

**Entwicklung eines Enzymimmunoassays
zum Nachweis von Permethrinsäure
[(1RS)-trans-3-(2,2-Dichlorvinyl)-2,2-dimethyl-
cyclopropancarbonsäure] in Urin**

Vom Fachbereich Chemie der Carl-von-Ossietzky Universität
zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

angenommene Dissertation

von

Ralf Willenborg

geboren am 6. Juni 1971 in Friesoythe

Oldenburg, Mai 2001

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Februar 1998 bis Oktober 2000 im Fachbereich Chemie der Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Werner Butte.

Erstreferent: apl. Prof. Dr. Werner Butte

Korreferent: Prof. Dr. Erich Zeeck

Tag der Disputation: 30. April 2001

**Entwicklung eines Enzymimmunoassays
zum Nachweis von Permethrinsäure
[(1RS)-trans-3-(2,2-Dichlorvinyl)-2,2-dimethyl-
cyclopropan-carbonsäure] in Urin**

Vom Fachbereich Chemie der Carl-von-Ossietzky Universität
zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

angenommene Dissertation

von

Ralf Willenborg

geboren am 6. Juni 1971 in Friesoythe

Oldenburg, Mai 2001

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Februar 1998 bis Oktober 2000
im Fachbereich Chemie der Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg unter der
Leitung von Herrn Prof. Dr. Werner Butte.

Erstreferent: apl. Prof. Dr. Werner Butte

Korreferent: Prof. Dr. Erich Zeeck

Tag der Disputation: 30.04.2001

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Danksagung	IX
1 EINLEITUNG	1
2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	7
2.1 Antikörper	7
2.1.1 Polyklonale Antikörper.....	9
2.1.2 Monoklonale Antikörper	9
2.1.3 Rekombinante Antikörper	10
2.1.4 Künstliche Antikörper (Template).....	10
2.2 Immunoassays	11
2.2.1 ELISA-Testformate	12
2.2.2 Messung und Auswertung von ELISAs	16
2.2.3 Kreuzreaktivität	19
3 MATERIAL UND METHODEN.....	20
3.1 Geräte.....	20
3.2 Chemikalien.....	21
3.2.1 Grundchemikalien.....	21
3.2.2 Standardsubstanzen.....	23
3.2.3 Proteine	24
3.2.4 Puffer und Lösungen.....	24
3.2.4.1 Puffer für den Enzymimmunoassay.....	24
3.2.4.2 Puffer und Lösungen für die Reinigung der Antikörper.....	25
3.3 Synthesen	26
3.3.1 Synthese der Haptene	26

3.3.1.1	Darstellung von Permethrinsäurechlorid	26
3.3.1.2	Darstellung von PMS-ABA und PMS-AHA	26
3.3.1.3	Darstellung von PMS-pOHPE	27
3.3.2	Synthese der Immunogene	27
3.3.2.1	Methode A	28
3.3.2.2	Methode B	30
3.3.3	Synthese der Coatingantigene	31
3.3.4	Synthese der Tracer	32
3.3.5	Synthese von Permethrinsäureglucuronid	33
3.4	Hydrolyse der Hapten-Protein-Konjugate	34
3.5	Immunisierung	34
3.6	Isolierung der Antikörper aus dem polyklonalen Rohserum	35
3.6.1	Ammoniumsulfatfällung	35
3.6.2	Affinitätschromatographische Reinigung	35
3.7	Standard-Testvorschriften	37
3.7.1	Durchführung des indirekten ELISAs	37
3.7.2	Durchführung des direkten ELISAs	38
3.8	Direkte Kopplung von PMS-pOHPE an die Mikrotiterplatte	38
3.9	Schachbrett-Titration	39
4	ERGEBNISSE	41
4.1	Synthese und Charakterisierung der Hapten-Protein-Konjugate	41
4.1.1	Nachweis des Kopplungserfolgs durch ELISA	41
4.1.2	Nachweis des Kopplungserfolgs durch Hydrolyse	42
4.2	Immunisierung	43
4.3	Vergleich der Antiseren	44
4.4	Entwicklung eines indirekten ELISAs	46
4.4.1	Auswahl des Hapten-Protein-Konjugats	46
4.4.2	Schachbrett-Titration	47
4.4.3	Einfluß der Temperatur auf die Kompetition	48
4.4.4	Einfluß des pH-Wertes auf die Kompetition	49
4.4.5	Test verschiedener Blockingreagenzien	50
4.4.6	Synthese neuer Hapten-Protein-Konjugate	51
4.4.7	Hapten-Protein-Konjugate mit geringer Haptendichte	53

4.4.8	Hapten-Protein-Konjugat mit neuer Spacergruppe	54
4.4.9	Reinigung der Antiseren	56
4.4.10	ELISA mit den affinitätschromatographisch gereinigten Antiseren	58
4.4.11	Entwicklung eines indirekten ELISA auf Basis kovalent gebundener Haptene	60
4.4.12	Abschließende Untersuchungen	61
4.5	Entwicklung eines direkten ELISAs	62
4.5.1	Herstellung und Screening der Tracer	62
4.5.2	Schachbrett-Titration	63
4.5.3	Test verschiedener Plattenvorbeschichtungen	65
4.5.4	Optimierung von Antikörper- und Tracerverdünnung	66
4.5.5	Variation der Antikörperinkubationszeiten	67
4.5.6	Variation der Tracerinkubationszeit	69
4.5.7	Einfluß von pH-Wert und Pufferkonzentration	70
4.5.8	ELISA unter optimierten Bedingungen	72
4.5.9	Ermittlung der Kreuzreaktivitäten	73
5	DISKUSSION	77
5.1	Synthese und Charakterisierung von Haptenen und Hapten-Protein-Konjugaten	77
5.2	Immunisierung und Antiseren	81
5.3	Entwicklung des Enzymimmunoassays	82
5.3.1	Indirektes Testformat	82
5.3.2	Direktes Testformat	90
5.3.3	Schlußfolgerungen	95
6	ZUSAMMENFASSUNG	98
7	LITERATUR	99
8	ANHANG	109

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturen einiger gebräuchlicher Pyrethroide	1
Abbildung 2: Hydrolyse von Permethrin und Konjugation der Hydrolyse- und Oxidationsprodukte mit Glucuronsäure	4
Abbildung 3: Leitmetabolite ausgewählter Pyrethroide.....	5
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines IgG-Moleküls	8
Abbildung 5: Prinzip eines direkten kompetitiven ELISAs.....	13
Abbildung 6: Prinzip eines indirekten kompetitiven ELISAs.....	15
Abbildung 7: Typische Kalibrierkurve im ELISA.....	18
Abbildung 8: Struktur von PMS-ABA und PMS-AHA.....	26
Abbildung 9: Struktur von PMS-pOHPE.....	27
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Kopplungsreaktion nach der Methode der aktivierten Ester (AE).....	29
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Kopplungsreaktion nach der Methode der gemischten Anhydride (GA)	31
Abbildung 12: Übersicht über die verwendeten Tracer	32
Abbildung 13: Synthese von Permethrinsäureglucuronid.....	333
Abbildung 14: Partielle Struktur von EAH Sepharose™ 4B	35
Abbildung 15: Schematische Darstellung einer Schachbrett-Titration.....	39
Abbildung 16: Nachweis des Kopplungserfolgs durch ELISA.....	42
Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der Immunantwort bei den immunisierten Kaninchen.....	45
Abbildung 18: Untersuchung des Hapten-Protein-Konjugats, des Kontrollkonjugats und des unbehandelten Proteins auf ihre Reaktion mit den Antikörpern .	46
Abbildung 19: Schachbrett-Titration für Antiserum C3	47
Abbildung 20: Erste Kompetitionsversuche aller Antiseren mit trans-PMS.....	48
Abbildung 21: Untersuchung des Temperatureinflusses auf die Competition	49
Abbildung 22: Einfluß des pH-Wertes auf die Competition.....	50
Abbildung 23: Einfluß verschiedener Blockingreagenzien auf die Assayperformance....	51
Abbildung 24: Test neuer Hapten-Protein-Konjugate.....	52
Abbildung 25: Test der Konjugate mit geringer Haptendichte	53
Abbildung 26: Test des Hapten-Protein-Konjugats mit neuem Spacer	54
Abbildung 27: Schematische Darstellung der Affinitätschromatographie.....	56
Abbildung 28: Wirksamkeit der einzelnen Fraktionen der affinitätschromato graphischen Reinigung von Antiserum C3	57
Abbildung 29: Test der affinitätschromatographisch gereinigten Antikörper mit verschiedenen Standards auf Coatingantigen PMS-BSA (GA)	58
Abbildung 30: Test der affinitätschromatographisch gereinigten Antikörper mit verschiedenen Standards auf Coatingantigen PMS-pOHPE-BSA (AE) ..	59

Abbildung 31: Indirekter ELISA mit kovalent an die Mikrotiterplatte gebundenem Hapten	60
Abbildung 32: Vergleich der affinitätschromatographisch gereinigten Antiseren im indirekten ELISA unter optimierten Bedingungen.....	61
Abbildung 33: Überprüfung der Funktionstüchtigkeit der neuen Tracer am Beispiel von PMS-pOHPE-HRP	63
Abbildung 34: Schachbrett-Titration mit Ak G3 affi und PMS-HRP	64
Abbildung 35: Test verschiedener Plattenvorbeschichtungen	65
Abbildung 36: Schachbrett-Titration zur Bestimmung der besten Antikörper- und Tracerverdünnung.....	67
Abbildung 37: Variation der Antikörperinkubationszeiten.....	68
Abbildung 38: Einfluß der Tracerinkubationszeit auf die Testperformance.....	69
Abbildung 39: Einfluß des pH-Wertes auf die Konkurrenz.....	70
Abbildung 40: Einfluß der Pufferkonzentration auf die Konkurrenz.....	71
Abbildung 41: Durchführung des ELISAs unter optimierten Bedingungen.....	72
Abbildung 42: Kalibrierfunktionen zur Ermittlung der Kreuzreaktivitäten (Teil 1).....	74
Abbildung 43: Kalibrierfunktionen zur Ermittlung der Kreuzreaktivitäten (Teil 2).....	75
Abbildung 44: Struktur von Gibberellinsäure	84
Abbildung 45: Mono- und bivalenter Bindungsmechanismus von Antikörpern	86
Abbildung 46: CI-Massenspektrum des „alten“ Standards.....	93

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vor- und Nachteile von mono- und polyklonalen Antikörpern	10
Tabelle 2: Übersicht über die wichtigsten enzymimmunologischen Testverfahren	16
Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Standardsubstanzen	23
Tabelle 4: Übersicht über die synthetisierten und verwendeten Coatingantigene	32
Tabelle 5: Übersicht über die Haptendichten der einzelnen Hapten-Protein-Konjugate ..	43
Tabelle 6: Übersicht über die Bezeichnung der verschiedenen Antiseren, sowie die zu deren Herstellung verwendeten Hapten-Protein-Konjugate	44
Tabelle 7: Übersicht über die getesteten Kreuzreaktanden (Teil 1)	74
Tabelle 8: Übersicht über die getesteten Kreuzreaktanden (Teil 2)	75

Abkürzungsverzeichnis

ABA	4-Aminobutansäure
AE	Methode der aktivierten Ester
AHA	6-Aminohexansäure
Ak	Antikörper
Bidest.	Bidestilliertes Wasser
BSA	Rinderserumalbumin
CFA	komplettes Freund's Adjuvans
Da	Dalton
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECD	Elektroneneinfangdetektor
EDC	N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOH	Ethanol
F _{ab}	Antigenbindendes Fragment
F _c	kristallisierbares Fragment
F _v	variables Fragment
GA	Methode der gemischten Anhydride
GC	Gaschromatographie
h	Stunden
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
HRP	Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase)
IC ₅₀	Testmittelpunkt
IFA	inkomplettes Freund's Adjuvans
Ig	Immunglobulin
k	kilo
KLH	Keyhole Limpet Hämocyanin
KR	Kreuzreaktivität
LOD	Nachweisgrenze
MeOH	Methanol
min	Minute
mM	Millimolar
MS	Massenspektrometrie
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
MW	Molekulargewicht
MWCO	Ausschlußgröße
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	Kernresonanzspektroskopie
OVA	Ovalbumin
p	para
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBST	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween®
PMS	Permethrinsäure

PMS-ABA	Kopplungsprodukt aus Permethrinsäure und 4-Aminobutansäure
PMS-AHA	Kopplungsprodukt aus Permethrinsäure und 6-Aminohexansäure
PMS-Et	Permethrinsäureethylester
PMS-Glu	Permethrinsäureglucuronid
PMS-Me	Permethrinsäuremethylester
PMS-pOHPE	Kopplungsprodukt aus Permethrinsäure und p-Hydroxyphenyl- essigsäure
POD	Peroxidase
p-OHPE	para-Hydroxyphenylessigsäure
RIA	Radioimmunoassay
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
THF	Tetrahydrofuran
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
v/v	Volumenanteil

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Werner Butte danke ich für die interessante Themenstellung, seine stetige Diskussionsbereitschaft und wohlwollende Unterstützung sowie für die mir gewährten Freiräume bei der Durchführung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Erich Zeeck danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Rolf Mentlein von der Universität Kiel für seine Anregungen bei allen Fragen zur Immunisierung. Bei Herrn Dr. Klaus Naumann von der Bayer AG bedanke ich mich für die Bereitstellung der Chemikalien cis- und trans-Permethrinsäure.

Herrn Dr. Michael Müller danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Immunisierung der Kaninchen und für seine fachlichen Ratschläge, die mir bei der Lösung vieler Probleme geholfen haben.

Bei den Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe und bei der Arbeitsgruppe Zeeck bedanke ich mich für die freundschaftliche Atmosphäre und die hervorragende Zusammenarbeit. Insbesondere bei Herrn Dr. Ingo Röhl möchte ich mich für seine große Hilfsbereitschaft, Aufmunterung und viele wertvolle Diskussionen bedanken.

Frau Dipl.-Biol. Heike Fölster danke ich für ihr stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit. Ihr ständiges Hinterfragen ihrer und meiner Ergebnisse und ihre große Diskussionsbereitschaft waren sehr hilfreich beim Erstellen dieser Arbeit.

Ich danke allen Mitarbeitern der Universität, die mich durch ihre kollegiale Zusammenarbeit unterstützt haben. Herrn Dipl.-Chem. Jens Griep-Raming danke ich für seine Unterstützung bei der Aufnahme der Massenspektren.

Frau Claudia Blömer-Westerhoff danke ich für kritische Anmerkungen bei der Fertigstellung der Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen bedanken, die in irgendeiner Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt nicht zuletzt meiner Familie, die mich während meines Studiums und während dieser Arbeit immer unterstützt haben.

1 EINLEITUNG

Extrakte aus Blüten von Chrysanthemen sind seit Jahrhunderten zur Bekämpfung von Insekten bekannt; für die insektizide Wirkung dieser Extrakte sind Pyrethrine verantwortlich (Marquardt und Schäfer, 1997). Diese Pyrethrine dienen als Vorbilder für die synthetischen Pyrethroide, die sich durch stärkere insektizide Wirkung und höhere Persistenz auszeichnen. Die Synthese photostabiler und hydrolyseunempfindlicher Pyrethroide führte in den zurückliegenden Jahren zu einer rasanten Produktionssteigerung und zur Entwicklung zahlreicher pyrethroider Wirkstoffe. Ein ausführlicher Überblick über die historische Entwicklung findet sich bei Davies (1985) sowie bei Naumann (1998). Von den etwa 1000 synthetisierten Pyrethroiden haben aber nur zirka 10 ökonomische Bedeutung erlangt, darunter Cyfluthrin, Cypermethrin, Deltamethrin und Permethrin.

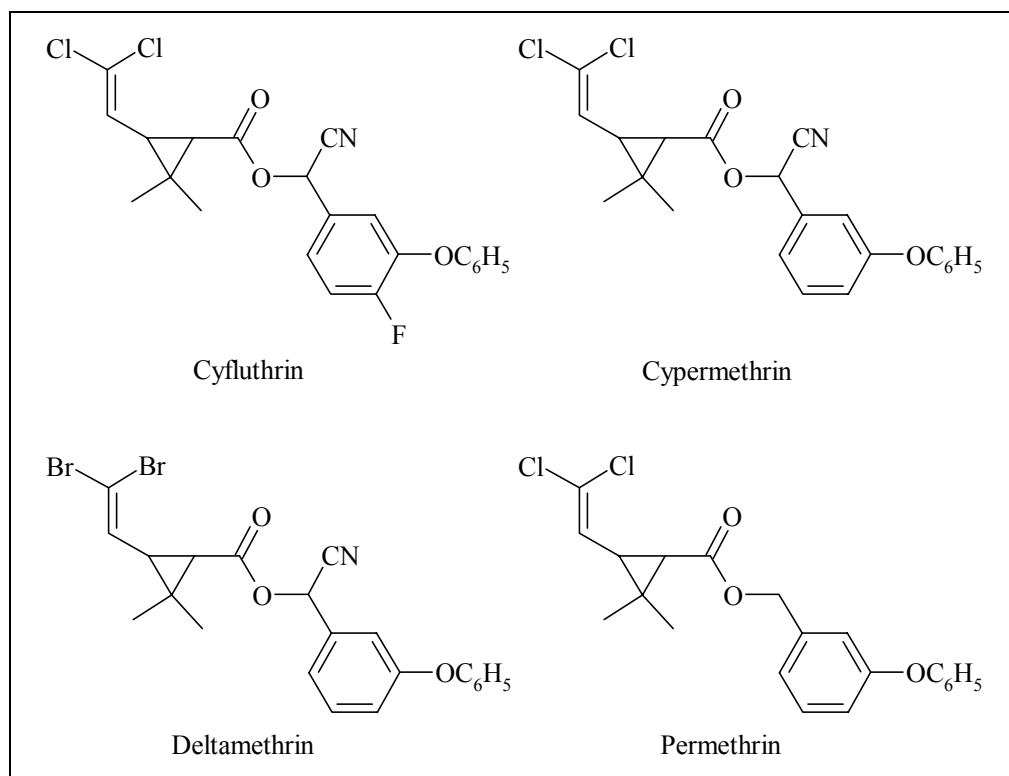


Abbildung 1: Strukturen einiger gebräuchlicher Pyrethroide

Seit 1972 werden Pyrethroide vor allem in der Landwirtschaft als Insektizide eingesetzt, wo sie Organochlor- und Organophosphorpestizide ersetzen. Sie haben inzwischen einen Marktanteil von 23 % erreicht (Casida und Quistad, 1998). Ne-

ben ihrer Verwendung in Land- und Forstwirtschaft werden Pyrethroide im häuslichen Bereich als Holzschutzmittel sowie zur Bekämpfung von Schadinsekten und „Ungeziefer“, wie z.B. Stechmücken, Motten, Silberfischen oder Milben in Form von Sprays oder Elektroverdampfern eingesetzt (Fromme, 1991). In tropischen Ländern setzt man Pyrethroide zur Bekämpfung verschiedener Tropenkrankheiten ein, z.B. gegen die Tsetsefliege als Überträgerin der Schlafkrankheit oder gegen die Anophelesmücke im Rahmen der Malariabekämpfung. Die Anwendung findet in Form von Räucherspiralen, Elektroverdampfern oder als Imprägnierung von Kleidung und Moskitonetzen statt (Bermejo und Veeken, 1992; Procacci et al., 1991; Snodgrass, 1992). Der Wirkstoff Permethrin wird in der Human- und Veterinärmedizin in Medikamenten gegen Körperparasiten wie Kopfläuse, Filzläuse, Milben (Krätze) und gegen Zecken als Überträger der Borreliose in Form von Shampoo und Salben erfolgreich angewendet (Krowchuk et al., 1992; Taplin und Meinking, 1990; Taplin et al., 1990).

