstellung vieler unterschiedlicher Beschichtungskonjugate unverhältnismäßig hoch gewesen. Theoretisch können nicht kompetitive ELISA jedoch die Möglichkeit einer Sensitivitätsverbesserung im Vergleich zu kompetitiven ELISA ermöglichen (Tijssen, 1985; Hock, 1993).

Es wurden zwei unterschiedliche mAk gewonnen, mit denen drei verschiedene ELISAs entwickelt wurden. Ein ELISA wurde mit dem mAk Hbab und zwei ELISAs mit dem mAk Rami entwickelt, wobei ein ELISA mit einem Streptavidin-Biotin Verstärkersystem durchgeführt wurde. Alle drei ELISAs bewährten sich und lieferten eine sehr gute Nachweisgrenze für TCA. Zur Visualisierung der Antikörperreaktion wurde Meerrettichperoxidase eingesetzt. Sie besitzt mit 4.500 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) und ist deshalb ideal für einen ELISA geeignet.

Der TCA-ELISA mit dem mAk Rami lieferte einen Testmittelpunkt von 4 $\mu\text{g/l}$ und eine Nachweisgrenze für TCA von 0,13 $\mu\text{g/l}$. Feng *et al.* (1990) entwickelten einen ELISA für Alachlor, der eine minimale Konzentration von 0,2 $\mu\text{g/l}$ von diesen Anaylten erkannte. Moreno *et al.* (2001) entwarfen einen ELISA mit mAk gegen Carbofuran, ein bedeutendes Insektizid, mit einem Testmittelpunkt von 0,74 $\mu\text{g/l}$. Generell gibt es eine Vielzahl von unterschiedlichen Antikörpern gegen Pflanzenschutzmittel und Pilzmetabolite. So erzeugten Wittmann und Hock (1989) ein polyklonales Kaninchenantiserum gegen Triazine, das einen Testmittelpunkt von 0,02 $\mu\text{g/l}$ lieferte. Der mAk Rami erkannte ohne Verstärkersystem eine minimale TCA-Konzentration von 0,13 $\mu\text{g/l}$ TCA. Ein Ziel dieser Arbeit war es einen ELISA mit einer Nachweisgrenze unter 0,25 $\mu\text{g/l}$ TCA zu entwickeln. Der mit dem mAk Rami durchgeführte ELISA erkannte das geforderte Minimum von TCA problemlos und konnte die Zielsetzung erfüllen.

Teil der Testentwicklung war es das optimale Reagenz zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen im ELISA zu ermitteln. Es wurden ELISA-Platten genutzt, an die Proteine

sehr gut binden können (Greiner, Herstellerangabe). Deshalb sollte durch eine Blockierung eine Bindung des TCA-spezifischen mAk an die Platte verhindert werden. Als bestes Blockierungsmittel für den mAk Rami hat sich Gelatine herausgestellt, die ein geringes Hintergrundrauschen, also eine geringe unspezifische Bindung des mAk Rami verursachte.

Mit dem mAk Hbab wurde ebenfalls ein kompetitiver ELISA entwickelt. Es wurden dieselben Testparameter (Konzentration der Beschichtungskonjugate, Blockierungsmittel, Antikörperkonzentrationen) wie bei der ELISA-Entwicklung mit dem mAk Rami überprüft.

Es wurden unterschiedliche Blockierungsmittel getestet. Es wurde ebenfalls das Blockierungsmittel gesucht, das am besten eine unspezifische Bindung der mAk an der Oberfläche der Mikrotiterplatte verhindert. Als bestes Blockierungsmittel für den TCA-ELISA mit dem mAk Hbab stellte sich OVA heraus. Gelatine, die sich als optimales Blockierungsreagenz für den TCA-ELISA mit dem mAk Rami bewährte, hatte in diesem Fall nicht dieselben positiven Eigenschaften.