Pyrethroide stören die Signalübertragung im Nervensystem und lösen unterschiedlichste Symptome aus. Hinsichtlich der molekularen Wirkung der Pyrethroide zeigen neurophysiologische Untersuchungen, daß der spannungsabhängige Natriumkanal in der Nervenmembran sowohl bei Insekten als auch bei Säugetieren der primäre Wirkort ist (Naumann, 1990). Die Hauptwirkung besteht in einer stereoselektiven Interaktion der Pyrethroide mit Rezeptor-Makromolekülen der aktivierten Natriumkanäle. Nach einer Repolarisierung der Membran verhindert dieser Effekt die schnelle Schließung des Natriumkanals. Daraus resultiert ein zeitlich verlängerter Einstrom von Natriumionen in die Nervenzelle. Die erhöhte Natriumpermeabilität während der Erregung verursacht ausgeprägte repetitive Entladungen in Sinnesorganen, sensorischen und motorischen Nervenfasern und den Fasern der Skelettmuskulatur (Narahashi, 1986; Narahashi et al., 1995). Diese erscheinen als Symptome verschiedener Art, je nach Struktur der Pyrethroide (Typ I oder Typ II). Die Gruppeneinteilung richtet sich nach dem Vorhandensein (Typ I) bzw. dem Fehlen (Typ II) einer Cyanogruppe am α -Kohlenstoffatom (siehe Abbildung 1). Typ I-Pyrethroide wie z.B. Permethrin bewirken ein starkes Zittern des gesamten Organismus (Tremor-Syndrom). Typ II-Pyrethroide wie Cyfluthrin oder Cypermethrin verursachen Bewegungsunruhe und verstärkte Speichelabsonderung (Appel und Gericke, 1993). Eine ausführliche Beschreibung der Symptome findet sich bei McDaniel und Moser (1992).

Pyrethroide galten lange Zeit als relativ harmlos und ungiftig für Warmblüter und fanden deshalb vermehrt Verwendung als Ersatz für DDT und Lindan im Pflanzenschutz und im Hygienebereich. Bei Untersuchungen dieser Substanzen auf das Nervensystem von Warmblütern zeigte sich, daß das Toxizitätspotential einer Pyrethroidexposition möglicherweise lange unterschätzt wurde, da Pyrethroide auf das Nervensystem der Vertebraten genauso wirken wie auf das der Invertebraten.

Typische akute Symptome, wie sie nach Pyrethroidexposition beschrieben werden, sind Hautreizungen, Atembeschwerden, Tränen der Augen, Niesen, Kopfschmerzen und Kopfbrennen (Naumann, 1990). Weiterreichende Symptome äußern sich u.a. als Sehstörungen, Schwindelgefühl oder Gleichgewichtsstörungen und sind bei Müller-Mohnssen und Hahn (1995) genauer dokumentiert. Die langfristigen Folgen einer Pyrethroidintoxikation werden zur Zeit noch kontrovers diskutiert. Sie reichen von Angaben, daß alle Schädigungen reversibel sind, bis zu Ergebnissen über Akkumulation in Fettgewebe, Gehirn und Nervenfasern, immunsuppressive Effekte, Teratogenität, langfristige hirnormale Schädigungen und Psychosyndrome beim Menschen (Appel und Gericke, 1993; Da Silva Gomes et al., 1991a, b; Lukowicz-Ratajczak und Krechinak, 1992; Müller-Mohnssen, 1991; Tippe, 1993).

Beim Säugetier werden die Pyrethroide nach einem Verschlucken (orale Aufnahme), einer Aufnahme durch die Haut (dermale Aufnahme) oder durch Einatmen (inhalative Aufnahme) rasch durch Hydrolyse ihrer Esterbindungen und mikrosomale Oxidation (Leber) metabolisiert. Dabei entstehen als Metabolite u.a. Derivate der Cyclopropancarbonsäure und als Oxidationsprodukte der Alkoholkomponente die entsprechenden Carbonsäuren (z.B. Phenoxybenzoesäuren). Diese Verbindungen werden als freie Carbonsäuren oder an Glucuronsäure, Sulfat, Glycin oder Taurin konjugiert mit dem Urin ausgeschieden (Eadsforth und Baldwin, 1983; Eadsforth et al., 1988). Abbildung 2 (Seite 4) zeigt schematisch die wichtigsten im Leberstoffwechsel von Säugetieren auftretenden Metabolisierungsreaktionen am Beispiel des Permethrins.

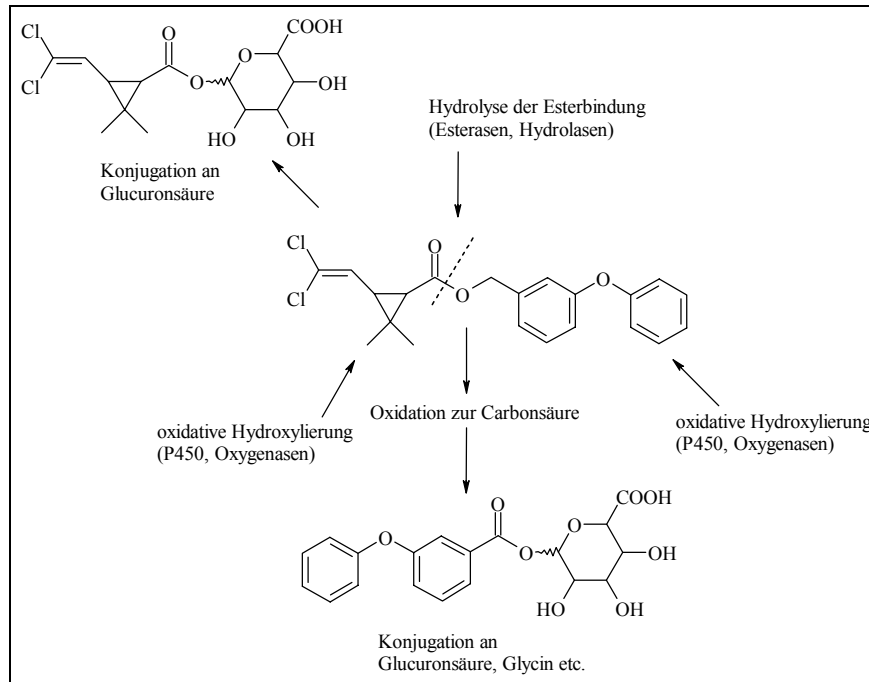


Abbildung 2: Hydrolyse von Permethrin und Konjugation der Hydrolyse- und Oxidationsprodukte mit Glucuronsäure

Wie aus Abbildung 2 zu erkennen ist, gibt es neben der Hydrolyse der zentralen Esterbindung noch eine Reihe weiterer Angriffspunkte für den oxidativen Abbau der Pyrethroide. Besonders die Methylgruppen der Cyclopropan-carbonsäure und verschiedene Ringpositionen des Phenoxybenzoesäurerestes werden dabei hydroxyliert. Bezüglich des Auftretens und der Konzentration weiterer Pyrethroidmetabolite liegen beim Menschen noch keine gesicherten Erkenntnisse vor. Auch sind bisher noch keine weitergehenden Untersuchungen über einen individuell verschiedenen Metabolismus bei exponierten Menschen durchgeführt worden. Der Nachweis einer Pyrethroidexposition erfolgt daher über einfache Leitmetabolite der Pyrethroide im Urin von belasteten Personen. Als Leitmetabolite werden dabei Verbindungen verstanden, die sich erkennbar vom intakten Molekülgerüst der Insektizide ableiten lassen.

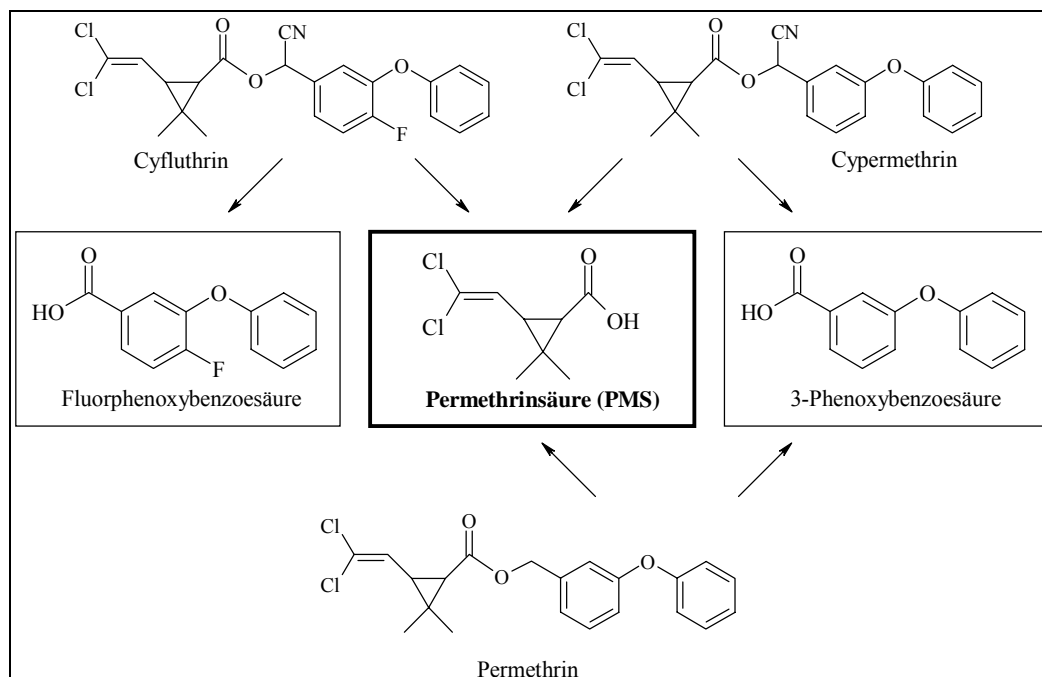


Abbildung 3: Leitmetabolite ausgewählter Pyrethroide

Wie aus Abbildung 3 ersichtlich wird, kann man aus dem Nachweis des Leitmetaboliten Permethrinsäure (PMS) im Urin allein nicht auf die Quelle der Exposition schließen, da PMS sowohl von Permethrin, als auch von Cyfluthrin und Cypermethrin gebildet wird.

Die bisher publizierten analytischen Methoden zum Nachweis von Pyrethroidmetaboliten befassen sich größtenteils mit dem Nachweis in pflanzlichem Material und in menschlichem Urin. Die Methoden lassen sich in drei Teilabschnitte gliedern. Zuerst erfolgt die Freisetzung der Metabolite aus ihren Konjugaten. Dies geschieht entweder durch saure Hydrolyse bei erhöhten Temperaturen (Angerer und Ritter, 1997; Kühn et al., 1996) oder mit Hilfe der Enzyme Glucuronidase und Sulfatase (Meierhenrich, 1997). Im nächsten Schritt wird ein Cleanup der Proben durchgeführt, welches durch flüssig-flüssig Extraktion und/oder Festphasenextraktion erfolgen kann (Angerer und Ritter, 1997; Leng et al., 1997). Da der anschließende Nachweis und die Quantifizierung durch Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) oder mittels Kapillargaschromatographie mit Elektroneneinfangdetektor (GC-ECD) erfolgt, müssen alle Proben vorher derivatisiert werden. Als Derivatisierungsreagenzien werden überwiegend Methanol/Schwefelsäure oder Diazomethan verwendet (Eadsforth und Baldwin, 1983).

Die Nachweisgrenze für Permethrinsäure mit den beschriebenen Methoden liegt zur Zeit bei 0,2 µg/L (Butte et al., 1998). Damit ist eine sichere Überprüfung des Referenzwertes gewährleistet. Der Referenzwert spiegelt die Grundbelastung der

Bevölkerung der Bundesrepublik Deutschland wider, die sich durch die ubiquitäre Verteilung von Pyrethroiden ergibt. Er wurde nach den Vorschlägen der „Human-Biomonitoring-Kommission“ errechnet und liegt für Permethrinsäure bei 0,7 µg/L (Butte et al., 1998). Bei höheren Werten kann von einer über die Grundbelastung hinausgehenden Exposition ausgegangen werden. Die bisherigen Methoden zum Nachweis von Permethrinsäure sind arbeits- und zeitintensiv, teuer und erfordern einen hohen apparativen Aufwand. Die Entwicklung geeigneter Nachweismethoden, die schnell, günstig und ohne apparativen Aufwand Parallelmessungen für größere Probenserien ermöglichen, ist daher erstrebenswert. Diese Voraussetzungen werden von dem *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) erfüllt. Der ELISA, der erstmals im Jahre 1971 beschrieben wurde (Engvall und Perlmann, 1971), ist ein immunochemisches Nachweisverfahren und findet vor allem in der medizinischen Diagnostik breite Anwendung. Durch die Möglichkeit, viele Proben direkt und ohne Aufbereitung mit geringem Aufwand zu messen, hat seine Bedeutung auch in der Umweltanalytik in den vergangenen Jahren stark zugenommen (Alcocer et al., 2000; Li und Li, 2000).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen ELISA zum Nachweis des Pyrethroidmetaboliten (1RS)-trans-3-(2,2-Dichlorvinyl)-2,2-dimethylcyclopropancarbonsäure (PMS, Permethrinsäure) in menschlichem Urin zu entwickeln. Zunächst sollten aus Permethrinsäure oder geeigneten Permethrinsäurederivaten und Proteinen Konjugate zur Immunisierung von Kaninchen synthetisiert werden. Die Herstellung von Antikörpern stellte die zentrale Aufgabe dar. Mit Hilfe dieser Antikörper sollte versucht werden, einen ELISA zu etablieren, der einen qualitativen und quantitativen Nachweis von Permethrinsäure ermöglichte. Dazu sollten die verschiedenen ELISA-Testformate (direkter und indirekter) angewandt und optimiert werden. Nach den Optimierungen sollte überprüft werden, ob eine Konzentrationsbestimmung im diagnostisch relevanten Bereich zwischen 0,1 und 10 µg/L ohne Vorbereitung der Probe möglich ist und der Test damit als Screeningtest eingesetzt werden kann.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 Antikörper

Planmäßige Untersuchungen der Immunität begannen etwa Mitte des 19. Jahrhunderts. Sie hatten zunächst weniger die Erforschung der Ursachen als vielmehr ihre Nutzbarmachung in der Seuchenbekämpfung zum Ziel (Pasteur 1822-1895, Behring 1854-1917, Ehrlich 1854-1917). Ende des 19. Jahrhunderts konnte die Immunität dann auf die Bildung bestimmter Abwehrstoffe infolge einer Infektion zurückgeführt werden. Diese Verbindungen wurden Antikörper genannt.

Die Voraussetzung für die Produktion eines Antikörpers ist das Vorhandensein eines bestimmten Antigens. Antigene sind dabei körperfremde Stoffe, die in den Organismus gelangt sind. Das können fremde Proteine, Glykoproteine, Viren, Bakterien und anderes mehr sein. Chemisch betrachtet sind Antikörper Proteine des Blutplasmas. Sie befinden sich in der Globulinfraction und werden deshalb auch *Immunglobuline* (Ig) genannt. Die Immunglobuline treten in fünf verschiedenen Klassen (IgA, IgD, IgE, IgG und IgM) auf, die alle funktionell unterschiedliche Aufgaben im Ablauf und in der Steuerung der Immunantwort erfüllen (van den Tweel, 1991). Das IgG macht mengenmäßig den Hauptanteil der Antikörper im Serum aus und wird daher zur Immunoassay-Entwicklung verwendet. IgG sind die eigentlichen Vermittler der Immunabwehr, da sie im Falle einer erneuten Antigeninvasion wesentlich schneller und vermehrt ausgeschüttet werden, als dies beim erstmaligen Auftreten eines Antigens der Fall ist (Roitt, 1988). Im Gegensatz zu dieser Sekundärantwort wird die Primärantwort bei einer Erstinfektion vor allem durch die IgM getragen, die wieder aus dem Serum verschwinden, während die IgG während der gesamten Anwesenheit von Antigenen vorhanden bleiben. Gebildet werden die Antikörper von den Plasmazellen (B-Zellen). Die prä-B-Zellen warten dabei auf den Kontakt mit dem zu ihrem Antikörper passenden Antigen. Erst nachdem ein entsprechendes Antigen gebunden wurde, werden die Plasmazellen stimuliert und produzieren den für das Antigen spezifischen Antikörper in größerer Menge. Antikörper können im allgemeinen nur gegen Stoffe mit einer Mindestgröße (Molmasse > 5000 Dalton (Da)) hergestellt werden (Tijssen, 1987). Daher sind die meisten umweltrelevanten Chemikalien, die Molekülmassen von unter 1000 Da aufweisen, für die Stimulation einer Immunantwort nicht geeignet. Sie werden als Haptene bezeichnet. Stellt man dagegen Hapten/Carrier-Konjugate aus dem gewünschten Analyten und z.B. einem Protein her, so können Antikörper auch gegen kleine Moleküle erhalten werden.

Die hohe Spezifität der Antikörper liegt in der Vielzahl verschiedener IgG-Populationen. Bei Säugetieren liegt das Antikörperrepertoire in einer Größenordnung von $10^7 - 10^9$ unterschiedlicher Zelllinien (Mehlhorn, 1989). Aufgrund dieser enormen Zahl an Antikörper-Spezifitäten kann nahezu jede Substanz, die als nicht körpereigen identifiziert wird, durch das Immunsystem erkannt und bekämpft werden. Dabei beruhen die Bindungskräfte zwischen den Antikörpern und den Antigenen auf nichtkovalenten Wechselwirkungen wie elektrostatischen Anziehungen, Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophoben Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Kräften. Diese Bindungen garantieren eine feste Verankerung der Antigene in den Bindungsplätzen der Antikörper und sind um so stärker, je geringer der Abstand zwischen Antigen und Antikörper ist. Die Stabilität des Komplexes wird durch pH-Wert und Temperatur beeinflusst, die Einfluß auf die räumliche Paßform der Antigenbindungsstelle haben. So können unter bestimmten Bedingungen die Bindungen wieder aufgebrochen werden, ohne die Antikörper dabei zu schädigen.

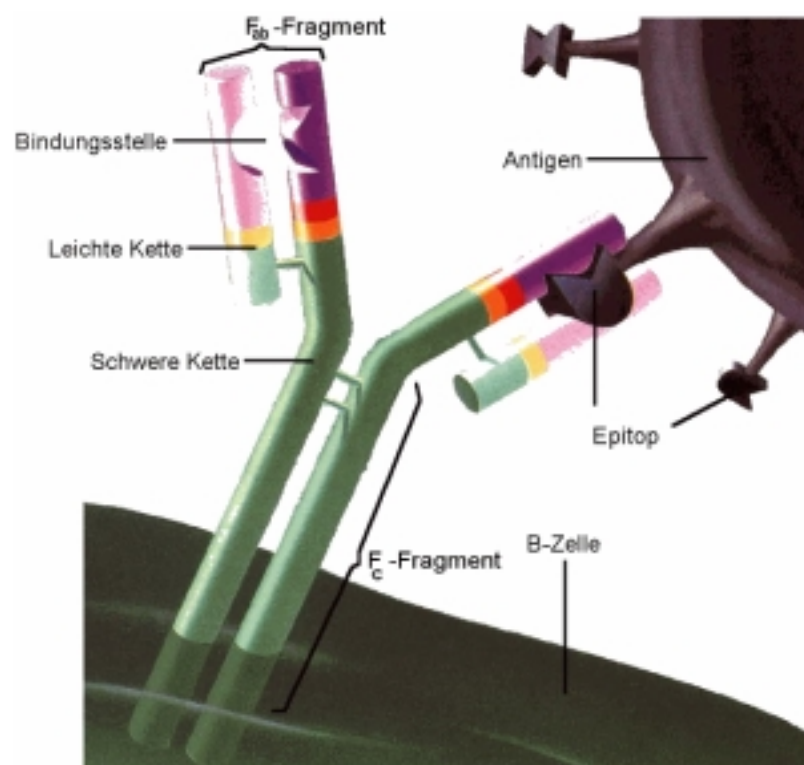


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines IgG-Moleküls (nach TIME-LIFE, 1994)

IgG-Antikörper besitzen ein Molekulargewicht (MW) von 150 kDa und weisen eine Y-förmige Struktur auf. Diese Grundstruktur ist eine Einheit aus vier Polypeptidketten. Je eine schwere (MW 50 kDa) und eine leichte Kette (MW 25 kDa) sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Die beiden schweren Ket-

ten sind über mehrere Disulfidbrücken miteinander verknüpft, so daß die bekannte, symmetrische Y-Struktur entsteht. Dabei werden spezialisierte Bereiche, sogenannte Domänen ausgebildet. Die N-terminalen Regionen der schweren und leichten Ketten bilden zusammen die variable Domäne, die die direkte Antigenbindungsstelle ist. Jeder Seitenarm der Y-förmigen Proteine trägt eine solche Antigenbindungsstelle und wird auch als F_{ab}-Fragment (**antigen binding**) des Antikörpers bezeichnet. Der C-terminale Abschnitt der schweren Ketten, die konstante Domäne, wird, da sie nach einer enzymatischen Spaltung des Antikörpers leicht kristallisierbar ist, F_c-Fragment genannt (**crystallizable**). Der F_c-Teil enthält Kohlenhydratreste, so daß Antikörper zu den Glykoproteinen gezählt werden.