Der Blockierungsschritt mit OVA führte zu dem beschriebenen optimierten TCA-ELISA mit dem mAk Hbab. Der optimierte TCA-ELISA mit dem mAk Hbab erreichte eine Nachweisgrenze von 10 ng/l TCA. 10 ng/l liegen in der sensorischen Nachweisgrenze für TCA. Jedoch liegt die Nachweisgrenze mit 10 ng/l weit unter der bei der Zielsetzung festgelegten Nachweisgrenze von 0,25 µg/l. Der mAk Hbab erkannte problemlos geringere TCA-Konzentrationen als erforderlich. Aufgrund der sehr exzellenten Erkennung von TCA und der Erfüllung der Anforderungen wurde auf weitere Verstärkersysteme verzichtet. Jedoch kann jederzeit ein Verstärkersystem zum Einsatz kommen, das die Nachweisgrenze noch weiter senken kann.

Die Nachweisgrenze des mAk Hbab von TCA mit 10 ng/l ist besser als die Nachweisgrenze des mAk Rami mit einem Verstärkersystem von 20 ng/l. Beide mAk liefern eine sehr gute Nachweisgrenze für TCA. Galve *et al.* (2000) erzielten mit pAk gegen Trichlorphenol eine Nachweisgrenze von 0,2 µg/l. Mit anderen pAk wurden minimale Konzentrationen von 0,06 µg/l Metolachlor detektiert (Casino *et al.*, 2001). Rosso *et al.* (1999) erzielten mit einem ELISA gegen Benalaxyl, einem Fungizid, eine Nachweisgrenze von 0,13 µg/l.

Der TCA-ELISA mit dem mAk Rami erfüllte mit einer Nachweisgrenze von 0,13 µg/l die geforderte Nachweisgrenze von 0,25 µg/l TCA. Zur weiteren Senkung der Nachweisgrenze wurde ein Verstärkersystem eingeführt. Es gibt unterschiedliche Verstärkersysteme. Bei dem CARD-System werden biotinierte phenolische Verbindungen mit POD und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Eine weitere Möglichkeit der Systemverstärkung bieten Enzymkaskaden. In dieser Arbeit fand ein Streptavidin-Biotin-System Einsatz. Bei diesem System können mehr POD-Moleküle pro gebundenem Ak umgesetzt werden als bei dem Einsatz von einem einfach mit POD-markierten Sekundärantikörper. Dies kann zu einer Steigerung der Empfindlichkeit des ELISAs führen (Shamsuddin und Harris, 1983; Diamandis und Christopoulos, 1991). Es wurde ein bereits gekoppelter Streptavidin-POD-Komplex verwendet. Dieser wurde aus zwei Gründen einer Vorinkubation von freiem Streptavidin mit Biotin-POD vorgezogen. Der erste Grund war, dass Streptavidin nach einer Woche in Lösung seine Bindungsfähigkeiten für Biotin-POD verlor. Nach diesem Zeitpunkt waren keine Absorptionen im ELISA mehr messbar. Unter Verwendung von neuem Streptavidin bei gleichem Biotin-POD waren jedoch wieder normale Absorptionen detektierbar. Der zweite Grund für den Gebrauch des Streptavidin-Komplexes waren die Ergebnisse. Es wurde kein Unterschied zwischen dem bereits gekoppelten Komplex und freiem Streptavidin und Biotin-POD bemerkt. Dieses Verstärkersystem führte zu einer Verbesserung der Nachweisgrenze auf 0,02 µg/l TCA, eine Steigerung um den Faktor 6,6. Marx (1997) erzielte eine nahezu identische Verbesserung der Sensivität um den Faktor 7.

Ein weiterer Punkt in den der Ak-Charakterisierung war die Ermittlung der Kreuzreaktivitäten. Die Kenntnis der Kreuzreaktivitäten ist eine wichtige Grundlage für den späteren Einsatz des Antikörpers. Querempfindlichkeiten existieren zumeist mit strukturell ähnlichen Substanzen. Die Kreuzreaktivitäten wurden am Testmittelpunkt abgeleitet und erstellt (Abraham, 1969). Sie gelten nur unter diesen Testbedingungen. Eine Veränderung eines einzelnen Testparameters kann zu einer Veränderung der Kreuzreaktivität führen (Weller *et al.*, 1992).