2.1.1 Polyklonale Antikörper

Die im Serum vorliegenden Antikörper unterschiedlicher Spezifität und Affinität sind heterogen, weil sie von vielen verschiedenen antikörperproduzierenden Zellen (Klone) erzeugt wurden. Man bezeichnet das Serum und die darin befindlichen Antikörper als polyklonal.

2.1.2 Monoklonale Antikörper

1975 gelang Milstein und Köhler die Immortalisierung von einzelnen B-Zellen aus der Milz von immunisierten Mäusen durch Fusion mit Myelomzellen (Köhler und Milstein, 1975). Die resultierende Zelllinie einer Fusion ist monoklonal, d.h. sie produziert Antikörper mit nur einer Spezifität gegen das Antigen. Durch Selektion und ein gezieltes Screening identifiziert man die gewünschten Hybridomzellen. Die Vereinzelung dieser Zellen führt zu einzelnen Klonen, die jeweils eine Population von Antikörpern mit definierten Eigenschaften sezernieren. In Zellkulturen können beliebige Mengen dieses Antikörpers produziert werden, die seinen unbegrenzten Einsatz als definiertes Reagenz in der Analytik sichern (Vanderlaan et al., 1987).

Bei monoklonalen Antikörpern muß man den seltenen Fall realisieren, daß man genau die Zelle, die den besten Antikörper produziert, isolieren kann. Dies ist nur bei der Verwendung effektiver Screeningmethoden sowie bei der Untersuchung einer sehr großen Anzahl an Hybridomzellen zu erwarten und führt oft dazu, daß nur mittelmäßige Antikörper gefunden werden. Bei polyklonalen Antikörpern verwendet man dagegen das gesamte Spektrum der produzierten Antikörper. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist in dieser Mischung eine kleine Fraktion exzellenter Antikörper dabei, die den Test dominieren. Das macht sie tendenziell sensitiver, aber auch weniger spezifisch als monoklonale Antikörper.

Tabelle 1: Vor- und Nachteile von mono- und polyklonalen Antikörpern

Monoklonale Antikörper	Polyklonale Antikörper
Vergleich von Immunoassays ist sehr gut möglich, da die letztlich aus einer Zelle stammenden Antikörper identisch sind.	Ein polyklonales Serum ist je nach Tier (Charge) unterschiedlich, daher ist der Vergleich von Immunoassays nur bedingt möglich.
Unbegrenzte Verfügbarkeit der Antikörper, da die Hybridomzellen über lange Zeiträume eingefroren und nach dem Auftauen wieder zur Produktion angeregt werden können.	Serum nur begrenzt verfügbar, da jedes Tier nur eine bestimmte Menge an Serum liefert. Beim Einsatz eines neuen Serums sind u.a. Spezifität und Querempfindlichkeit erneut zu testen.
Monoklonale Antikörper sind sehr selektiv, da alle Antikörper mit unerwünschten Querempfindlichkeiten herausselektioniert werden können.	Polyklonale Antikörper sind häufig nicht so selektiv, da sie ein Gemisch von Antikörpern unterschiedlicher Spezifität darstellen.
Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern ist zeitaufwendig und kostenintensiv.	Die Herstellung von polyklonalen Antikörpern ist einfacher, schneller und damit kostengünstiger als die der monoklonalen.

2.1.3 Rekombinante Antikörper

Im Verlauf der letzten Jahre wurde die molekulargenetische Herstellung rekombinanter Antikörper etabliert (McElhiney et al., 2000). Bei diesen Verfahren beschränkt man sich meist auf die Herstellung von Antikörperfragmenten, welche die Bindungsstelle enthalten. Neben ganzen F_{ab} -Fragmenten werden auch nur die beiden Domänen des F_v -Fragments (variabel, Teil des F_{ab} -Fragments, der die Antigenbindungsstelle bildet) hergestellt (Plückthun und Skerra, 1988). Das Potential dieser Methoden ist außerordentlich und derzeit nur zu einem Bruchteil erschöpft. Einerseits können Antikörper für die Anwendung kostengünstiger produziert werden, da Bakterienkulturen mit biotechnologisch etablierten Methoden zur Expression verwendet werden können. Weiterhin können durch kombinatorische Variation der Aminosäuresequenzen und der Sequenzlängen in den Antigenbindungsstellen Bibliotheken erstellt werden, deren Diversität noch deutlich über der des Immunsystems liegen kann. Dadurch werden Antikörper möglich, die durch klassische Methoden nicht zugänglich sind. Durch gezielte Mutagenese lassen sich vorhandene Antikörper modifizieren und ihre Affinität zu bestimmten *targets* optimieren.

2.1.4 Künstliche Antikörper (Template)

Ob polyklonale, monoklonale oder rekombinante Antikörper, bei allen handelt es sich um biologische Makromoleküle, die vor allem aus Aminosäuren aufgebaut

sind. Die Robustheit gegenüber Matrixeinflüssen, gerade in Umweltproben, ist deshalb eingeschränkt. Seit längerer Zeit gibt es Bemühungen, die "Bindungstaschen" (die Antigen-Erkennungsregionen) von Antikörpern chemisch zu modellieren. Dabei wird versucht, den Zielanalyt (das Antigen) als Matrize (**Schablone, Templat**) zu verwenden und um dieses Molekül herum in Gegenwart von wechselwirkenden Monomeren ein vernetztes Polymer zu synthetisieren. Nach dem Abtrennen der Matrize bleibt im Polymer ein Abdruck (**Imprint**) mit zur Wechselwirkung befähigten Gruppen zurück, wobei dessen Form und die Anordnung der Haftgruppen in ihm komplementär zur Struktur des Matrizenmoleküls sind. Diese Technik rückt mehr und mehr ins Zentrum des Interesses. In naher Zukunft könnten solche Materialien als "künstliche Antikörper" für verschiedenste Anwendungen zur Verfügung stehen (Martin et al., 2000; Olsen et al., 1999).

2.2 Immunoassays

Unter dem Begriff Immunoassay wird eine Vielzahl von Systemen zusammengefaßt, die Antikörper oder funktionelle Teile von Antikörpern in unterschiedlichster Weise zu analytischen Zwecken verwenden. Obwohl die grundlegenden Mechanismen bereits um die Jahrhundertwende bekannt waren, können die Arbeiten von Yalow und Berson als echte Grundlage für den Erfolg der immunologischen Verfahren betrachtet werden.

Yalow und Berson stellten bei ihren Untersuchungen fest, daß bei einigen zuckerkranken Patienten, die mit Rinder- oder Schweineinsulin therapiert wurden, ein verzögerter Abbau des Insulins stattfand. Versuche mit radioaktiv markiertem Insulin zeigten eine Bindung von Insulin an γ -Immunglobuline dieser Patienten, die durch Zugabe von unmarkiertem Insulin kompetitiv gehemmt werden konnte (Berson et al., 1956). Aufgrund dieser Ergebnisse postulierten sie, daß die wiederholte Gabe von (Schweine- oder Rinder-) Insulin zur Bildung von Insulin-Antikörpern führt. In einem weiteren Experiment erzeugten Yalow und Berson in einem Meerschweinchen gezielt Insulin-Antikörper, was zusammen mit einem radioaktiv markiertem Tracer erstmals eine Messung von endogenem Humaninsulin ermöglichte (Yalow und Berson, 1959, 1960). Damit war der **Radioimmunoassay** (RIA) geboren. Für diese Arbeiten erhielt Yalow 1977 den Nobelpreis für Medizin, was die Bedeutung dieser Entdeckung unterstreicht.

Die notwendige Trennung von Antikörper und Antikörper-Antigen-Komplex erfolgte bei Yalow und Berson ursprünglich noch aufwendig durch Papierelektrophorese. Später wurden eine Reihe anderer Techniken zur Trennung verwendet, welche auf der Adsorption der ungebundenen Markierung oder auf der Fäl-

lung der Antikörper beruhten (Palmieri et al., 1971; Zaharko und Beck, 1968). Wesentlich erleichtert wurde die Durchführung von Immunoassays, als Wide und Porath (1966) erkannten, daß Antikörper ihre Aktivität behalten, wenn sie auf Oberflächen von Partikeln immobilisiert werden. Die Abtrennung der auf Zellulose oder Sephadex™ kovalent fixierten Antikörper erfolgte einfach durch Abzentrifugieren der Partikel aus der Reaktionslösung.

Wesentliches Handicap der ersten immunologischen Techniken war die geringe Haltbarkeit der verwendeten Isotopenmarkierung und die allgemein schwierige und mit hohen Sicherheitsmaßnahmen verbundene Handhabung von radioaktivem Material. Deshalb wurde schon von Anfang an nach Möglichkeiten gesucht, die Isotopenmarkierungen durch nicht radioaktive Markierungen zu ersetzen. Erstmals gelang dies Nakane und Pierce (1967), die Enzyme zur Markierung in der Immunhistochemie verwendeten. Schließlich kombinierten Engvall und Perlmann (1971) das Verfahren der enzymatischen Markierung mit der Immobilisierung von Antikörpern auf Oberflächen und etablierten so den ersten ELISA (**E**nzyme-**L**inked **I**mmunosorbent **A**ssay). Praktisch zeitgleich publizierten van Weemen und Schuurs (1971, 1972) Immunoassays, bei denen ebenfalls immobilisierte Antikörper und Enzymmarkierungen verwendet wurden. Da dieses Testprinzip einfache Durchführbarkeit mit hoher Selektivität und Sensitivität kombinierte, entwickelte es sich vor allem im Bereich der medizinischen Analytik sehr schnell zu einem Standardverfahren. Die Übertragung des ELISA-Prinzips auf standardisierte Mikrotiterplatten, die die Testdurchführung weiter vereinfachten und eine Automatisierung der Messungen zuließen, beschleunigte die Verbreitung des ELISAs weiter.

2.2.1 ELISA-Testformate

In kompetitiven Tests wird ein Unterschub an Antikörpern eingesetzt, um dessen Bindungsstelle der Analyt mit einer anderen Assaykomponente (Tracer oder Coatingantigen) konkurriert. Dieses Prinzip läßt sich in zwei Testformaten anwenden: als direkter oder indirekter ELISA. Beide Formate wurden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt und sollen daher im folgenden genauer erläutert werden.

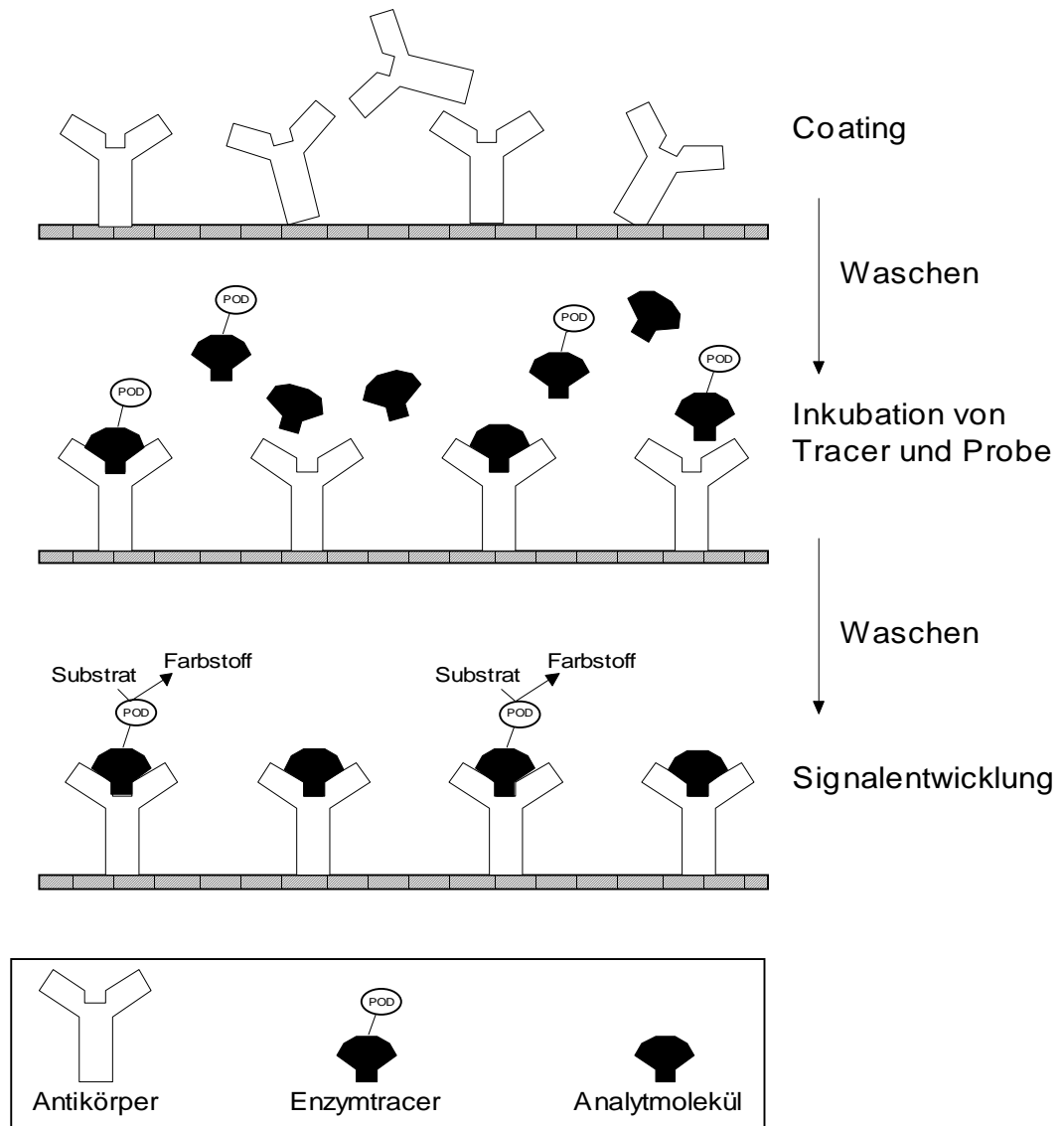


Abbildung 5: Prinzip eines direkten kompetitiven ELISAs

Das Prinzip eines direkten kompetitiven ELISAs ist in Abbildung 5 dargestellt. Im ersten Schritt werden die Antikörper auf einer Oberfläche immobilisiert (Coating), wobei die Bindung der Antikörper meist durch unspezifische Adsorption an einer Polystyroloberfläche erfolgt. Nach dem Entfernen überschüssiger Antikörper durch einen Waschschrift, wird die den Analyten enthaltene Probe zusammen mit einem enzymmarkierten Analytderivat (Tracer) inkubiert. Nun kommt es zwischen Analyt und Tracer zu einer Konkurrenzreaktion um die Antikörperbindungsstellen auf der Platte. Das Verhältnis, in dem Tracer und Analyt die Antikörperbindungsstellen besetzen, spiegelt das Konzentrationsverhältnis in der Lösung wider. Je mehr Analyt sich in der Lösung befindet, desto weniger Tracermoleküle binden an die Oberfläche. Nicht gebundene Komponenten werden wiederum durch einen Waschschrift entfernt. Zur Signalentwicklung wird dann ein Sub-

strat für das auf der Oberfläche gebundene Enzym zugegeben. Die Intensität des Signals ist dabei direkt proportional zur Menge an gebundenem Enzym, also umgekehrt proportional zur Menge an Analyt in der Probenlösung.

In Abbildung 6 (nächste Seite) wird der schematische Ablauf eines indirekten kompetitiven ELISAs gezeigt. Hier muß zunächst das Hapten an eine Oberfläche immobilisiert werden. Dazu verwendet man in der Regel Konjugate, die durch kovalente Kopplung des Haptens an Proteine oder andere Polymere, die gut auf Oberflächen adsorbieren, hergestellt werden. Diese Beschichtungskonjugate (Coatingantigene) immobilisiert man dann adsorptiv auf der verwendeten Oberfläche. Seltener ist die direkte Immobilisierung des Haptens auf der Oberfläche, die kovalent (Yonezawa et al., 1993) oder adsorptiv (Aston et al., 1997) erfolgen kann. Nach dem Coating wird überschüssiges Material durch einen Waschschrift entfernt. Zur Absättigung und Blockierung aktiver Stellen auf der Polystyrolplatte, kann eine Inkubation mit einem geeigneten Reagenz, z.B. einem inerten Protein, erfolgen. Nach einem Waschschrift werden die Probenlösung und eine konstante Menge Antikörper inkubiert. Es kommt zur Konkurrenz zwischen freien Analytmolekülen und den auf der Oberfläche fixierten Haptenen um die Bindungsstellen der Antikörper. Je weniger Analyt sich in der Probenlösung befindet, um so mehr Antikörper können über das Hapten an die Oberfläche binden. Es erfolgt ein weiterer Waschschrift. Im Anschluß daran wird ein enzymmarkierter Sekundärantikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist gegen den konstanten (F_c) Teil des im kompetitiven Schritt eingesetzten Antikörpers gerichtet und dient lediglich der Signalerzeugung. Natürlich wäre es auch möglich, den analytbindenden Antikörper mit einer Enzymmarkierung zu versehen. Da die Protein/Protein-Kopplung nur schwer zu kontrollieren ist und es dabei zu Aktivitätseinbußen des Antikörpers kommen kann, greift man meistens auf enzymmarkierte Sekundärantikörper zurück, die in guter Qualität kommerziell verfügbar sind. Nicht gebundener Sekundärantikörper wird durch Waschen entfernt, das Meßsignal wird durch Zugabe eines Enzymsubstrates entwickelt. Auch hier ist die Signalintensität umgekehrt proportional zur Menge an Analyt.

siert ist. Von diesen unterscheiden sich die homogenen Immunoassays (Jenkins, 1992). Es handelt sich ebenfalls um kompetitive Verfahren, welche vollständig in Lösung ablaufen und keine Waschschriffe benötigen. Ein Beispiel eines solchen Verfahrens ist der EMIT (**E**nzyme-**M**ultiplied **I**mmunoassay **T**echnique) (Hartung et al., 2000; Rasanen et al., 2000). Das Testprinzip beruht auf der unterschiedlichen Enzymaktivität des freien und des gebundenen Hapten-Enzym-Konjugats. Homogene Immunoassays sind zwar einfach in der Anwendung und gut zu automatisieren, sie sind jedoch im allgemeinen störanfälliger und weniger nachweisstark als heterogene Immunoassays.

Neben den kompetitiven gibt es auch nichtkompetitive ELISAs, die hier nur kurz erwähnt werden sollen. Bei den meisten nichtkompetitiven Tests wird das Antigen von zwei Antikörpern gebunden, die beide im Überschuß vorhanden sind. Da der Analyt dabei von zwei „Antikörperschichten“ umgeben ist, spricht man auch von Sandwich-Immunoassays (Chavez-Olortegui et al., 2001; Uchida et al., 2000). Voraussetzung ist dabei, daß der Analyt mindestens zwei Bindungsstellen für Antikörper (Epitope) trägt. Das Testverfahren ist deshalb für Haptene nicht einsetzbar, da diese nur eine antigene Determinante aufweisen. In Tabelle 2 sind einige der wichtigsten enzymimmunologischen Testverfahren dargestellt.

Tabelle 2: Übersicht über die wichtigsten enzymimmunologischen Testverfahren

Antikörper- überschußassay	direkter ELISA	kompetitiv	heterogen	siehe Abbildung 5
	indirekter ELISA	kompetitiv	heterogen	siehe Abbildung 6
		kompetitiv	homogen	Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique (EMIT)
Antikörper- überschußassay	Sandwich-ELISA	nichtkompetitiv	heterogen	

2.2.2 Messung und Auswertung von ELISAs

Zur Signalerzeugung in ELISAs können eine Reihe verschiedener Enzyme eingesetzt werden, die eine Vielzahl von Substraten umsetzen. Am häufigsten wird Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) verwendet, da sie eine Reihe von Vorzügen aufweist. Sie ist günstig in hoher Reinheit verfügbar, robust und ein äußerst empfindlicher Marker, so daß die Markierung mit HRP die Methode der Wahl für ELISAs ist (Porstmann und Kiessig, 1992). Obwohl für HRP eine große Anzahl verschiedener chromogener, fluorogener und luminogener Substrate zur Verfügung steht, wird meistens 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) als chromogenes Substrat verwendet. Der Grund dafür liegt zum einen darin, daß die zur Messung notwendigen Photometer billiger als Fluoreszenz-

oder Lumineszenz-Detektoren sind. Zum anderen ist TMB im Gegensatz zu vielen anderen Substraten weder mutagen noch cancerogen (Bos et al., 1981). Auch in dieser Arbeit wurde als Markierung ausschließlich Meerrettich-Peroxidase mit TMB als Substrat verwendet.

Für die quantitative Auswertung von ELISA-Daten muß eine Kalibrierkurve erstellt werden. In semilogarithmischer Auftragung erhält man dabei sigmoidale Kurven. Die Linearisierung dieser Kalibrierkurven war lange Zeit die gängigste Methode, die häufigste Methode wird als „Logit/Log“ bezeichnet. Sie wurde von Berkson erstmals für Bio-Assays angewendet (Berkson, 1944). Allerdings weist diese Art der Auswertung einige gravierende Schwächen auf. So verleitet die Kalibriergerade zur Extrapolation des Meßbereichs, was zu falschen Ergebnissen führt. Außerdem lassen sich die Meßdaten nicht immer gut linear darstellen, so daß manchmal eine signifikante Krümmung zurückbleibt.

Eine sehr vielseitige, semiempirische Gleichung zur Auswertung von sigmoidalen Kalibrierkurven wurde von Rodbard (1974) eingeführt. Sie ist als 4-parametrische (logistische) Gleichung bekannt und hat gut interpretierbare Parameter. Sie setzt eine sigmoidale Kurvenform voraus und gleicht dadurch kleine Meßfehler sehr zuverlässig aus. Eine Gruppe anerkannter Experten hat auf Anregung der Internationalen Atomenergiebehörde Empfehlungen zur Auswertung von Immunoassay-Daten veröffentlicht (Dudley et al., 1985). In diesem Papier wird die 4-parametrische Gleichung ausdrücklich als gut geeignet bezeichnet. Dagegen werden Linearisierungen (wie z.B. Logit/Log) als nicht mehr sinnvoll angesehen. Viele Fragen zu den Themen Vertrauensbereich, Präzisionsprofile, Qualitätskontrolle u.a. werden in dem o.g. Papier diskutiert.

Die heute fast ausschließlich verwendete 4-parametrische Funktion lautet:

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

X	Konzentration des Analyten, z.B. [$\mu\text{g/L}$]
Y	Signal
A	Maximales Signal (obere Asymptote)
D	Minimales Signal (untere Asymptote)
C	Testmittelpunkt (IC_{50} , 50 %-Wert) z.B. [$\mu\text{g/L}$]
B	Steigung am Testmittelpunkt

In Abbildung 7 sieht man den typischen sigmoidalen Verlauf einer Kalibrierkurve, die sich aus der Datenanpassung nach dem 4-Parameter-Modell ergibt. Die Datenanpassung erfolgt dabei durch nichtlineare Regression mit Hilfe eines Computerprogramms (z.B. Microcal Origin[®] (1997)). Die Parameter A und D grenzen die Kurve als obere und untere Asymptote ab. Der Parameter C gibt den Testmittelpunkt (IC_{50} , concentration of 50 % inhibition) der Kalibrierkurve an. Im linearen Bereich um den Testmittelpunkt ist die Auswertung unbekannter Analytkonzentrationen möglich.

Die Sensitivität des Assays wird neben dem Testmittelpunkt durch einen weiteren Parameter ausgedrückt (Brady, 1995). Die Nachweisgrenze (LOD, limit of detection) gibt die niedrigste Analytkonzentration an, mit der ein statistisch signifikanter Wert erzielt werden kann. Da die statistisch korrekte Berechnung einer Nachweisgrenze bei sigmoidalen Kalibrierkurven recht komplex ist (Rodbard, 1978), wird sie im allgemeinen als Mittelwert des Nullwertes abzüglich dreier Standardabweichungen definiert (Beyer, 1998; Pfortner, 1998).

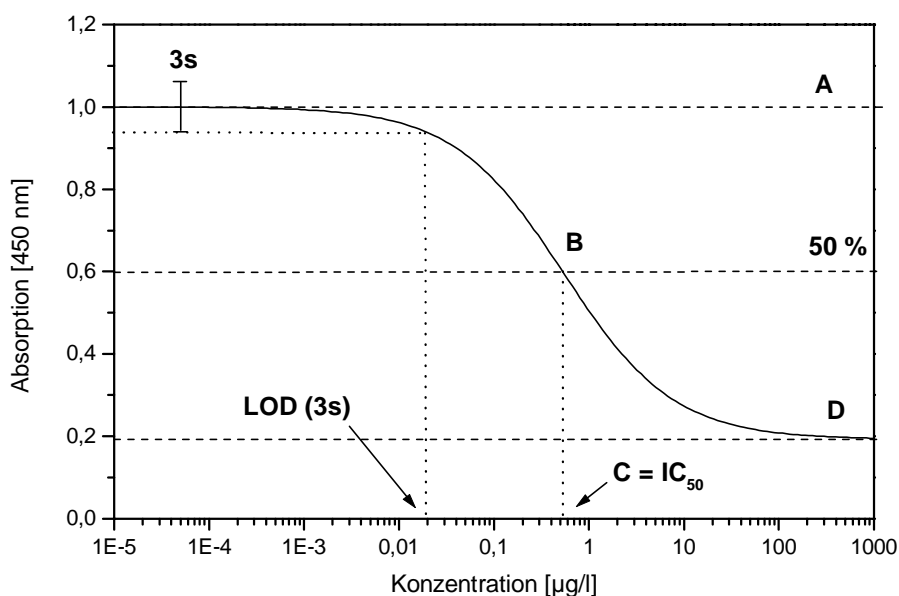


Abbildung 7: Typische Kalibrierkurve im ELISA

2.2.3 Kreuzreaktivität

Grundlage kompetitiver ELISAs ist die Konkurrenzreaktion zwischen einem frei in der Lösung befindlichen Analyten und einem (an den Tracer oder das Coating-antigen) gebundenen Hapten. Die Fähigkeit des Antikörpers, auch andere Strukturen als das zu seiner Herstellung verwendete Hapten zu erkennen, bezeichnet man als Kreuzreaktivität oder Querempfindlichkeit. Als häufigste Definition für die Kreuzreaktivität konnte sich ein massenbezogener Vergleich der Testmittelpunkte durchsetzen (Abraham, 1969). Dazu wird eine Verdünnungsreihe des Kreuzreaktanden und des Analyten unter den gleichen Bedingungen vermessen. Die erhaltenen Rohdaten werden an die 4-parametrische Gleichung angepaßt und der Testmittelpunkt C für beide Kurven bestimmt. Die Kreuzreaktivität KR [%] ergibt sich dann nach:

$$KR \text{ [%]} = \frac{C_{Analyt}}{C_{Kreuzreaktand}} \times 100 \quad \text{Gleichung 2}$$

KR [%]	Kreuzreaktivität
C_{Analyt}	Testmittelpunkt der Standardsubstanz
$C_{Kreuzreaktand}$	Testmittelpunkt des Kreuzreaktanden

Bei der Messung wird die Absorption einer unbekannt Probe mit der Absorption einer Standardmischung verglichen und so einer bestimmten Konzentration zugeordnet. Dadurch wird gefolgert, daß das Signal der unbekannt Probe ähnlich oder gleich dem Signal einer definiert zusammengesetzten Standardlösung ist. Dies kann natürlich nur eine Näherung sein. Deshalb sollten die Ergebnisse eines Immunoassays eigentlich nur als „Analyt-Äquivalente“ angegeben werden (Brady, 1995). Zum Screening ist es vielfach jedoch ausreichend, eine Angabe über das Vorhandensein oder die Abwesenheit einer bestimmten Stoffgruppe zu haben. Welche Substanzen tatsächlich in welchem Verhältnis vorliegen, muß mit einer konventionellen Methode, wie der GC oder der HPLC, bestimmt werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Geräte

pH-Meter Methrom 623 mit pH-Elektrode InLab [®] 420	Mettler Toledo
Magnetrührer	IKA
Rüttler, Minishaker MS1	IKA
Dialyseschläuche, MWCO: 12-14 kDa	Medical International
Ultraschallstab	Branson Sonic Power
Mikrotiterplattenwaschgerät Accuwash 2	Tricontinent Scientific
Mikrotiterplattenphotometer, Modell 450	Bio Rad
Mikrotiterplatten, Maxisorb F16	Nunc
Mikrotiterplatte mit Aminoberfläche, Costar 2388	Costar
Klebefolie	Permacel
Gelfiltrationssäulen, PD-10, Sephadex [™] G-25 M	Pharmacia
EAH Sepharose [™] 4B	Pharmacia
8-Kanal-Pipette	Braun
12-Kanal-Pipette	Braun
Ultrafiltrationsanlage, Modell 8050 mit Membran YM 10 (MWCO 10 kDa)	Amicon
Rotationsverdampfer	Jürgens, IKA-Werk
UV-Vis-Einstrahlphotometer	Pharmacia
Ultraschallbad, RK 510 H	Bandelin Sonorex

HPLC: Gradientenpumpe Waters 660 mit Autosampler 730 und Photodiodenarraydetektor 996, RP-18 Säule (10 x 250 mm, 10 µm), Merck

GC-MS: Gaschromatograph Varian Star 3400 CX mit temperaturprogrammierbarem Injektor SPI 1093; Autosampler Varian 8200; Massenspektrometer Varian Saturn 3 (Iontrap); Kapillarsäule DB 5-MS (30 m, 0,25 mm I.D., 0,25 µm Filmdicke, J & W)

3.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nichts anderes angegeben ist, in p.a.-Qualität eingesetzt.

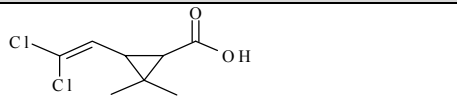
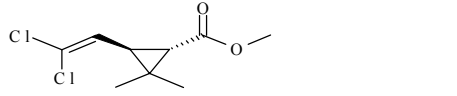
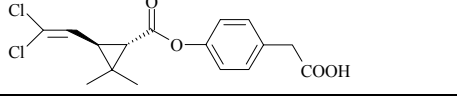
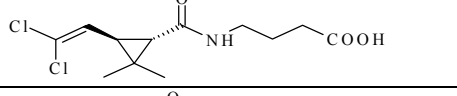
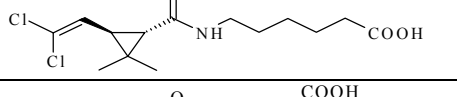
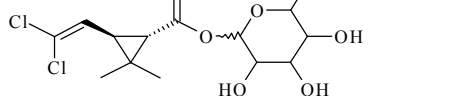
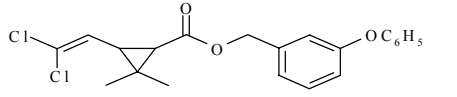
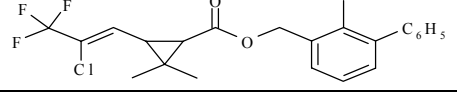
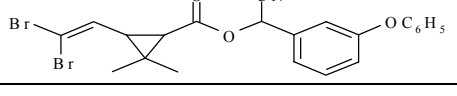
3.2.1 Grundchemikalien

Aceton	Scharlau
Acetonitril	Scharlau
4-Aminobutansäure	Fluka
6-Aminohexansäure	Lancaster
Ammoniumsulfat	Fluka
Citronensäure	Janssen Chimica
Chlorameisensäure- <i>iso</i> -butylester	Lancaster
Diazomethan	eigene Herstellung
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)	Merck-Schuchardt
N,N'-Dimethylformamid (DMF)	Fluka
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Scharlau
Di-(N-succinimidyl)-carbonat (DSC)	Fluka
Essigsäure	Riedel de Haën
Ethanol	Scharlau
Ethylacetat	Promochem
N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid (EDC)	Sigma
Freundsches Adjuvans (inkomplett)	Sigma
Freundsches Adjuvans (komplett)	Sigma
D-Glucuronsäure	Fluka

<i>n</i> -Hexan	Scharlau
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	Merck-Schuchardt
N-Hydroxysulfosuccinimid Natriumsalz	Fluka
p-Hydroxyphenylelessigsäure	Sigma
Methyl- <i>tert</i> -butylether (MTBE)	Promochem
Natriumcarbonat	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Scharlau
Natriumchlorid	Baker
Natriumhydroxid	Riedel de Haën
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Fluka
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck
Pyridin	Fluka
Salzsäure	Fluka
Schwefelsäure	Merck
Tetrahydrofuran (THF)	Fluka
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidindihydrochlorid (TMB)	Sigma
Tween 20 [®] (Polyethylensorbitanmonolaureat)	Serva
Tributylamin	Fluka
Triethylamin	Fluka
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Scharlau
Wasserstoffperoxid	Janssen Chimica
Bidestilliertes Wasser (Bidest.)	eigene Herstellung

3.2.2 Standardsubstanzen

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Standardsubstanzen

Struktur	IUPAC-Bezeichnung	In der Arbeit verwendete Bezeichnung bzw. Abkürzung	Herkunft
	(1R)-cis/trans-3-(2,2-Dichlorvinyl)-2,2-dimethyl-cyclopropanecarbonsäure	cis- bzw. trans-Permethrinsäure cis-PMS trans-PMS	Spende der Firma Bayer
	(1R)-trans-3-(2,2-Dichlorvinyl)-2,2-dimethyl-cyclopropanecarbonsäuremethylester	Permethrinsäuremethylester PMS-Me	Spende der Firma Bayer
	(1R)-trans-3-(2,2-Dichlorvinyl)-2,2-dimethyl-cyclopropanecarbonsäure 4-carboxymethyl-phenylester	PMS-pOHPE	Eigene Herstellung
	4-[[(1R)-trans-3-(2,2-Dichlorvinyl)-2,2-dimethyl-cyclopropanecarbonyl]-amino]-butansäure	PMS-ABA	Eigene Herstellung
	6-[[(1R)-trans-3-(2,2-Dichlorvinyl)-2,2-dimethyl-cyclopropanecarbonyl]-amino]-hexansäure	PMS-AHA	Eigene Herstellung
	6-[(1R)-trans-3-(2,2-Dichlorvinyl)-2,2-dimethyl-cyclopropanecarbonyloxy]-3,4,5-trihydroxy-tetrahydropyran-2-carbonsäure	Permethrinsäureglucuronid PMS-Glu	Eigene Herstellung
	3-(2,2-Dichlorvinyl)-2,2-dimethyl-cyclopropanecarbonsäure 3-phenoxybenzyl ester	Permethrin	Dr. Ehrenstorfer
	3-(2-Chlor-3,3,3-trifluor-propenyl)-2,2-dimethyl-cyclopropanecarbonsäure 2-methyl-biphenyl-3-ylmethyl ester	Bifenthrin	Dr. Ehrenstorfer
	3-(2,2-Dibromvinyl)-2,2-dimethyl-cyclopropanecarbonsäure cyano-(3-phenoxyphenyl)-methyl ester	Deltamethrin	Dr. Ehrenstorfer

3.2.3 Proteine

Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
Ovalbumin (OVA)	Riedel de Haën
Hämocyanin, Keyhole Limpet (KLH)	Sigma
Casein	Fluka
Protein A	Sigma
Magermilchpulver	Oxoid
Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Sigma
Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper	Sigma
Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper, Peroxidase markiert	Sigma

3.2.4 Puffer und Lösungen

3.2.4.1 Puffer für den Enzymimmunoassay

Carbonatpuffer (Coatingpuffer, 50 mmol/L, pH 9,6)

1,70 g Na_2CO_3 (16 mmol)
2,86 g NaHCO_3 (34 mmol)
auf 1 L Bidest.

Phosphat-Kochsalz-Puffer ([PBS 1], 80 mmol/L, pH 7,6)

1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (10 mmol)
12,46 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (70 mmol)
8,5 g NaCl
auf 1 L Bidest.

Phosphat-Kochsalz-Puffer ([PBS 2], 1,5mol/L, pH 7,6)

3,9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (28 mmol)
10,7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (60 mmol)
84,75 g NaCl
auf 1 L Bidest.

Waschpuffer (PBST, 8 mmol/L, pH 7,6)
[PBS 1] 1:10 verdünnt
0,5 mL Tween 20[®]

Citratpuffer (Substratpuffer, 100 mmol/L, pH 5)
7,29 g Citronensäure (34 mmol)
14,41 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O (66 mmol)
auf 1 L Bidest.

3.2.4.2 Puffer und Lösungen für die Reinigung der Antikörper

Glycinpuffer (100 mmol/L, pH 2,5)
11,15 g Glycin·HCl (100 mmol)
auf 1 L Bidest.

TRIS-Puffer (1 M, pH 8)
121,1 g TRIS (1 Mol)
auf 1 L Bidest.

TRIS-Puffer (10 mmol/L, pH 8,8)
1,21 g TRIS (10 mmol)
auf 1 L Bidest.

TRIS-Puffer (10 mmol/L, pH 7,5)
1,21 g TRIS (10 mmol)
auf 1 L Bidest.

TRIS-Kochsalz-Puffer (10 mmol/L, pH 7,5)
1,21 g TRIS (10 mmol)
29,2 g NaCl (0,5 mol)
auf 1 L Bidest.

Triethylaminpuffer (100 mmol/L, pH 11,5)
10,12 g Triethylamin (100 mmol)
auf 1 L Bidest.

MgCl₂-Lösung (3,5 mol/L)
333,24 g MgCl₂ (3,5 mol)
auf 1 L Bidest.

3.3 Synthesen

3.3.1 Synthese der Haptene

Neben Permethrinsäure wurden drei weitere Haptene für die anschließende Verwendung in der Synthese der Immunogene bzw. der Coatingantigene hergestellt. Es handelte sich dabei um Derivate der Permethrinsäure, die mittels modifizierter Schotten-Baumann Reaktion hergestellt wurden. Ausgangspunkt der Synthese war jeweils das Permethrinsäurechlorid, das nach einer Methode von Becker et al. (1990) hergestellt wurde.

3.3.1.1 Darstellung von Permethrinsäurechlorid

522,5 mg (2,5 mmol) Permethrinsäure wurden mit 2 mL Thionylchlorid versetzt. Nach dem Ende der spontanen Reaktion wurde das Gemisch 2 Stunden auf dem Wasserbad unter Rückfluß erhitzt. Dabei nahm die Lösung eine hellgelbe Farbe an. Im Anschluß daran wurde überschüssiges Thionylchlorid unter Wasserstrahlvakuum bei ca. 60°C abdestilliert. Es wurde ein 100 %iger Umsatz angenommen. Das entstandene Säurechlorid wurde sofort weiter umgesetzt.

3.3.1.2 Darstellung von PMS-ABA und PMS-AHA

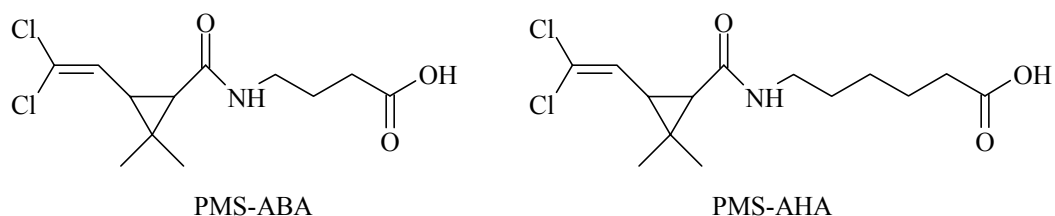
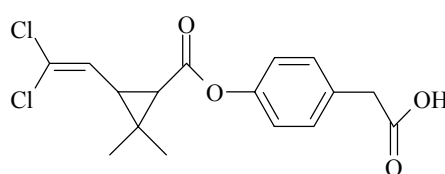


Abbildung 8: Struktur von PMS-ABA und PMS-AHA

515,6 mg (5 mmol) 4-Aminobutansäure (ABA) bzw. 656 mg (5 mmol) 6-Aminohexansäure (AHA) wurden in 10 mL 1 M NaOH gelöst und im Eisbad bei 5°C gerührt. Das zuvor dargestellte Permethrinsäurechlorid wurde in 2 mL THF gelöst und langsam zur eisgekühlten 4-Aminobutansäurelösung bzw. 6-Aminohexansäure getropft. Es resultierte eine gelbe, trübe Lösung, die 2 Stunden bei RT ge-

rührt wurde. Anschließend wurde die Lösung in 30 mL einer 1 M HCl eingerührt. Es entstand ein weißer Niederschlag. Dieser wurde abfiltriert, mehrfach mit Wasser und Hexan gewaschen und im Vakuumexsiccator über Blaugel getrocknet. Die Ausbeute betrug 587 mg (76 %) für PMS-ABA und 388 mg (46 %) für PMS-AHA. Die Charakterisierung erfolgte durch ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie Massenspektrometrie und ist dem Anhang zu entnehmen (Seite 109).