Die größte Kreuzreaktivität des mAk Rami von 137 % war mit Pentachlorphenol (PCP) zu registrieren. Kreuzreaktivitäten von 71 % existierten mit Pentachlorbenzol (PCB) und mit 2,3,4-Trichloranisol. PCP unterscheidet sich von PCB nur durch eine Hydroxylgruppe am C1-Atom. Trotzdem fiel die Querempfindlichkeit von PCB um 66 % niedriger als die von PCP aus. Mit 2,4,6-Trichlorphenol, das sich von TCA nur durch die vorhandene OH-Gruppe am

ersten C-Atom unterscheidet, wurde eine Querempfindlichkeit von 25 % festgestellt. Diese Kreuzreaktivitäten lassen erkennen, dass Antikörper kleinste Veränderungen in der chemischen Struktur wahrnehmen können. Die nicht besonders hohe Kreuzreaktivität zu TCP wird auf das Immunkonjugat zurückzuführen sein. Die Substituierung des Spacers am C4-Atoms des Anisols führte dazu, dass die OCH₃-Gruppe dem Immunsystem der Maus präsentiert wurde.

Der mAk Hbab zeigte deutliche Unterschiede in den Kreuzreaktivitäten im Vergleich zum mAk Rami. Aufgrund der unterschiedlichen Haptene, mit denen immunisiert wurde, wurden andere, dem TCA ähnliche Strukturen, den Immunsystemen präsentiert. Deshalb wurden auch verschiedene Kreuzreaktivitäten erwartet. Der mAk Hbab besitzt die größte Querempfindlichkeit von 143 % mit 2,3,6-Trichloranisol. Mit dieser Substanz besitzt der mAk Rami nur eine Kreuzreaktivität von 18 %. Mit Pentachlorphenol existiert eine Kreuzreaktivität von 4 %. Dagegen besitzt der mAk Rami seine größte Querempfindlichkeit von 137 % mit diesem Stoff. Am auffälligsten ist aber, dass der mAk Hbab keine Querempfindlichkeit zu 2,4,6-Trichlorphenol aufwies, obwohl sich bei dem zur Immunisierung verwendeten Hapten B der Spacer am C1-Atom anschloss. Somit wurde dem Immunsystem die gleiche Struktur präsentiert, die auch 2,4,6-Trichlorphenol besitzt. Trotzdem wurde keine Kreuzreaktivität zu dieser Substanz festgestellt. Höchstwahrscheinlich liegt das daran, dass sich durch die Anfügung des Spacers die räumliche Struktur des Haptens veränderte. Anscheinend veränderte das Hapten dadurch seine Struktur so sehr, dass es große räumliche Unterschiede im Vergleich zu 2,4,6-Trichlorphenol aufwies. Der mAk Hbab konnte 2,4,6-Trichlorphenol nicht erkennen und besitzt keine Kreuzreaktivität zu dieser Substanz.

Abschließend wurde der TCA-ELISA mit dem mAk Rami zur Messung von Weinproben eingesetzt. Wein wurde mit einer definierten Quantität TCA bestückt und im ELISA gemessen. Weinproben mussten 1:100 verdünnt werden, um negative Matrixeffekte des Weins zu eliminieren. Diese Matrixeffekte wurden auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Bushway und Thome, 1998). Diese Matrixeffekte können unterschiedlich stark ausgeprägt sein. So besteht zwischen Weiß- und Rotwein ein Unterschied in der minimalen geschmacklichen Wahrnehmung von TCA von 4 ng/l bei Weißwein und von 50 ng/l bei Rotwein (Tanner *et al.*, 1981; Amon *et al.*, 1989). Weine unterscheiden sich aufgrund ihrer geographischen Herkunft in ihrer Zusammensetzung.

Verschiedene Weine Spaniens zeigten nach ihrem geographischen Ursprung Unterschiede in ihrem Phenolgehalt (Pena-Neira *et al.*, 2000a).