3.3.1.3 Darstellung von PMS-pOHPE



PMS-pOHPE

Abbildung 9: Struktur von PMS-pOHPE

682 mg (5 mmol) p-Hydroxyphenyllessigsäure wurden in 10 mL 0,1 M NaOH gelöst und im Eisbad bei 5°C gerührt. Das weitere Vorgehen war wie bei der Darstellung von PMS-ABA bzw. PMS-AHA. Es entstand allerdings kein Niederschlag, sondern ein gelber, öliges Rückstand, der nach einer gaschromatographischen Analyse als ein Stoffgemisch aus Produkten und Edukten identifiziert wurde. Die Trennung dieses Gemisches gelang mit Hilfe der präparativen HPLC über eine RP18-Säule mit Acetonitril/Wasser 70/30 (v/v) als Eluenten. Auf diese Weise konnten 56,5 mg (7 %) PMS-pOHPE in reiner Form dargestellt werden. Die Charakterisierung erfolgte wiederum durch ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie Massenspektrometrie und ist dem Anhang zu entnehmen (Seite 109).

3.3.2 Synthese der Immunogene

Es wurden insgesamt acht Kaninchen immunisiert. Die zur Immunisierung verwendeten Immunogene wurden nach zwei verschiedenen Verfahren hergestellt. Bei allen Immunogenen wurde als Carrierprotein Keyhole Limpet Hämocyanin (KLH) aus Napfschnecken (*Megathura crenulata*) benutzt. KLH ist ein nicht vollständig charakterisierbares Protein mit einem Molgewicht zwischen 450000 und 1300000 Dalton (Da).

3.3.2.1 Methode A

Im ersten Schritt wurde ein Spacer nach der von Bonwick et al. (1994) beschriebenen Carbodiimid-Methode an das Protein gebunden. Dazu wurden 10,2 mg KLH in 3 mL Bidest. und 1 mL DMF gelöst. Unter Rühren wurden nacheinander 21 µl (0,2 µmol) einer 4-Aminobutansäure-Lösung (1 g/L in Bidest.) und 40 µl (0,21 µmol) EDC (1 g/L in Bidest.) zugegeben und 18 Stunden bei Raumtemperatur (RT) gerührt. Die Reinigung des Reaktionsproduktes erfolgte durch Dialyse gegen PBS-Puffer (1:10) und gegen Bidest. Das Volumen des Dialysats betrug 5 mL. Es wurde 1 mL DMF zugesetzt und die Lösung zur weiteren Verarbeitung bereitgehalten.

Im zweiten Schritt wurde das Hapten nach der Methode der aktivierten Ester an das derivatisierte Protein gebunden. Zunächst wurden 209 µl Permethrinsäure (1 g/L in DMF) zusammen mit 206 µl DCC (1 g/L in DMF) und 115 µl NHS (1 g/L in DMF) in 950 µl DMF gelöst und 18 Stunden bei RT gerührt. Der bei der Reaktion entstehende Dicyclohexylharnstoff wurde durch Zentrifugation (4000 U/min, 10 min) abgetrennt. Der NHS-Ester wurde nicht isoliert, sondern sofort weiter umgesetzt. Die Lösung wurde anschließend langsam zur Lösung des Protein-Spacer-Konjugats getropft und für 18 Stunden bei RT gerührt. Die Reinigung des Reaktionsproduktes erfolgte durch Dialyse gegen PBS-Puffer (1:10) und gegen Bidest.

Nach dieser Methode wurde ein Konjugat mit 4-Aminobutansäure als 4-Carbon-Spacer und eines mit 6-Aminohexansäure als 6-Carbon-Spacer hergestellt. Eine schematische Darstellung der Kopplungsreaktion findet sich in Abbildung 10 (Seite 29).

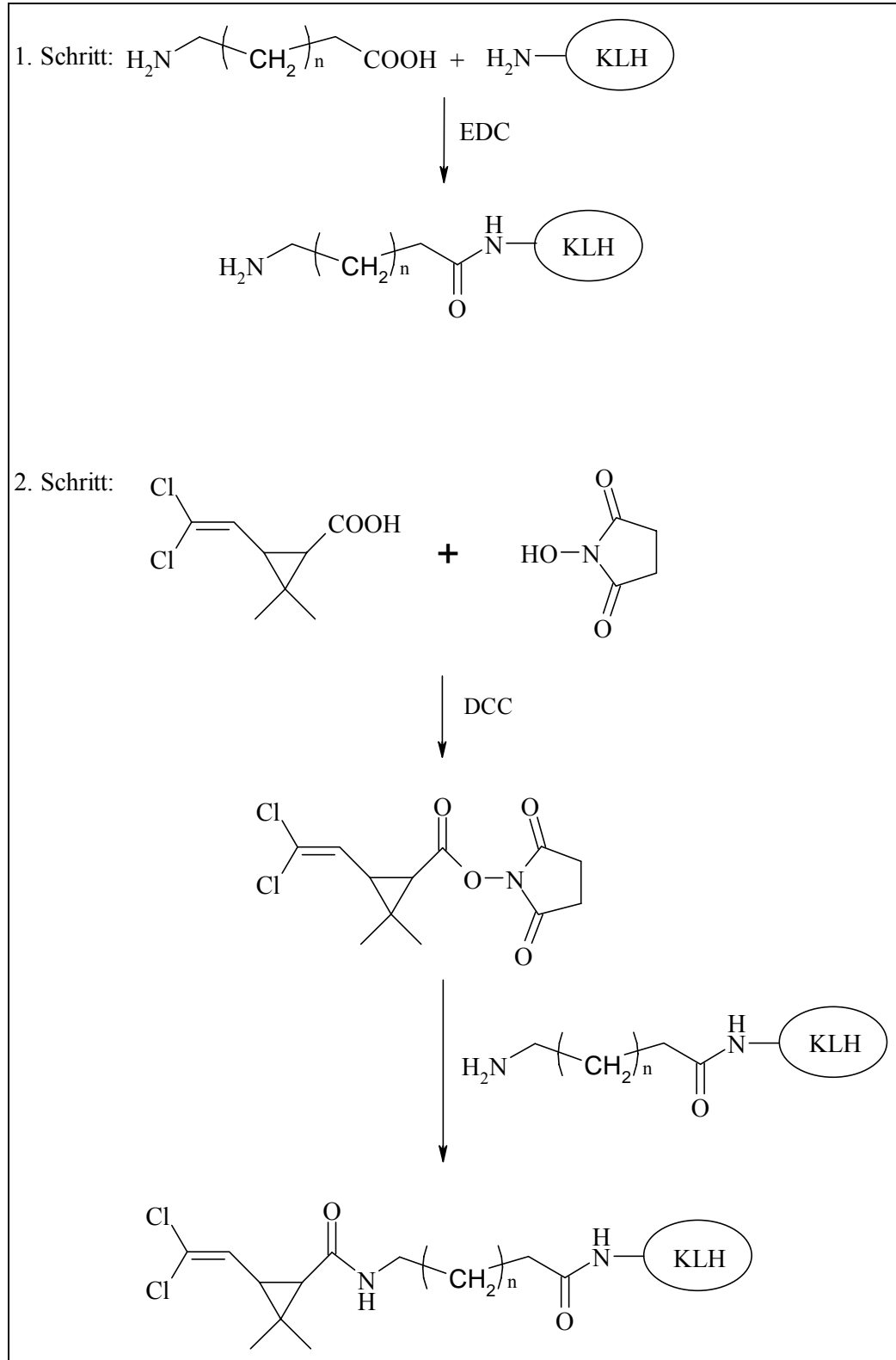


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Kopplungsreaktion nach der Methode der aktivierten Ester (AE)

3.3.2.2 Methode B

Drei Konjugate für die Immunisierung, die sich nur durch die Art des benutzten Haptens unterschieden, wurden nach der Methode der gemischten Anhydride synthetisiert. Als Haptene wurden PMS, PMS-ABA und PMS-AHA eingesetzt.

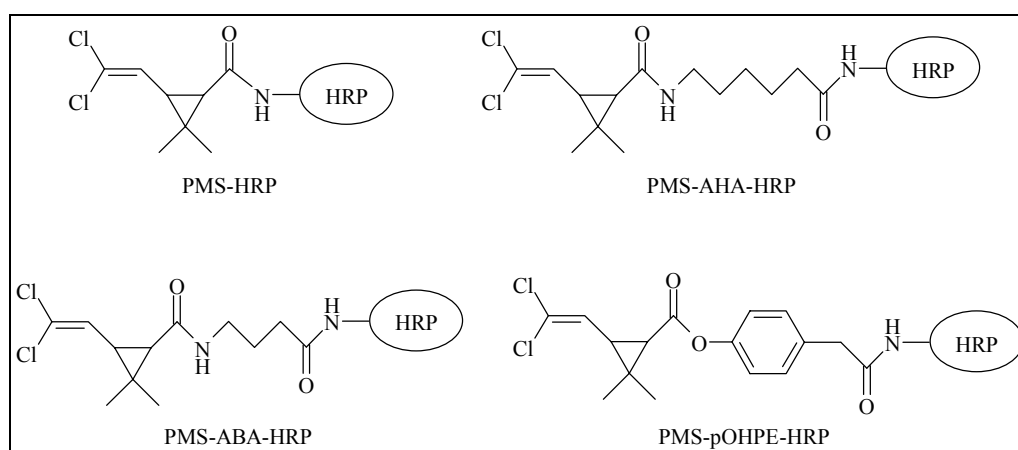
In einem Kolben wurden 25 μmol Hapten (PMS: 5,2 mg; PMS-ABA: 7,7 mg; PMS-AHA: 8,4 mg) zusammen mit 28 μmol Tributylamin (5,5 μl) und 28 μmol Chlorameisensäure-*iso*-butylester (4 μl) in 2 mL trockenem Dioxan gelöst. Nach drei Stunden bei 8°C im Kühlraum wurde die Lösung tropfenweise zur Proteinlösung (53,5 mg KLH in einer Mischung aus 5 mL Bidest., 1 mL Dioxan und 5 Tropfen Ethanol) gegeben. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 0,1 N NaOH auf einen Wert von acht eingestellt und ebenso wie die Temperatur der Lösung, die auf 10°C eingestellt wurde, ständig überwacht. Nach zwei Stunden trat keine wesentliche Änderung des pH-Wertes mehr auf. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 9°C im Kühlraum inkubiert. Zur Reinigung der Konjugate wurden diese unter Rühren und Eiskühlung mit 2 mL 30 %iger Trichloressigsäure ausgefällt. Der Niederschlag wurde anschließend je zweimal mit 3 mL Aceton und 3 mL H₂O gewaschen, lyophilisiert und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Abbildung 11 (Seite 31) zeigt beispielhaft die Kopplung von PMS-AHA an KLH:

Tabelle 4: Übersicht über die synthetisierten und verwendeten Coatingantigene

Protein	Hapten	Synthesemethode
BSA	PMS	akt. Ester (AE)
BSA	PMS-ABA	akt. Ester
BSA	PMS-AHA	akt. Ester
BSA	PMS	akt. Ester
BSA	PMS-ABA	akt. Ester
BSA	PMS-AHA	akt. Ester
BSA	PMS-pOHPE	akt. Ester
OVA	PMS	akt. Ester
OVA	PMS-ABA	akt. Ester
OVA	PMS-AHA	akt. Ester
BSA	PMS	gem. Anhydrid (GA)

Die Reinigung der Kopplungsprodukte erfolgte durch Ultrafiltration über eine YM 10 Membran mit einer Ausschlußgröße von 10 kDa. Der Rückstand wurde dreimal in 20 mL Wasser aufgenommen und zum Schluß auf ein Volumen von 2 mL eingengt. Anschließend wurden die Konjugate lyophilisiert und bei 4°C gelagert.

3.3.4 Synthese der Tracer

**Abbildung 12:** Übersicht über die verwendeten Tracer

Die Synthese der Tracer erfolgte nach der oben beschriebenen Methode der aktivierten Ester. Für den jeweiligen Ansatz wurden 16,7 mg (80 µmol) Permethrinsäure, 23,5 mg (80 µmol) PMS-ABA, 25,8 mg (80 µmol) PMS-AHA oder 27,5 mg (80 µmol) PMS-pOHPE mit 10,1 mg (88 µmol) NHS und 17,9 mg

(80 μmol) PMS-pOHPE mit 10,1 mg (88 μmol) NHS und 17,9 mg (70 μmol) DSC in 1 mL DMSO gelöst und 2 Stunden bei RT gerührt. Nach der Zugabe von 33,4 mg (160 μmol) DCC wurde weitere 18 Stunden bei RT gerührt und anschließend der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abzentrifugiert (4000 U/min, 10 min). Von der aktivierten-Ester-Lösung wurden 50 μl tropfenweise zu einer Lösung von 2 mg (0,045 μmol) Meerrettich-Peroxidase in 450 μl 0,1 M NaHCO_3 gegeben und 3 Stunden bei RT unter Lichtausschluß gerührt. Die Reinigung der rotbraun gefärbten Reaktionsprodukte erfolgte gelchromatographisch über Sephadex™ G-25 M (PD-10-Säulen). Die synthetisierten Tracer wurden anschließend portioniert und bei $-21\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

3.3.5 Synthese von Permethrinsäureglucuronid

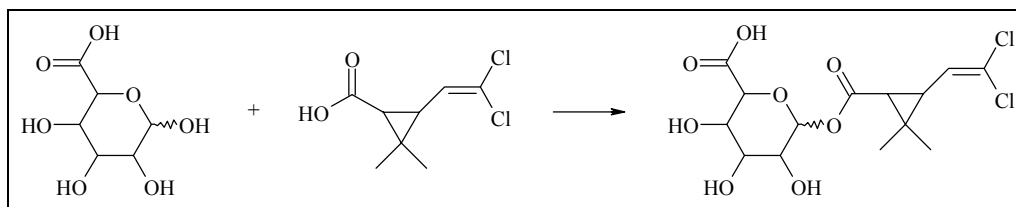


Abbildung 13: Synthese von Permethrinsäureglucuronid

1 g (5,1 mmol) D-Glucuronsäure wurde in 15 mL Pyridin gelöst. Anschließend wurden 0,52 g (2,5 mmol) Permethrinsäure zugegeben und 24 Stunden bei 9°C gerührt. Durch Zugabe von Toluol als „Schlepper“ und Einengen am Rotationsverdampfer wurde das Pyridin entfernt. Letzte Spuren des Pyridins wurden durch Anlegen von Hochvakuum über Nacht entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde zur Trockene einrotiert und in wenig MTBE wiederaufgenommen. Zur Umkristallisation wurde die Lösung auf dem Wasserbad erhitzt und solange tropfenweise mit Hexan versetzt, bis eine dauerhafte Trübung erkennbar war. Die Lösung wurde zur Kristallisation in den Kühlschrank gestellt. Nach 3 Tagen hatte sich ein Niederschlag gebildet, der abzentrifugiert und portionsweise mit Hexan gewaschen wurde. Eine Kontrolle mit Hilfe der Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS) zeigte, daß es sich bei dem Rückstand um ein Produktgemisch aus dem gewünschten Produkt und wenig disubstituierter und trisubstituierter Glucuronsäure handelte. Die Abtrennung dieser Nebenprodukte gelang mit Hilfe der präparativen HPLC.

Das Produktgemisch konnte auf einer RP18-Säule mit MeOH/H₂O 60/40 (v/v) als Eluenten bei einem Flow von 4 mL getrennt werden. Die Ausbeute betrug 21 mg (0,02 %). Die Charakterisierung erfolgte durch ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie und ESI-MS und ist dem Anhang zu entnehmen (Seite 109).

3.4 Hydrolyse der Hapten-Protein-Konjugate

Es wurde 1 mg Hapten-Protein-Konjugat mit 1 mL Wasser, 1 mL konz. HCl sowie 60 µl internem Standard (2-Phenoxybenzoesäure, 1 g/L) versetzt und 4 Stunden bei 90 °C im Trockenschrank hydrolysiert. Nach Abkühlung wurde nacheinander mit 3 mL MTBE und 3 mL Hexan extrahiert. 25 µl der vereinigten organischen Phase wurden mit 200 µl Diazomethan und 275 µl Hexan versetzt und nach einer Inkubationszeit von mindestens vier Stunden mit Hilfe der GC/MS gemessen.

3.5 Immunisierung

Es wurden insgesamt 8 Kaninchen (New Zealand White Rabbits) immunisiert, zwei davon bei der Firma EUROGENTEC in Belgien. Vor der ersten Immunisierung wurde das Präimmenserum aus der Ohrvene entnommen, um im Vergleich mit den Antiseren nach der Immunisierung eine gezielte Antikörperproduktion nachweisen zu können. Für die erste Immunisierung wurde 2 mg Hapten-Protein-Konjugat in 1 mL steriler physiologischer Kochsalzlösung mittels Ultraschallstab fein verteilt und mit 1 mL komplettem FREUNDSchen Adjuvans gemischt. Durch wiederholtes Aufziehen und Ausdrücken einer 1 mL-Eppendorfpipette wurde eine homogene, weiße Emulsion hergestellt. Jedem Kaninchen wurde 1 mL der jeweiligen Emulsion subkutan an mehreren Stellen in den Rücken injiziert. Die erste Boosterinjektion erfolgte nach 2 Wochen analog der Grundimmunisierung, allerdings mit inkomplettem Adjuvans. Weitere Boosterungen erfolgten nach 4 und nach 8 Wochen, ebenfalls mit inkomplettem Adjuvans. Jeweils 2 Wochen nach der zweiten und dritten Boosterung wurde den Kaninchen zur Titerkontrolle Blut aus der Ohrvene entnommen. Nach 12 Wochen wurde die Immunisierung beendet und die Kaninchen durch einen Schnitt in die Halsarterie vollständig entblutet.

Das Blut wurde zur Absetzung des Blutkuchens mehrere Stunden bei RT stehen gelassen und anschließend zur Gewinnung des Rohserums 15 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Danach wurde es portionsweise eingefroren und bei -21°C gelagert.

3.6 Isolierung der Antikörper aus dem polyklonalen Rohserum

3.6.1 Ammoniumsulfatfällung

Zu 1 mL Rohserum wurden langsam unter Rühren 1 mL einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung getropft und 30 min bei RT gerührt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (12000 U/min, 15 min) und mit 1 mL physiologischer Kochsalzlösung wieder gelöst. Eine zweite Fällung wurde durchgeführt und der Rückstand diesmal in 1 mL PBS-Puffer aufgenommen. Anschließend wurde gegen PBS dialysiert. Das Dialysat wurde portioniert und bei -21°C gelagert.

3.6.2 Affinitätschromatographische Reinigung

Zur affinitätschromatographischen Aufreinigung der Seren wurde das Gel EAH Sepharose™ 4B von PHARMACIA eingesetzt. Dieses Gel besitzt primäre Aminogruppen, die sich am Ende von 10-Atom-Spacerarmen befinden und ist dadurch in der Lage, Liganden mit Carboxylgruppen kovalent zu binden.



Abbildung 14: Partielle Struktur von EAH Sepharose™ 4B

Für die Kopplung wurde das Carbodiimid-Verfahren verwendet (siehe oben). Als Ligand wurde Permethrinsäure benutzt.

Bevor mit der Kopplung begonnen werden konnte, mußte das Gel von antibakteriellen Zusätzen befreit werden. Zu diesem Zweck wurde es mit 1 L 0,5 M NaCl gewaschen. Anschließend wurden 25 mL des Gels in eine Kristallisierschale gegeben und mit 1 M HCl auf pH 4,5 eingestellt. Nach Zugabe von 250 mg EDC (gelöst in 5 mL Bidest.) wurde 26,2 mg Permethrinsäure (150 μmol) in 10 mL Bidest./DMSO 50/50 (v/v) zugegeben und bei RT langsam gerührt, wobei der pH-Wert durch Zugabe von 0,1 M NaOH zwischen 4,5 und 6 gehalten wurde.

Nach 18 Stunden wurden 300 μ l 1 M Essigsäure zugegeben, um nicht reagierte Aminogruppen des Gels zu blocken. Das Gel wurde in eine Glassäule (200 x 20 mm ID) gefüllt und zur Entfernung der Kopplungsreagenzien zuerst portionsweise mit Aceton und anschließend mit Wasser gewaschen.

Die Reinigung der IgG-Fraktionen erfolgte nach folgendem Schema:

- Spülen mit 100 mL 10 mM TRIS-Puffer, pH 7,5
- Auftragen der Probe (2 mL Rohserum, mit 8 mL 10 mM TRIS, pH 7,5 verdünnt)
- Elution mit 200 mL 10 mM TRIS NaCl, pH 7,5
- Elution mit 200 mL 100 mM Glycinpuffer, pH 2,5
- Elution mit 200 mL 10 mM TRIS-Puffer, pH 8,8
- Elution mit 200 mL 100 mM Triethylamin-Lsg., pH 11,5
- Elution mit 100 mL 3,5 M $MgCl_2$ -Lsg.
- Spülen mit 100 mL 20 %igem EtOH

Die Glycin- und Triethylaminfraktionen wurden in einer Vorlage von 20 mL 1 M TRIS, pH 8 aufgefangen. Zur Entfernung der Puffer und zum Aufkonzentrieren der Antikörper wurden alle Fraktionen über eine Membran mit einer Ausschlußgröße von 10 kDa ultrafiltriert. Anschließend wurden alle Fraktionen auf ihre Wirksamkeit im ELISA getestet.

3.7 Standard-Testvorschriften

3.7.1 Durchführung des indirekten ELISAs

Falls im Text nicht anders erwähnt, wurden alle Immunoassays auf Mikrotiterplatten aus Polystyrol mit 96 Kavitäten (8 x 12) nach dem folgenden Schema durchgeführt:

Coaten	In jede Kavität der Mikrotiterplatte 100 µl Coatingantigen in Coatingpuffer pipettieren und ca. 16 h bei 4°C inkubieren. Die Platte wird dabei mit einer Klebefolie verschlossen.
Waschschritt	Dreimaliges Waschen der Mikrotiterplatte mit Waschpuffer.
Blocken	Mit 150 µl einer 3 %igen Magermilchpulver-Lösung in PBS. Inkubation für ca. 16 h bei 4 °C oder 4 h bei RT unter Lichtausschluß.
Waschschritt	Dreimaliges Waschen der Mikrotiterplatte mit Waschpuffer.
Zugabe von Antikörper und Probe bzw. Standard	Je Kavität 50 µl der in PBS verdünnten Antikörperlösung und 50 µl Probe oder Standard (in 1 % ethanolischer PBS). Inkubation für 1 h bei RT unter Lichtausschluß.
Waschschritt	Dreimaliges Waschen der Mikrotiterplatte mit Waschpuffer.
Zweitantikörper	Pro Kavität 100 µl eines mit Peroxidase markierten Ziegenanti-Kaninchen-Antikörpers (in 1 %iger Magermilchpulver-Lösung in PBS) pipettieren und 1 h bei RT unter Lichtausschluß inkubieren.
Waschschritt	Dreimaliges Waschen der Mikrotiterplatte mit Waschpuffer.
Enzymreaktion	In jede Kavität 100 µl Substratlösung pipettieren und je nach Farbentwicklung 5 bis 30 min unter Lichtausschluß inkubieren.

Abstoppen	In jede Kavität 50 µl einer 1 M Schwefelsäure pipettieren.
Messen	Messung der Absorption jeder Lösung auf der Mikrotiterplatte bei einer Wellenlänge von 450 nm im ELISA-Plattenphotometer.

3.7.2 Durchführung des direkten ELISAs

Coaten	In jede Kavität der Mikrotiterplatte 100 µl einer Antikörperverdünnung in PBS pipettieren und ca. 16 h bei 4°C inkubieren. Die Platte wird dabei mit einer Klebefolie verschlossen.
Waschschritt	Dreimaliges Waschen der Mikrotiterplatte mit Waschpuffer.
Zugabe von Probe bzw. Standard	Pro Kavität werden 50 µl Probe bzw. Standard in 1 %iger ethanolischer PBS pipettiert und 15 min vorinkubiert.
Tracerzugabe	In jede Kavität werden 50 µl Tracerverdünnung in PBS pipettiert und für weitere 45 min bei RT unter Lichtausschluß inkubiert.
Waschschritt	Dreimaliges Waschen der Mikrotiterplatte mit Waschpuffer.

Enzymreaktion, Abstoppen und Absorptionsmessung erfolgten wie im oben beschriebenen indirekten kompetitiven ELISA. In einigen Fällen wurde ein Vorbeschichten mit Protein A oder einem Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper durchgeführt.

3.8 Direkte Kopplung von PMS-pOHPE an die Mikrotiterplatte

Neben der Möglichkeit, Haptene adsorptiv über Trägerproteine auf einer Mikrotiterplatte zu immobilisieren, gibt es auch die Möglichkeit, Haptene direkt auf der Oberfläche zu fixieren. Zu diesem Zweck werden Mikrotiterplatten angeboten, die auf der Oberfläche frei zugängliche funktionelle Gruppen besitzen, an die Hapte-

ne kovalent gebunden werden können. Da es sich bei den hier beschriebenen Haptenen um Carbonsäuren handelte, wurde eine Platte mit primären Aminogruppen ausgewählt. Die Kopplungsreaktion wurde nach der oben beschriebenen Methode der aktivierten Ester durchgeführt.

Dazu wurde in jede Kavität der ersten Spalte der Mikrotiterplatte 200 μl einer 25 mg/L (73 $\mu\text{mol/L}$) PMS-pOHPE Lösung in DMSO/Wasser 50/50 (v/v) und bis Spalte 11 spaltenweise 1:1 mit Wasser verdünnt. In Spalte 12 wurde 100 μl Wasser/Kavität pipettiert. Anschließend wurde in jede Kavität der Mikrotiterplatte 50 μl einer EDC-Lösung (3 g/L in Wasser) und 50 μl einer sulfo-NHS-Lösung (3,5 g/L in Wasser) pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Klebefolie verschlossen und über Nacht auf dem Rüttler inkubiert. Nachdem überschüssige Kopplungsreagenzien durch Waschen mit Wasser entfernt worden waren, konnte die Platte für den Gebrauch im ELISA eingesetzt werden.

3.9 Schachbrett-Titration

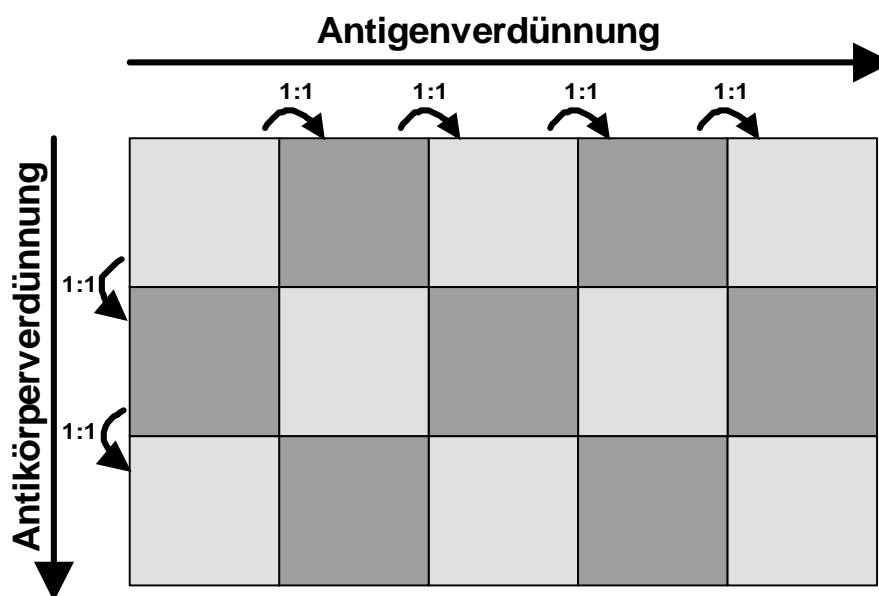


Abbildung 15: Schematische Darstellung einer Schachbrett-Titration

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikrotiterplatten besitzen 8 x 12 Kavitäten (Vertiefungen). In jede dieser 96 Vertiefungen kann eine Probelösung gefüllt werden. Bei einer Schachbrett-Titration, wie sie im weiteren Verlauf der Arbeit beschrieben wird, wurde z.B. die Lösung des Beschichtungskonjugats in die erste Spalte der Mikrotiterplatte pipettiert. Diese Lösung wurde anschließend spalten-

weise 1:1 verdünnt. Nach einem Inkubationsschritt wurde die Platte gewaschen und in die erste Zeile der Mikrotiterplatte die Antikörperlösung pipettiert. Diese wurde wiederum zeilenweise 1:1 verdünnt. Bei vollständiger Ausnutzung aller Kavitäten ergaben sich auf diese Weise 96 verschiedene Kombinationen von Antigen- und Antikörperverdünnung und man fand relativ schnell eine geeignete Kombination beider Parameter. Absorptionen zwischen 0,8 und 1 waren für eine sinnvolle Auswertung der Mikrotiterplatte ausreichend. Es wurde daher nach Kombinationen aus Antigen- und Antikörperverdünnung gesucht, die, bei möglichst hoher Verdünnung, eine Absorption im genannten Bereich aufwiesen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Synthese und Charakterisierung der Hapten-Protein-Konjugate

Ein wichtiger Schritt bei der Herstellung von Antikörpern gegen niedermolekulare Substanzen ist die Kopplung dieser Substanzen an hochmolekulare Verbindungen, wie z.B. Proteine, da Substanzen mit einem Molekulargewicht unter 1000 Da keine immunogene Wirkung besitzen. Für die Entwicklung eines Enzymimmunoassays mit immobilisiertem Hapten-Protein-Konjugat (indirekter ELISA) wurden weitere Konjugate für die feste Phase der Mikrotiterplatte benötigt. Aufgrund der nicht vorhersehbaren Reaktion des Immunsystems der Versuchstiere auf die Immunisierung wurden mehrere Kaninchen mit unterschiedlichen Hapten-Protein-Konjugaten immunisiert. Es wurden Konjugate mit und ohne Spacer eingesetzt und verschiedene Kopplungsmethoden angewandt (siehe Kapitel 3.3.2, Seite 27). Eine Übersicht der eingesetzten Konjugate sowie deren Herstellungsverfahren zeigt Tabelle 6 (Seite 44).

Nach der Synthese wurde eine Charakterisierung der jeweiligen Immunisierungskonjugate durchgeführt, um sicherzustellen, daß die Kopplungsreaktion erfolgreich war. Zur Charakterisierung wurden zwei unterschiedliche Methoden eingesetzt:

4.1.1 Nachweis des Kopplungserfolgs durch ELISA

Ein qualitativer Nachweis des Kopplungserfolgs konnte mit Hilfe eines indirekten ELISAs erbracht werden. Voraussetzung dafür war das Vorhandensein spezifischer, gegen Permethrinsäure gerichteter, Antikörper. Diese wurden von Pullen und Hock zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um ein polyklonales Antiserum, das zur Entwicklung eines Permethrin-ELISAs hergestellt worden war.

Die Konjugate wurden in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Mikrotiterplatte beschichtet. Der Antikörper zeigte eine konzentrationsabhängige Reaktion mit den immobilisierten Hapten-Protein-Konjugaten. Es konnte daher auf eine erfolgreiche Kopplung geschlossen werden. Daneben zeigten die Konjugate bei gleicher Beschichtungskonzentration Absorptionsunterschiede. Dies war darauf zurückzuführen, daß verschiedene Haptendichten in Abhängigkeit von der einge-

setzten Haptenmenge vorlagen. Besonders deutlich traten diese Unterschiede beim Vergleich der beiden nach der Methode der aktivierten Ester hergestellten mit den übrigen Konjugaten hervor. Offensichtlich konnte durch die Methode der gemischten Anhydride eine höhere Haptendichte erzielt werden. Der waagerechte Kurvenverlauf bei höheren Konzentrationen spricht für eine Sättigungskonzentration, über die hinaus kein weiteres Konjugat an die Platte gebunden werden kann (siehe Abbildung 16).

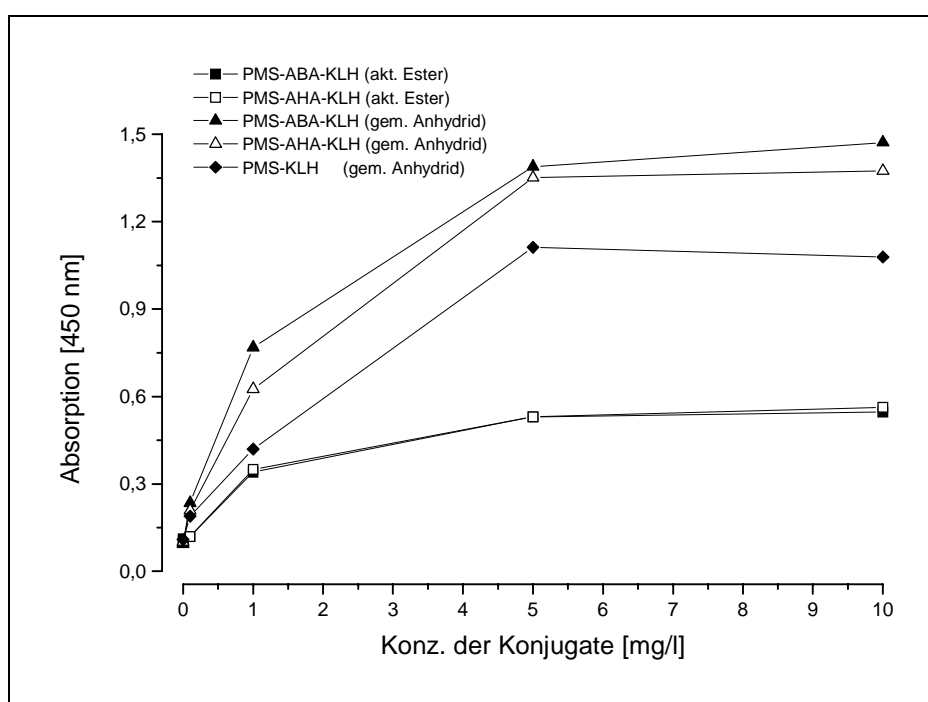


Abbildung 16: Nachweis des Kopplungserfolgs durch ELISA

4.1.2 Nachweis des Kopplungserfolgs durch Hydrolyse

Ein weiterer Nachweis des Kopplungserfolgs erfolgte durch Hydrolyse der Hapten-Protein-Bindung mit anschließender Quantifizierung des Haptens durch Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Eine genaue Bestimmung der Haptendichte war aus mehreren Gründen nicht möglich. Zum einen handelte es sich bei dem verwendeten Trägerprotein KLH um ein nicht vollständig charakterisierbares Protein mit einer Molmasse zwischen 450 und 13000 kDa (Pierce, 1998). Andererseits war es nicht möglich, die Hapten-Protein-Bindung quantitativ und reproduzierbar zu hydrolysieren, wie durch Hydrolyseexperimente mit PMS-ABA (ein Molekül mit gleicher Bindungscharakteristik wie die Hapten-Protein-Konjugate) gezeigt werden konnte. Um dennoch eine Aussage über die Haptendichte

machen zu können, wurde angenommen, daß Hydrolyse- und Wiederfindungsrate 100 % betragen. Die Molekülmasse von KLH wurde bei den Berechnungen mit 450 kDa angenommen. Sie lag damit am unteren Ende der möglichen Molekülmasse, so daß die berechneten Haptendichten gewissermaßen „Mindest-Haptendichten“ entsprachen.

Für jedes Hapten wurden Blindproben angesetzt. Diese enthielten jeweils 1 mg KLH und eine bestimmte Menge des Haptens. Die Menge des Haptens wurde jeweils so berechnet, daß sie unter den oben gemachten Annahmen einer Haptendichte von 50, 100 und 200 Molekülen Hapten pro Molekül KLH entsprach.

Auf diese Weise wurden folgende Haptendichten ermittelt:

Tabelle 5: Übersicht über die Haptendichten der einzelnen Hapten-Protein-Konjugate

Hapten-Protein-Konjugat	Kopplungsmethode	Haptendichte
PMS-ABA-KLH	akt. Ester	< 50
PMS-AHA-KLH	akt. Ester	< 50
PMS-ABA-KLH	gem. Anhydrid	> 200
PMS-AHA-KLH	gem. Anhydrid	> 200
PMS-KLH	gem. Anhydrid	> 200

Die Ergebnisse bestätigten die schon beim ELISA gemachten Beobachtungen, daß die nach der Methode der gemischten Anhydride hergestellten Konjugate eine deutlich höhere Haptendichte aufwiesen, als die beiden anderen Konjugate.

4.2 Immunisierung

Wie bereits erwähnt, wurde die Immunisierung von 2 der insgesamt 8 Kaninchen bei der Firma EUROGENTEC in Belgien durchgeführt. Diese führt seit Jahren erfolgreich Auftragsimmunisierungen durch und verfügt über große Erfahrung. Die Immunisierung der anderen 6 Kaninchen erfolgte daher in Anlehnung an das Immunisierungsschema von EUROGENTEC. Jeweils 2 der Kaninchen wurden mit demselben Hapten-Protein-Konjugat immunisiert. Die Immunisierung gliederte sich in eine Grundimmunisierung und 3 Boosterungen und dauerte insgesamt 12 Wochen. Neben dem Präimmunserum wurden nach 6 und nach 10 Wochen Blutentnahmen (ca. 1 mL aus der Ohrvene) durchgeführt, so daß neben dem Serum nach Abschluß der Immunisierung 3 weitere Seren zur Verfügung standen. Die Bezeichnung der einzelnen Antiseren erfolgte folgendermaßen:

Jedem Kaninchen wurde ein Buchstabe zugeordnet, bei 8 Kaninchen ergab dies die Buchstaben A – H. Jeder Blutentnahme wurde eine Ziffer zugeordnet, das Präimmuns Serum erhielt die Ziffer 0, die erste Blutung die Ziffer 1, die zweite Blutung die Ziffer 2 und die Endblutung die Ziffer 3. Die Bezeichnung Antiserum C2 bedeutet also beispielsweise, daß es sich um das Antiserum von Kaninchen C nach der zweiten Blutentnahme handelt. Eine Übersicht über die einzelnen Antiseren zeigt Tabelle 6:

Tabelle 6: Übersicht über die Bezeichnung der verschiedenen Antiseren, sowie die zu deren Herstellung verwendeten Hapten-Protein-Konjugate

Kaninchen	Hapten	Protein	Kopplungsmethode	Antiseren
A	PMS-ABA	KLH	akt. Ester	A0, A1, A2, A3
B	PMS-AHA	KLH	akt. Ester	B0, B1, B2, B3
C	PMS-ABA	KLH	Gem. Anhydride	C0, C1, C2, C3
D	Wie Kaninchen C			D0, D1, D2, D3
E	PMS-AHA	KLH	Gem. Anhydride	E0, E1, E2, E3
F	Wie Kaninchen E			F0, F1, F2, F3
G	PMS	KLH	Gem. Anhydride	G0, G1, G2, G3
H	Wie Kaninchen G			H0, H1, H2, H3

4.3 Vergleich der Antiseren

Die erhaltenen Seren wurden auf eine Mikrotiterplatte beschichtet und mit peroxidasemarkierter Permethrinsäure auf selektive Antikörperpopulationen untersucht. In Abbildung 17 sind die Signale der verschiedenen Blutungen zu sehen:

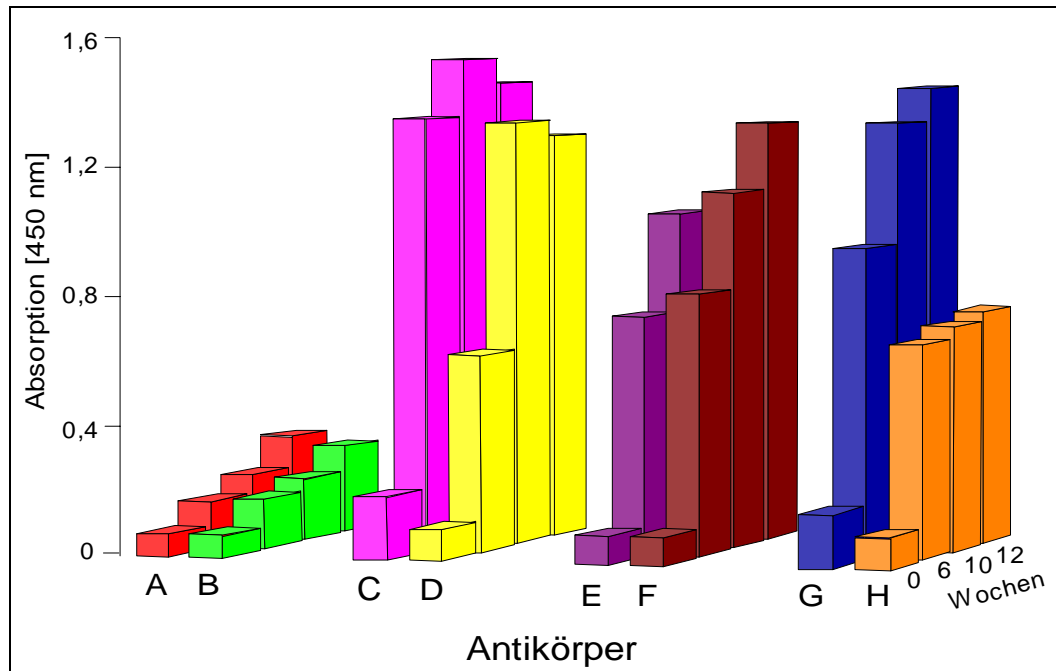


Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der Immunantwort bei den immunisierten Kaninchen

Bedingungen: Seren 1:5000, 100 μ l, 16 h, 4 $^{\circ}$ C; Tracer 1:5000, 100 μ l, 1 h, RT, Entwicklung 30 min

Man erkennt, daß in allen Fällen selektive Antikörper gebildet worden sind. Das Ausmaß der Antikörperbildung war aber sehr unterschiedlich. Am auffälligsten waren die Antiseren A und B (EUROGENTEC), die einen deutlich geringeren Titer (Gehalt an selektiven Antikörpern) aufwiesen als die übrigen Seren. Der Titer stieg im Verlauf der Immunisierung kontinuierlich an. Im Gegensatz dazu wies das Serum C schon nach der ersten Blutentnahme einen sehr hohen Titer auf, der aber im weiteren Verlauf nicht mehr wesentlich zunahm. Der Vergleich der Seren G und H machte die unterschiedliche Immunantwort zweier Organismen auf dasselbe Immunogen deutlich. Während der Titer bei Serum H im Verlauf der Immunisierung ungefähr konstant war, stieg er bei Serum G kontinuierlich an und war am Ende der Immunisierung doppelt so hoch wie bei Serum H. Alle weiteren Untersuchungen der Antiseren erfolgten nur noch mit den Antiseren, die nach der Entblutung der Kaninchen erhalten worden waren (A3, B3, usw.).