Der TCA-ELISA mit dem mAk Hbab wurde ebenfalls zur Messung von Kork- und Weinproben eingesetzt. Dabei stellten sich ebenfalls starke Matrixeffekte des Weines heraus. Erst Wein in einer Verdünnung um den Faktor 1:100 konnte bestimmt werden. Die gemessene TCA-Gehalt der Probe lag im Bereich des dotierten TCA. So wurde bei einer Proben 1,48 $\mu\text{g/l}$ TCA gemessen. Zugegeben war 1 $\mu\text{g/l}$ TCA.

Mit dem mAk Hbab wurden desweiteren Korkextrakte bestimmt, denen TCA zugesetzt wurde. Es zeigte sich, dass Korkextrakte nicht solche negativen Matrixeffekte wie Wein besitzen. Aus diesem Grund konnten Korkproben in geringeren Verdünnungen gemessen werden. Eine Verdünnung um den Faktor 1:20 führte zu einer Wiederfindung von 80 % des zugegebenen TCA. Mit dem mAk Hbab können also auch kontaminierte Korkproben bestimmt und anschließend entfernt werden. Die Wiederfindungsrate des gemessen TCA lag im Bereich des zugegebenen TCA.

4.8 Schlussbemerkung

In dieser Arbeit wurden die ersten mAk gegen TCA beschrieben. Alle mit diesen mAk entwickelten ELISAs besitzen eine sehr gute Nachweisgrenze für TCA. Insgesamt wurden drei ELISAs mit näher charakterisierten mAk entwickelt. Alle drei ELISAs erfüllen die gestellten Anforderungen. Es sollten ELISAs entwickelt werden, die eine Nachweisgrenze für TCA von 0,25 $\mu\text{g/l}$ liefern. Alle drei ELISAs liegen unterhalb dieses Wertes. Der TCA-ELISA mit dem mAk Rami erkannte 0,133 $\mu\text{g/l}$ TCA, mit Verstärkersystem verbesserte sich die Nachweisgrenze auf 0,02 $\mu\text{g/l}$. Der TCA-ELISA mit dem mAk Hbab erkannte mit 0,01 $\mu\text{g/l}$ wesentlich geringere als die geforderten TCA-Konzentrationen.

Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit der ELISAs wurde ein definierter TCA-Standard (Ehrenstorfer, Augsburg) eingesetzt. Es waren keine Unterschiede bei der ELISA-Auswertung zwischen diesem definierten Standard und den selbstabgewogenen und angesetzten Standards festzustellen. Die Exaktheit der eingesetzten TCA-Konzentrationen konnte dadurch belegt werden.

Die bei dieser Arbeit hergestellten mAk bieten die Möglichkeit des Nachweises von TCA. Es sind bisher keine weiteren mAk gegen TCA bekannt. Alle anderen Verfahren zur Bestimmung von TCA basieren auf Gaschromatographie (siehe Tab. 1). Diese mAk können eine Alternative zur aufwendigen gaschromatographischen TCA-Messung bieten.

V Zusammenfassung

2,4,6-Trichloranisol (TCA) kann in Wein auftreten und führt durch einen negativen Geschmack zu jährlichen Verlusten in der Wein- und Korkindustrie in Höhe von mehreren Milliarden € Das Ziel dieser Arbeit war es, monoklonale Antikörper (mAk) zum Nachweis von TCA herzustellen. Für die Antikörpersynthese standen drei TCA-Derivate (Hapten A, B und C) zur Verfügung. Diese wurden über eine Carbodiimidkopplung an Hämocyanin zur Immunisierung und zur Beschichtung im ELISA an BSA gekoppelt. Die verschiedenen Immunkonjugate wurden Mäusen injiziert. Nach einer Immunisierungsphase wurden die B-Zellen gewonnen und mit Myelomzellen, Krebszellen des Immunsystems, fusioniert. Die fusionierten Hybridomzellen wurden auf die Herstellung TCA-spezifischer mAk getestet. Diese Überprüfung erfolgte mit einem kompetitiven ELISA, der zuvor mit TCA-spezifischen Kaninchen- und Mausantiseren entwickelt worden war. Es wurden drei Zelllinien identifiziert, die TCA-spezifische mAk herstellen. Mit diesen Zelllinien wurde eine Antikörpermassenproduktion in zwei Biofermentern durchgeführt.

Die hergestellten mAk wurden zur Entwicklung von kompetitiven ELISAs eingesetzt. Bei diesen Tests konkurriert freier Analyt mit gebundenem Analyt (BSA-Hapten-Konjugaten), um die Bindungsstellen an den spezifischen mAk. Anhand von Kalibrierkurven können Proben unbekannter Konzentration bestimmt werden. Die Antikörper-Antigen-Reaktion wurde durch einen Sekundärantikörper, der an murine Ak bindet, sichtbar gemacht. Dieser Sekundärantikörper ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (POD) markiert, das mit Substrat (TMB) eine Farbreaktion ergibt. Die Zelllinie, die aus der Immunisierung mit Hapten A hervorging, war instabil und stellte nach 6 Wochen die Produktion mAk ein. Es konnte keine nähere Charakterisierung erfolgen. Die mAk, die aus den Immunisierungen mit Hapten B (Hbab) und Hapten C (Rami) hervorgegangen, wurden näher definiert. Der ELISA mit dem mAk Rami lieferte eine Nachweisgrenze für TCA von 0,13 µg/l. Zur Steigerung der Nachweisgrenze wurde ein Verstärkersystem eingesetzt. Dieses ermöglicht bei gleicher Antikörper- und Analytkonzentration eine Verstärkung der Farbreaktion und dadurch eine Senkung der Nachweisgrenze auf 20 ng/l TCA. Der ELISA mit dem mAk Hbab konnte ohne Verstärkerreaktion noch Konzentrationen von 10 ng/l TCA erfassen. Alle drei entwickelten ELISAs lagen unter der geforderten Nachweisgrenze von 0,25 µg/l. Es wurden Kork- und Weinproben gemessen. Die verschiedenen ELISAs können zur Erkennung und dadurch zur Eliminierung von TCA-kontaminierten Proben eingesetzt werden.

VI Literatur

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

AKERSTRÖM, B., BRODIN, T., REIS, K., BJÖRCK, L. (1985) Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *Journal of Immunology*, 135, 2589-2592.

ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. (1999) *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*. Wiley-VCH, Weinheim.

ALLEN, D., SIMON, T., SABLITZKY, F., RAJEWSKI, K., CUMANO, A. (1988) Antibody engineering for the analysis of affinity maturation of an anti-hapten response. *The EMBO Journal*, 7, 1995-2001.

AMON, J. M., VANDEPEER, J. M., SIMPSON, R. F. (1989) Compounds responsible for cork taint in wine. *Wine Industry Journal*, 4, 62-69.

AUNG, L. H., SMILANICK, J. L., VAIL, P., HARRTSELL, P. L., GOMEZ, E. (1996) Investigations into the origin of chloroanisoles causing musty off-flavours in raisins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 3294-3296.

BARON, D. (1987) Die Herstellung monoklonaler Antikörper. *Praxis der Naturwissenschaften – Biologie*, 3, 13-27.

BETTER, M., CHANG, C. P., ROBINSON, R. R., HORWITZ, A. H. (1988) Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science*, 240, 1041-1043.

BEYER, H., WALTER, W. (1988) *Lehrbuch der organischen Chemie*, S. Hirzel Verlag Stuttgart.

BROCK, T. D., MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. (1994) *Biology of Microorganism*. Prentice-Hall International, Inc.

BRUUN, 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.

BUSER, H. R., ZANIER, C., TANNER, H. (1982) Identification of 2, 4, 6-trichloroanisole as a potent component causing cork taint in wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 30, 359-362.

BUSHWAY, R. J., THOME JR, E. (1998) Determination of metalaxyl in wine by ELISA. *Journal of Food and Agricultural Immunology*, 10, 23-28.

CAMPBELL, A. M. (1984) Cloning by limiting dilution. *Monoclonal antibody technology*. Elsevier Amsterdam, 158-160.

CAMPBELL, A. M. (1991) *Monoclonal antibody and immunosensor technology*. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, Vol. 23, Elsevier Amsterdam.