4.4 Entwicklung eines indirekten ELISAs

4.4.1 Auswahl des Hapten-Protein-Konjugats

Zur Entwicklung eines indirekten kompetitiven ELISAs mußte ein geeignetes Hapten-Protein-Konjugat auf der Mikrotiterplatte immobilisiert werden. Es wurde ein Konjugat hergestellt, bei dem Permethrinsäure nach der Methode der gemischten Anhydride an Rinderserumalbumin (BSA) gebunden wurde. Um sicherzustellen, daß die Antikörper lediglich das Hapten erkannten und nicht auf Strukturmerkmale reagierten, die durch die Kopplungsreaktion bedingt waren (Gendloff et al., 1986), wurde zusätzlich ein Kontrollkonjugat ohne Zugabe des Haptens hergestellt. Gleichzeitig wurde geprüft, ob das Protein für sich alleine von den Antikörpern erkannt wurde.

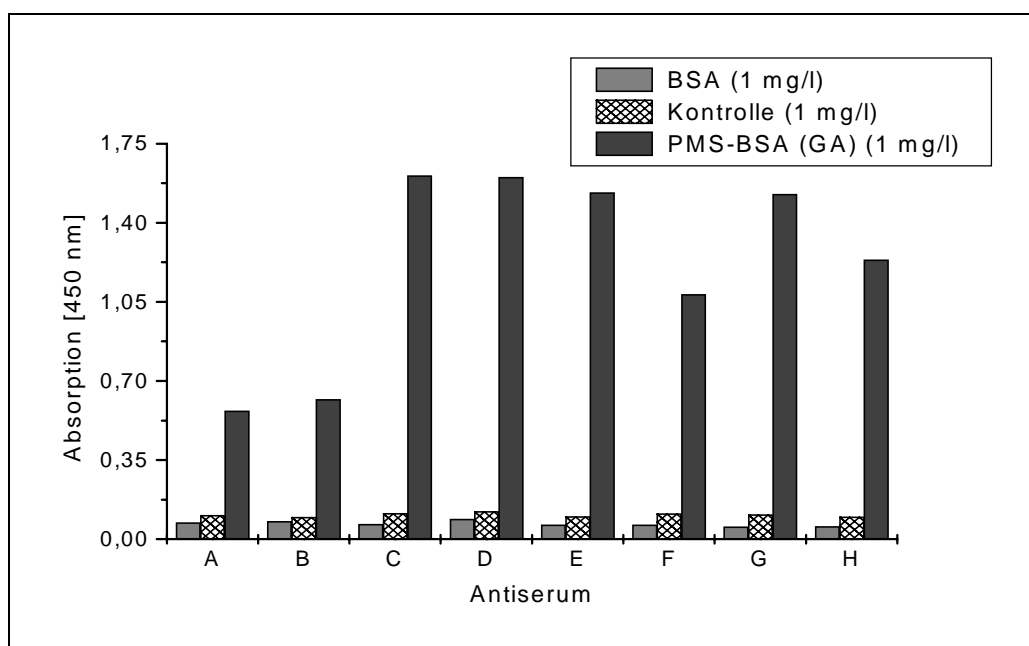


Abbildung 18: Untersuchung des Hapten-Protein-Konjugats, des Kontrollkonjugats und des un-behandelten Proteins auf ihre Reaktion mit den Antikörpern

Bedingungen: Coatingantigene jeweils 1 mg/L in PBS, 100 µl, 16 h bei 4 °C inkub.; Antikörper 1:5000 in PBS, 50 µl, 1 h bei RT inkub.; Tracer: anti-Rabbit IgG, POD markiert, 1: 10000 in PBS + 1% BSA, 1 h bei RT; TMB 30 min.

Alle Antiseren reagierten auf das PMS-BSA-Konjugat. Es waren aber deutliche Unterschiede in den Absorptionswerten zu erkennen, was darauf hindeutete, daß die Menge der spezifischen Antikörper in den einzelnen Seren verschieden war.

Die durchgehend niedrigen Absorptionswerte für das Kontrollkonjugat und das unbehandelte Protein zeigten, daß Kopplungsstrukturen und Epitope des Proteins nicht erkannt wurden. Das PMS-BSA-Konjugat wurde deshalb als Beschichtungskonjugat für den indirekten ELISA ausgewählt.

4.4.2 Schachbrett-Titration

Nach Auswahl des Beschichtungskonjugats wurde für jedes Antiserum die Arbeitskonzentration im ELISA durch eine Schachbrett-Titration ermittelt (siehe Kapitel 3.9, Seite 39). Dabei wurden verschiedene Kombinationen von Antikörperverdünnung und Antigenkonzentration getestet, um eine geeignete Kombination beider Parameter zu finden. Die besten Kombinationen für eine ausreichende Absorption (A) des Nullwerts (A zwischen 0,8 und 1) mit Antiserum C3 waren z.B. eine Konzentration des PMS-BSA-Konjugats von 0,1 – 0,5 mg/L mit einer Serumverdünnung zwischen 1:32000 und 1:64000. Die Schachbrett-Titration ist für Antiserum C3 exemplarisch dargestellt.

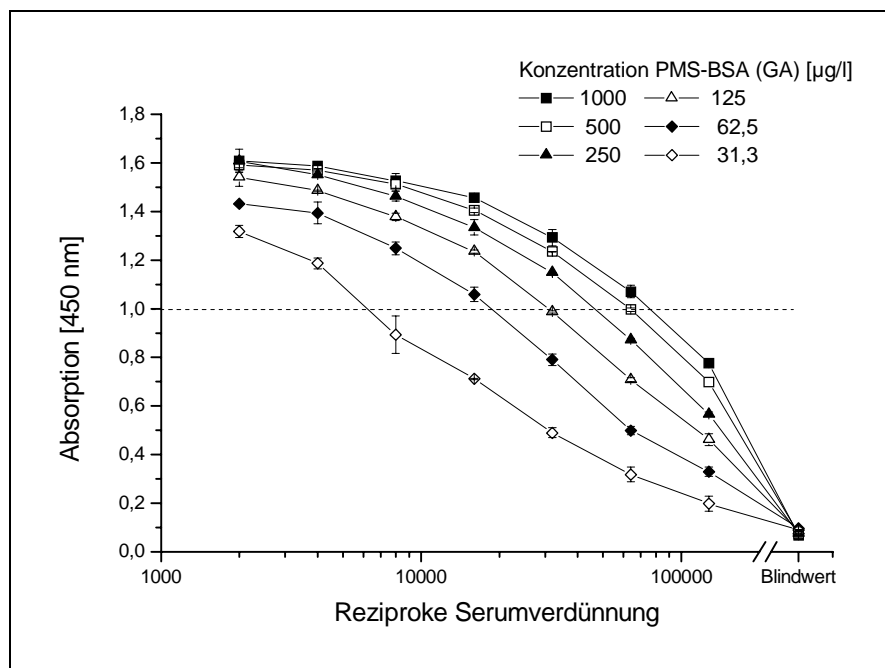


Abbildung 19: Schachbrett-Titration für Antiserum C3

Bedingungen: Coatingantigen PMS-BSA (GA) in verschiedenen Konz., 100 µl, 16 h bei 4 °C inkub.; Antikörper in verschiedenen Verdünnungen, 50 µl, 1 h bei RT inkub.; Tracer: anti-Rabbit IgG, POD markiert, 1: 8000 in PBS + 1% BSA, 1 h bei RT; TMB 30 min.

Mit den so ermittelten Antikörperverdünnungen und Antigenkonzentrationen wurden nun erste Kompetitionsversuche durchgeführt. Als Kompetitor wurde

trans-Permethrinsäure in zwei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt (1 und 10 mg/L).

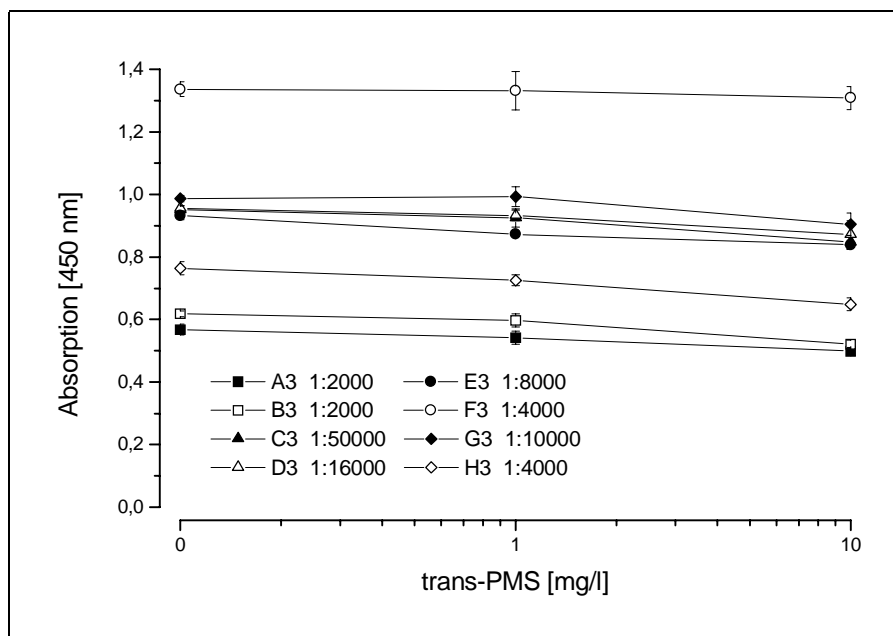


Abbildung 20: Erste Wettbewerbsversuche aller Antiseren mit trans-PMS

Bedingungen: Coatingantigen PMS-BSA (GA), 1 mg/L in PBS, 100 μ l, 16 h bei 4 °C inkub.; Standard: 1 mg/L und 10 mg/L trans-PMS in PBS + 1% EtOH, 50 μ l; Antikörper in entsprechender Verdünnung, 50 μ l, 1 h bei RT inkub.; Tracer: anti-Rabbit IgG, POD markiert, 1: 8000 in PBS + 1% BSA, 1 h bei RT; TMB 30 min.

Bei keinem Antiserum ließ sich eine nennenswerte Verringerung des Signals durch die Zugabe von Permethrinsäure erkennen. Dabei lagen die verwendeten Permethrinsäurekonzentrationen um ein Vielfaches über den in realen Proben zu erwartenden Konzentrationen. In weiteren Versuchen sollte nach Wegen gesucht werden, die die Frage nach der Ursache der mangelnden Konkurrenz der Antiseren klären und diese verbessern sollte.

4.4.3 Einfluß der Temperatur auf die Konkurrenz

Zunächst sollte untersucht werden, ob die mangelnde Konkurrenz durch eine Erhöhung der Reaktionstemperatur verbessert werden konnte. Aus diesem Grund wurde der in Abbildung 20 gezeigte Test unter gleichen Bedingungen wiederholt, mit dem einzigen Unterschied, daß die Inkubation der Antikörper und des Tracers nicht bei Raumtemperatur, sondern bei 37 °C erfolgte.

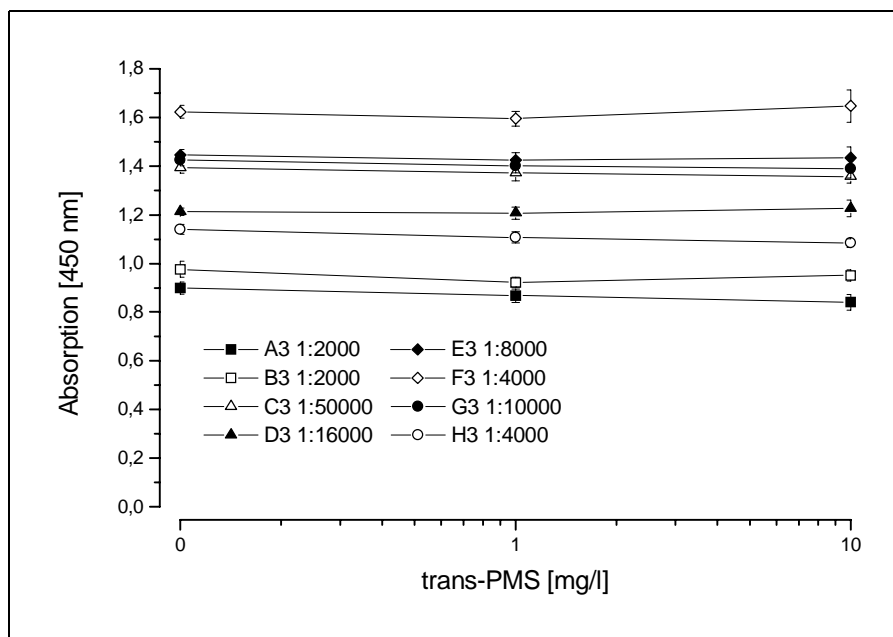


Abbildung 21: Untersuchung des Temperatureinflusses auf die Konkurrenz

Bedingungen: Coatingantigen PMS-BSA (GA), 1 mg/L in PBS, 100 μ l, 16 h bei 4 °C inkub.; Standard: 1 mg/L und 10 mg/L trans-PMS in PBS + 1% EtOH, 50 μ l; Antikörper in entsprechender Verdünnung, 50 μ l, 1 h bei 37 °C inkub.; Tracer: anti-Rabbit IgG, POD markiert, 1: 8000 in PBS + 1% BSA, 1 h bei 37°C; TMB 30 min.

Die Erhöhung der Inkubationstemperatur führte bei keinem Antiserum zu einer Verbesserung der Konkurrenzwirkung der Permethrinsäure auf die Antiseren. Die höhere Temperatur hatte lediglich eine Erhöhung der Absorptionen zur Folge, die um ca. 0,3 zunahm. Daher wurden bei weiteren Optimierungsversuchen die Inkubationen aufgrund des geringeren apparativen Aufwandes bei Raumtemperatur durchgeführt.

4.4.4 Einfluß des pH-Wertes auf die Konkurrenz

Bei Permethrinsäure handelt es sich um eine dissoziierende Verbindung, deren Dissoziationsgrad vom pH-Wert abhängt. Es sollte untersucht werden, inwieweit der pH-Wert Einfluß auf die Antigen-Antikörper-Bindung hat und ob durch niedrigere pH-Werte die Konkurrenz verbessert werden kann. Die Ergebnisse dieser Tests sind in Abbildung 22 dargestellt.

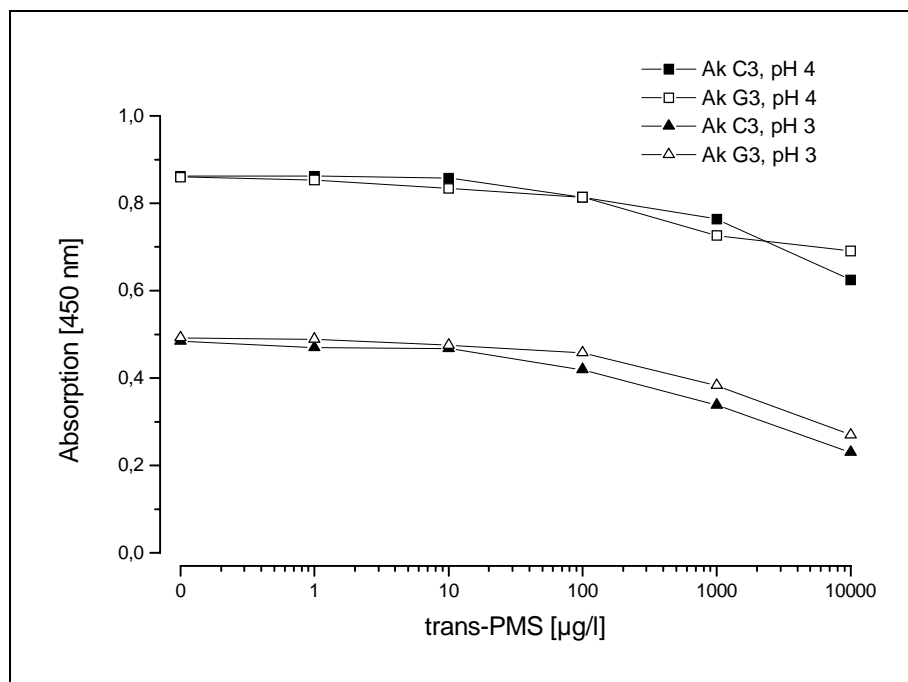


Abbildung 22: Einfluß des pH-Wertes auf die Competition

Bedingungen: Coatingantigen PMS-BSA (GA), 1 mg/L in PBS, 100 µl, 16 h bei 4 °C inkub.; Standards in PBS + 1% EtOH, 50 µl; Antikörper: C3: 1:50000, G3: 1:10000, 50 µl, 1 h bei RT inkub.; Tracer: anti-Rabbit IgG, POD markiert, 1: 20000 in PBS + 1% BSA, 1 h bei RT inkub.; TMB 30 min.

Es wurden alle Antiseren getestet. Die Tests wurden bei pH-Werten von 7.6, 6, 5, 4 und 3 durchgeführt. Lediglich bei den Antiseren C3 und G3 konnte eine Competition festgestellt werden. Diese trat ab einem pH-Wert von 4 zu Tage und war bei beiden Antiseren gleich stark ausgeprägt. Der Rückgang der Absorption setzte bei Konzentrationen größer 10 µg/L ein, war aber insgesamt sehr gering. Eine Absenkung des pH-Wertes auf 3 führte nicht zu einer weiteren Erhöhung der Competition. Allerdings lagen die Absorptionswerte deutlich unter denen, die bei einem pH-Wert von 4 gemessen wurden, was auf eine Beeinträchtigung der Antigen-Antikörper-Bindung bei diesem niedrigen pH-Wert hindeutete.

4.4.5 Test verschiedener Blockingreagenzien

Ein weiterer Schritt zur Verbesserung der Competition sollte durch die Einführung eines Blockingschrittes erreicht werden. In der Literatur (Law, 1996) ist dies eine häufig angewandte Methode zur Verbesserung der Assayperformance. Nach der Immobilisierung des Hapten-Protein-Konjugats wird in einem zweiten Schritt ein Blockprotein aufgetragen. Dieses darf nicht mit dem Antikörper interagieren, sondern dient lediglich dazu, eventuell vorhandene freie Bindungsstellen auf der Mikrotiterplatte abzusättigen. Folgende Proteine wurden in dieser Arbeit auf ihre

Wirksamkeit als Blockprotein getestet: Rinderserumalbumin (BSA), Humanserum, Casein und Magermilchpulver (Skim). Als Antikörper wurde C3 eingesetzt, der Test wurde bei pH 4 durchgeführt, weil sich das wie oben beschrieben als günstig für die Kompetition erwiesen hatte.