CASINO, P., MORAIS, S., PUCHADES, R., MAQUIEIRA, A. (2001) Evaluation of enzyme-linked immunoassays for the determination of chloroacetanilides in water and soils. *Environmental Science and Technology*, 35, 4111-4119.

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.

DANESH, P., VELEZ CALDAS, F. M., FIGUEIRODO MARQUES, J. J., SAN ROMAO, M. V. (1997) Mycobiota in Portuguese „normal“ and „green“ cork throughout the manufacturing process of stoppers. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 689-694.

- DIAMANDIS, E. P., CHRISTOPOULOS, T. K. (1991) The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clinical Chemistry*, 37, 625-636.
- DUDLEY, R. A., EDWARDS, P., EKINS, R. P., FINNEY, D. J., MCKENZIE, I G. M., RAAB, G. M., RODBARD, 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.
- EHRENBERGER, F., GORBACH, S. (1973) Methoden der organischen Elementar- und Spurenanalyse. Verlag Chemie Weinheim.
- EHRHARDT, M., KELLNER, J., KUHLMANN, R., LOSCH, U. (1991) Influence of various adjuvants on the synthesis of specific antibodies of chicken, sheep and rabbit following immunization with an hapten. *Journal of Veterinary Medicine, Series A*, 21-27.
- ENGVALL, E., PERLMANN, P. (1971) 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. (1980) The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates: a survey. *Methods in Enzymology*, 70, 85-104.
- FALKENBERG, W., HENGELAGE, T., KRANE, M., BARTELS, I., ALBRECHT, A., HOLTMEYER, N., WÜTHRICH, M. (1993) A simple and inexpensive high density dialysis tubing cell culture system for the in vitro production of monoclonal antibodies in high concentration. *Journal of Immunological Methods*, 165, 193-206.
- FAZEKAS de ST. GROTH, S., SCHEIDEGGER, D. (1980) Production of monoclonal antibodies; strategy and tactics. *Journal of Immunological Methods*, 35, 1-21.
- FENG, P. C. C., WRATTEN, S. J., LOGUSH, E. W., HORTON, S. R., SHARP, C. R. (1990) Immunoassay detection methods for alachlor. *American Chemical Society Symposium Series*, 442.

FISCHER, C., FISCHER, U. (1997) Analysis of cork taint in wine and cork material at olfactory subthreshold levels by solid phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1995-1997.

FREUND, J., CASALS, J., HISMER, E. P. (1937) Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, 37, 509.

GALLATI, H., PRACHT, I. (1985) Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H_2O_2 und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 23, 453-460

GALVE, R., CAMPS, F., SANCHEZ-BAEZA, F., MARCO, M. P. (2000) Development of an immunochemical technique for the analysis of trichlorophenols using theoretical method. *Analytical Chemistry*, 72, 2237-46.

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.

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

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., 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.

GREEN, N. M. (1975) Avidin. *Advanced Protein Chemistry*, 29, 85- 13.

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

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

HOLDE, K. E., BRUGGEN, E. F. J. (1971) The Hemocyanins. *Macromolecules, a series of monographs*. Vol. 5. Subunits in Biological Systems, Part A. Marcel Dekker New York, 1-53.

HOWLAND, P. R., POLLNITZ, A. P., LIACOPOULUS, D., McLEAN, H. J., SEFTON, M.A. (1997) The location of 2,4,6-trichloroanisole in a batch of contaminated wine corks. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 3, 141–145.

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.

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. (1997) *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.

JUAREZ-SALINAS, H., OTT, G. S. (1985) Process for binding IgG protein A. UK patent Application GB2160530.

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.

KARLSSON, S., KAUGARE, A., GRIMVALL, A., BOREN, H., SÄVENHED, R. (1995) Formation of 2,4,6-trichlorophenol and 2,4,6-trichloroanisole during treatment and distribution of drinking water. *Water Science Technology*, 31, 99-103.

KÖHLER, G., MILSTEIN, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495-497.

KONISHI, I., TAJIMA, R., TSUTSUMI, T. (1992) Method for deodorization of cork. US Patent US5174956.

LEE, T. H., SIMPSON, R. F. (1993) Microbiology and chemistry of cork taints in wine. *Wine Microbiology and Biotechnology*, 353-372.

LERNER, R. A., KANG, A. S., BAIN, J. D., BURTON, D. R., BARBAS, C. F. (1992) Antibodies without immunization. *Science*, 258, 1313-1314.

LIGUORI, M. J., HOFF-VELK, J. A., OSTROW, D. H. (2001) Recombinant human interleukin-6 enhances the immunoglobulin secretion of a rabbit-rabbit hybridoma. *Hybridoma*, 20, 189-198.

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

MARAGOS, C. M., McCORMICK, S. P. (2000) Monoclonal antibodies for the mycotoxins Deoxynivalenol and 3-Acetyl-Deoxynivalenol. *Food and Agricultural Immunology*, 12, 181-192.

MARX, A. (1997) Antikörper zum Nachweis von Quecksilber (II). Promotionsschrift 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. *Chemosphere*, 44, 393-399.
- MORENO, M. J., ABAD, A., PELEGRI, R., MARINEZ, M. J., SAEZ, A., GAMON, M., MONTOYA, A. (2001) Validation of a monoclonal enzyme immunoassay for the determination of carbofuran in fruits and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1713-1719.
- NIESSNER, R. (1994) *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry B5*, VCH Cambridge, 140-153.
- PADLAN, E. A. (1994) Anatomy of the antibody molecule. *Molecular immunology*, 31, 169-217.
- PADLAN, E. A., ABERGEL, C., TIPPER, J. P. (1995) Identification of specificity-determining residues in antibodies. *The FASEB Journal*, 9, 133-139.
- 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.
- PENA-NEIRA, A., CONCEPCION GARCIA-VALLEJO, T. H., ESTRELLA, I., SUAREZ, J. A. (2000 a) A survey of phenolic compounds in Spanish wines of different geographical origin. *European Food Research Technology*, 210, 445-448.
- PENA-NEIRA, A., FERNANDEZ de SIMON, B., GARCIA-VALLEJO, M. C., HERNANDEZ, T., CADAHIA, E., SUAREZ, J. A. (2000 b) Presence of cork-taint responsible compounds in wines and their cork stoppers. *European Food Research Technology*, 211, 257-261.
- PESTKA, J. J. (1988) Enhanced surveillance of foodborne mycotoxins by immunochemical assay. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 71, 1075-1081.

- PETERS, J. H., BAUMGARTEN H. (1990) Monoklonale Antikörper. Springer Verlag Berlin.
- POLLNITZ, A. P., PARDON, K. H., LIACOPOULOS, D., SKOROUMOUNIS, G. K., SEFTON, M. A. (1996) The analysis of 2,4,6-trichloroanisole and other chloroanisoles in tainted wines and corks. Australian Journal of Grape and Wine Research, Vol. 2.
- PORSTMANN, T., KIESSIG, S. T. (1992) Enzyme immunoassay techniques. Journal of Immunological Methods, 150, 5-21.
- 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.
- RITTENBERG, M. B., AMKRAUT, A. A. (1966) Immunogenicity of trinitrophenyl-hemocyanin; production of primary and secondary anti-Hapten precipitins. Journal of Immunology, 97, 421-430.
- 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.
- ROSSO, I., GIRAUDI, G., GAMBERINI, R., BAGGIANI, C., VANNI, A. (2000) Application of an ELISA to the determination of benalaxyl in red wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 33-36.

SCHLÄPPI, J. M., FÖRY, W., RAMSTEINER, K. (1990) Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for atrazine and hydroxyatrazine. *Immunochemical Methods for Environmental Analysis*. ACS Symposium Series, 442, 199-210.

SEPPÄLÄ, I. J. T., SARVAS, H., PETERFY, F., MÄKALÄ, O. (1983) The four subclass of IgG can be isolated from mouse serum by using protein A-sepharose. *Scandinavian Journal of Immunology*, 14, 335-342.

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

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

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.

STAROS, J. V., WRIGHT, R. W., SWINGLE, D. M. (1986) Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Analytical Biochemistry*, 156, 220-222.

STOCKER, J. W., FORSTER, H. K., MIGGIANO, V., STÄHLI, C., STAIGER, G., TAKACS, B., STAEHLIN, T. (1982) Generation of 2 new mouse myeloma cell lines PAI and PAI-0 for hybridoma production. *Research Disclosure*, 21713, 155-157.

STOFFELSMA, J., de ROOS, K. B. (1973) Identification of 2,4,6-trichloroanisole in several essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21, 738-739.

TANNER, H., ZANIER, C., BUSER, H. (1981) 2,4,6-Trichloroanisol: Eine dominierende Komponente des Korkgeschmacks. *Schweizerische Zeitschrift für Obst und Weinbau*, 117, 97-100.

TAYLOR, M. K., YOUNG, T. M., BUTZKE, C. E., EBELER, S. E. (2000) Supercritical fluid extraction of 2, 4, 6-trichloroanisole from cork stoppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2208-11.

TIJSSSEN, P. (1985) *Practise and theory of enzyme immunoassays*. Elsevier Amsterdam.

TINDALE, C. R., WHITFIELD, F. B., LEVINGSTON, S. D., NGUYEN, L. T. H. (1989) Fungi isolated from packaging materials: their role in the production of 2, 4, 6-trichloroanisole. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 49, 437-447.

VAN OSS, C. J. (1992) Antibody-antigen intermolecular forces. *Encyclopedia of Immunology*, Vol. 1. Academic Press London.

VAREA, S., GARCIA-VALLEJO, M. C., CADAHIA, E., FERNANDEZ de SIMON, B. (2001) Polyphenols susceptible to migrate from cork stoppers to wine. *European Food Research technology*, 213, 56-61.

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

WELLER, M. G., WEIL, L., NIESSNER, R. (1992) Increased sensitivity of an enzyme immunoassay (ELISA) for the determination of triazine herbicides by variation of tracer incubation time. *Microchimica Acta*, 108, 29-40.

WIESE, F. W., CHANG, H. C., LLOYD, R. V., FREEMAN, J. P., SAMOKYSZYN, V. M. (1998) Peroxidase-catalysed oxidation of 2, 4, 6-trichlorophenol. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 34, 217-222.

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

WITTMANN, C., HOCK, B. (1991) Development of an ELISA for the analysis of atrazine metabolites deethylatrazine and deisopropylatrazine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1194-1200.

YALOW, R. S., BEARSON, S. A. (1959) Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature*, 184, 1648-1649.

Danksagung

Mein rechthertlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. B. Hock, der mir ermöglichte diese interessante Arbeit anzufertigen. Seine Bemühungen um die Gestaltung optimaler Rahmenbedingen für die Forschung, trugen sehr zum Gelingen dieser bei. Seine Vorschläge und Anmerkungen erlaubten mir die erfolgreiche Anfertigung dieser Arbeit.

Besonders Bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Pilar Marco für die Bereitstellung der Haptene und der Kaninchenantiseren.

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

Und mein großer Dank gilt Frau Michaela Krötz für versierte technische Assistenz.

Schließlich möchte ich noch alle Mitarbeiter des Lehrstuhls für Botanik erwähnen. Insbesondere möchte ich Herrn Matthias Kania, Herrn Dr. Karl Kramer, Herrn Dr. Josef Böhm, Frau Doris Rau, Frau Irmgard Scholz und Frau Andrea Schweiger aufführen.

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

Und natürlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir immer zur Seite stehen.

Lebenslauf

Name: Ralph Andreas Lausterer
geboren am: 04.11.1971
geboren in: Wuppertal-Elberfeld
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung und Studium

1978-1982: Grundschule in Wuppertal-Vohwinkel
1982-1991: Gymnasium Nocken in Wuppertal
1991: Abitur
1992-1998: Studium der Gartenbauwissenschaften in Weihenstephan
Januar 1999: Diplom
seit Januar 1999: wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Zellbiologie, Prof. Hock, Freising-Weihenstephan, und währenddessen Erstellung der Promotion