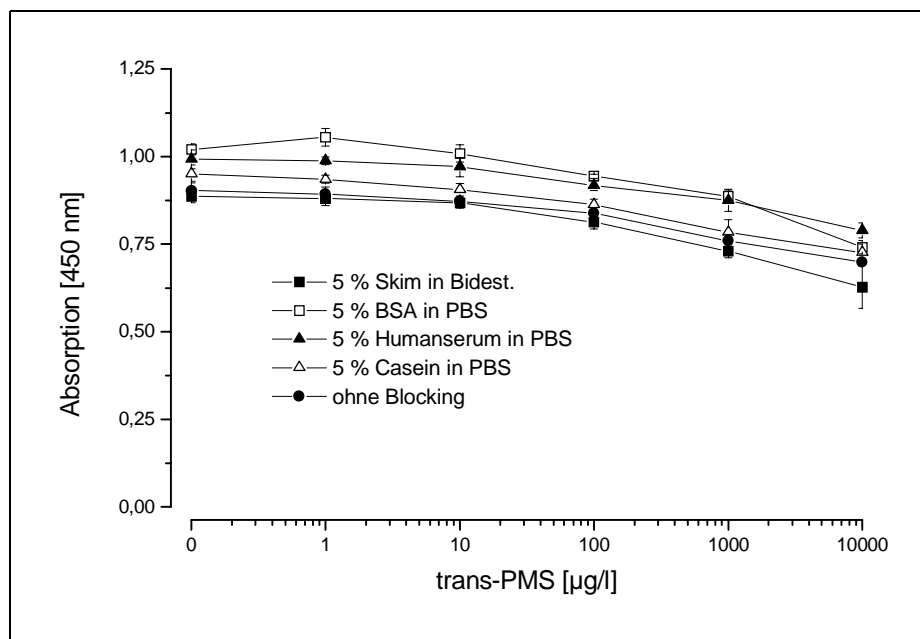


Abbildung 23: Einfluß verschiedener Blockingreagenzien auf die Assayperformance

Bedingungen: Coatingantigen PMS-BSA (GA), 1 mg/L in Carbonatpuffer, 100 µl, 16 h bei 4 °C inkub.; Blockproteine in versch. Konz., 150 µl, 3 h bei RT; Standards sowie Antikörper: C3: 1:50000, 50 µl, 1 h bei RT inkub.; Tracer: anti-Rabbit IgG, POD markiert, 1: 20000 in PBS + 1% BSA, 1 h bei RT inkub.; TMB 30 min.

Anhand der Kurvenverläufe in Abbildung 23 erkennt man, daß keines der verwendeten Blockproteine zu einer Verbesserung der Assayperformance beitragen konnte. Es war nicht gelungen, die Kompetition zu verbessern. Ob dies daran lag, daß es durch das Blocking nicht gelang, unspezifische Adsorptionen der Antikörper an die Mikrotiterplatte zu verhindern und die Kompetition überdeckt wurde, oder ob andere Gründe verantwortlich waren, sollte in weiteren Versuchen geklärt werden.

4.4.6 Synthese neuer Hapten-Protein-Konjugate

Die Hapten-Protein-Konjugate, die für die Immunisierung verwendet wurden, wurden ebenso wie die Konjugate für die Beschichtung der Mikrotiterplatte nach der Methode der gemischten Anhydride hergestellt. Um sicherzugehen, daß keine

durch die Art der Kopplungsreaktion bedingten Antikörper den Test störten, wurden neue Hapten-Protein-Konjugate hergestellt. Die neuen Konjugate wurden nach der Methode der aktivierten Ester hergestellt. Als Haptene wurden PMS, PMS-ABA und PMS-AHA eingesetzt. Diese wurden sowohl mit Rinderserumalbumin, als auch mit Ovalbumin gekoppelt. Es standen also insgesamt sechs neue Konjugate zur Verfügung (siehe Tabelle 4, Seite 32). Wiederum wurden für jedes Konjugat verschiedene Kombinationen von Antikörperverdünnung und Antigenkonzentration getestet, um eine geeignete Kombination beider Parameter zu finden (siehe Kapitel 4.4.2, Seite 47, Ergebnisse nicht dargestellt). Anschließend wurden die Mikrotiterplatten mit den ermittelten Antigenkonzentrationen beschichtet und die Tests mit den Antiseren C3 und G3 durchgeführt.

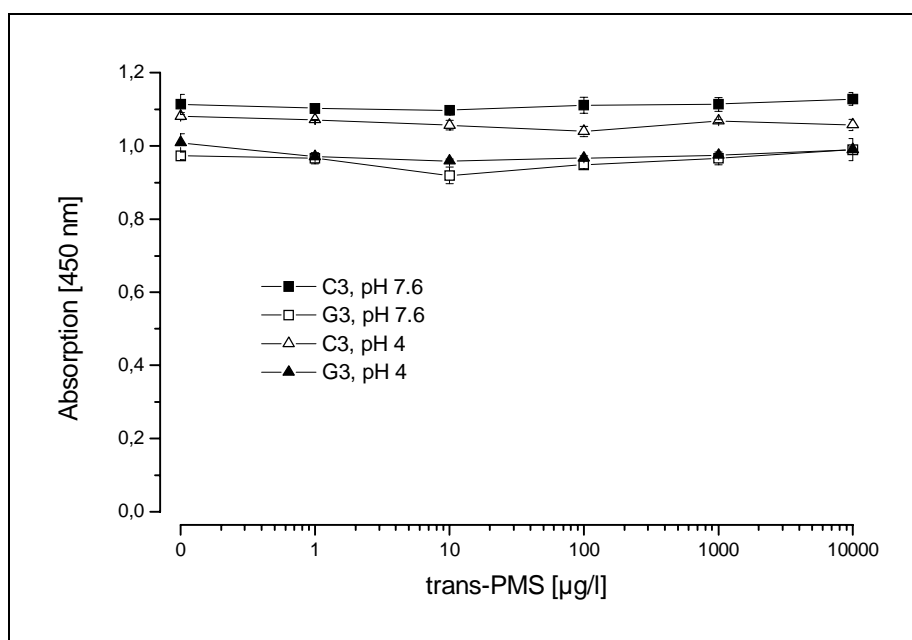


Abbildung 24: Test neuer Hapten-Protein-Konjugate

Bedingungen: Coatingantigen PMS-AHA-BSA (AE), 5 mg/L in Carbonatpuffer, 100 µl, 16 h bei 4 °C inkub.; Standards sowie Antikörper: C3 und G3 1:10000, 50 µl, 1 h bei RT inkub.; Tracer: anti-Rabbit IgG, POD markiert, 1: 10000 in PBS + 1% BSA, 1 h bei RT inkub.; TMB 30 min.

Abbildung 24 zeigt beispielhaft für die neu synthetisierten Konjugate die Reaktion der Antiseren C3 und G3 mit dem Hapten-Protein-Konjugat PMS-AHA-BSA (AE). Als Standard wurde PMS in Konzentrationen von 1 µg/L bis 10 mg/L eingesetzt. Die Tests wurden sowohl bei pH 7.6 als auch bei pH 4 durchgeführt. Weder bei Antiserum C3 noch bei Antiserum G3 ist eine Konkurrenz zu erkennen. Auch eine Verbesserung der Assayperformance durch eine Absenkung des pH-Wertes brachte bei keinem der neuen Konjugate einen Erfolg. Somit konnte die These, daß durch die Art der Kopplungsreaktion bedingte Antikörper den Test stören und zu unspezifischen Bindungen führen, widerlegt werden. Mit keinem der nach dem

neuen Verfahren hergestellten Konjugate konnte eine Verbesserung der Sensitivität erreicht werden.

4.4.7 Hapten-Protein-Konjugate mit geringer Haptendichte

Die Synthese von Konjugaten mit Haptendichten zwischen 1 und 5 wurde als weitere Möglichkeit angesehen, die Konkurrenz zu verbessern. Es wurden wiederum Konjugate aus den drei Haptenen PMS, PMS-ABA und PMS-AHA sowie den Proteinen BSA und OVA nach der Methode der aktivierten Ester hergestellt. Die Edukte wurden dabei in einem stöchiometrischen Verhältnis von 5:1 eingesetzt. Nach Aufreinigung der Konjugate und Durchführung der Schachbrett-Titrationsen (siehe Kapitel 4.4.2, Seite 47, Ergebnisse nicht dargestellt), wurde die Funktionsfähigkeit im ELISA getestet.

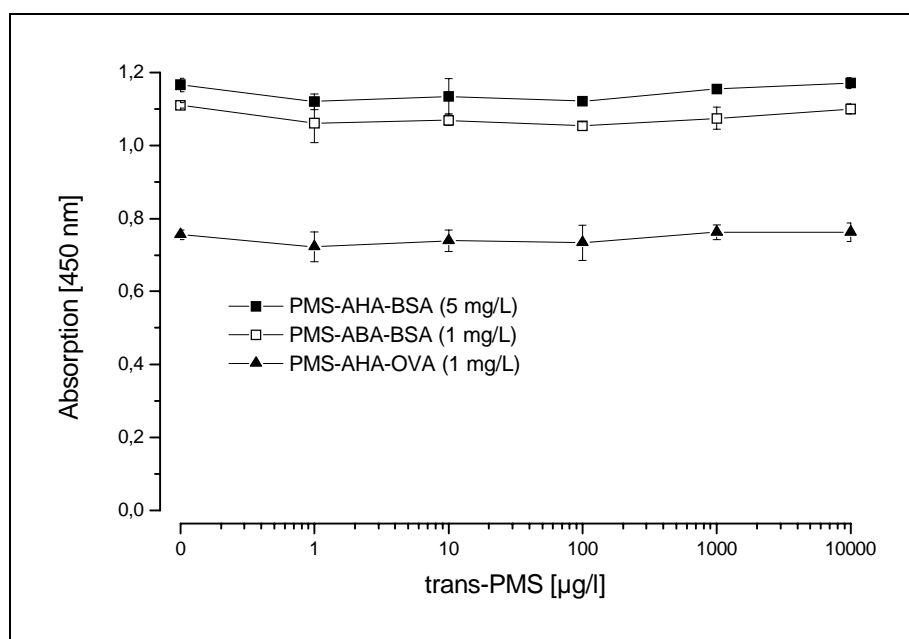


Abbildung 25: Test der Konjugate mit geringer Haptendichte

Bedingungen: Coatingantigene in verschiedenen Konzentrationen in Carbonatpuffer, 100 µl, 16 h bei 4 °C inkub.; Standards sowie Antikörper: C3 1:60000, 50 µl, 1 h bei RT inkub.; Tracer: anti-Rabbit IgG, POD markiert, 1: 10000 in PBS + 1% BSA, 1 h bei RT inkub.; TMB 30 min.

In Abbildung 25 sind stellvertretend drei der neu synthetisierten Konjugate mit geringer Haptendichte gezeigt. Als Antiserum wurde C3 in einer Verdünnung von 1:60000 eingesetzt. Die Tests wurden bei pH 7,6 durchgeführt. Alle Konjugate wurden problemlos vom Antikörper erkannt. Aber auch durch diese Konjugate ist es nicht gelungen, den Antikörper durch Zugabe von Permethrinsäure in unter-

schiedlichen Konzentrationen zu verdrängen. Selbst bei Konzentrationen von 10 mg/L war keine Konkurrenz zu erkennen.

4.4.8 Hapten-Protein-Konjugat mit neuer Spacergruppe

Nachdem die bisher beschriebenen Strategien zur Verbesserung der Konkurrenz keinen Erfolg brachten, sollte ein neues Konjugat mit einer veränderten Spacergruppe synthetisiert werden. Das neue Konjugat zeichnete sich dadurch aus, daß sich ein sperriger Benzolring zwischen Permethrinsäure und dem Protein befand. Es wurde durch Veresterung von Permethrinsäure mit p-Hydroxyphenylessigsäure (pOHPE) hergestellt. Der gereinigte Ester wurde anschließend mit Rinderserumalbumin nach der Methode der aktivierten Ester umgesetzt. Nach Durchführung der Schachbrett-Titration (siehe Kapitel 4.4.2, Seite 47) wurde wiederum im ELISA getestet, ob eine Konkurrenz stattfand oder nicht. Das Hapten-Protein-Konjugat (PMS-pOHPE-BSA) wurde in einer Konzentration von 2 mg/L auf der Platte inkubiert. Anschließend wurden die Antisera C3 und G3 sowie Permethrinsäure in unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen. Das Ergebnis des ELISAs ist in Abbildung 26 dargestellt.

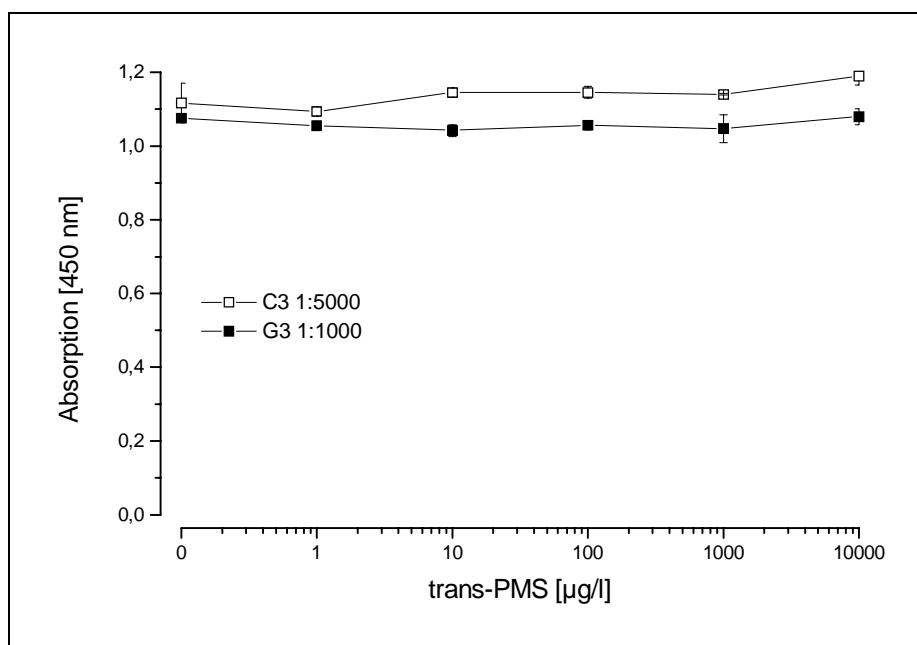


Abbildung 26: Test des Hapten-Protein-Konjugats mit neuem Spacer

Bedingungen: Coatingantigen PMS-pOHPE-BSA 2 mg/L in Carbonatpuffer, 100 µl, 16 h bei 4 °C inkub.; Standards sowie Antikörper: C3 1:5000 und G3 1:1000, 50 µl, 1 h bei RT inkub.; Tracer: anti-Rabbit IgG, POD markiert, 1: 10000 in PBS + 1% BSA, 1 h bei RT inkub.; TMB 30 min.

Ähnlich wie bei den vorherigen Versuchen, durch Synthese neuer Hapten-Protein-Konjugate eine Verbesserung der Kompetition zu erzielen, konnte auch in diesem Fall das Ziel nicht erreicht werden. Betrachtet man die Absorptionen, fällt auf, daß sie im gleichen Bereich lagen, wie bei den vorherigen ELISAs. Die Antikörperverdünnungen, die eingesetzt werden mußten, um diese Absorptionen zu erreichen, waren allerdings um den Faktor 10 geringer als in vorherigen Tests. Das bedeutete, daß die Affinität des Antiserums zum Konjugat wesentlich geringer sein mußte als bei den vorher getesteten Konjugaten.

4.4.9 Reinigung der Antiseren

Nachdem alle bisherigen Versuche zur Optimierung des ELISAs nur wenig erfolgreich waren, sollte in diesem Versuch die Strategie geändert werden. Statt die Umgebungsbedingungen wie Temperatur und pH-Wert oder die Beschichtungskonjugate oder Blockingproteine zu variieren, sollte diesmal die Optimierung mit dem Antiserum selbst erfolgen. Ziel war es, durch eine geeignete Methode die spezifischen, gegen Permethrinsäure, gerichteten Antikörper zu isolieren und die übrigen Serumbestandteile, die den Test möglicherweise stören könnten, abzutrennen. Zu diesem Zweck wurde eine affinitätschromatographische Reinigung des Antiserums durchgeführt. Die Affinitätschromatographie wird zur Reinigung von Biomolekülen eingesetzt. Es handelt sich dabei um eine Art Adsorptionschromatographie, bei der das zu reinigende Molekül spezifisch und reversibel an eine Matrix bindet. Nach Entfernen der nicht gebundenen Moleküle durch Waschen, wird das Zielmolekül durch eine geeignete Elutionslösung von der Matrix entfernt.

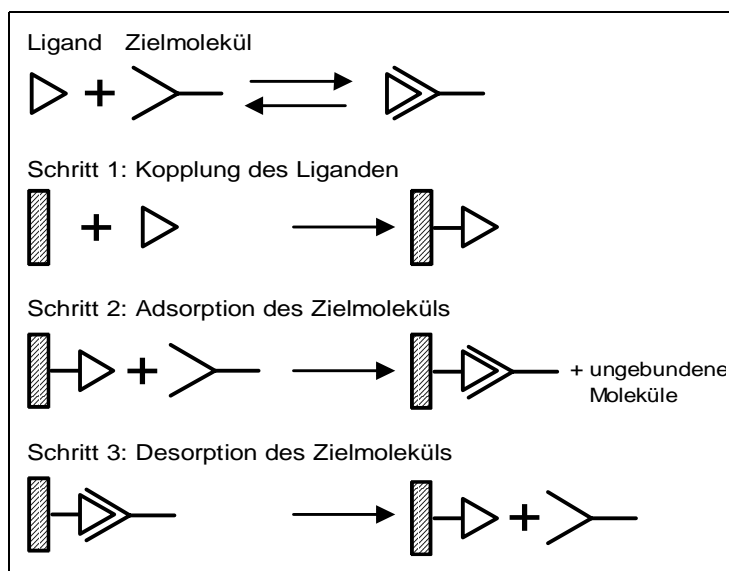


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Affinitätschromatographie

Als Matrix wurde eine modifizierte Agarose eingesetzt, an die Permethrinsäure kovalent gekoppelt wurde (siehe Kapitel 3.6.2, Seite 35). Nachdem das Gel konditioniert worden war, wurde das Antiserum aufgetragen. Die Elution erfolgte schrittweise mit verschiedenen Lösungen, da keine Informationen darüber vorlagen, unter welchen Bedingungen die Antigen-Antikörper-Bindung wieder gelöst

und die Antikörper von der Matrix desorbiert werden konnten. Zunächst wurde die Säule mit einem Puffer mit neutralem pH-Wert gespült, um das nicht an die Matrix gebundene Material zu entfernen. Danach wurde versucht, durch Änderung des pH-Wertes (erst sauer, dann alkalisch) die Antikörper zu eluieren. Der Änderung des pH-Wertes folgte die Elution mit einer hoch konzentrierten Salzlösung und einem Wasser/Ethanol-Gemisch (80/20 (v/v)). Anschließend wurden alle Fraktionen auf ihre Wirksamkeit im ELISA getestet. In Abbildung 28 sind die Ergebnisse für Antiserum C3 exemplarisch dargestellt.

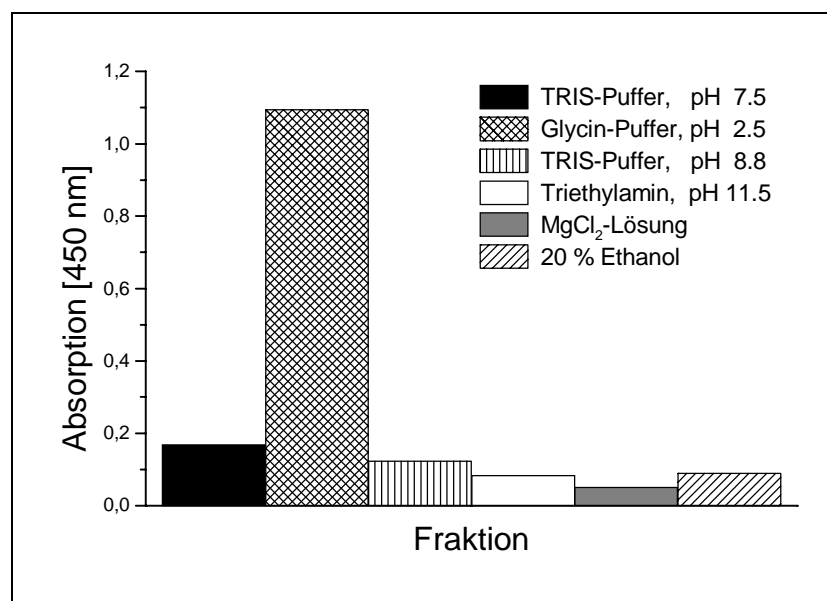


Abbildung 28: Wirksamkeit der einzelnen Fraktionen der affinitätschromatographischen Reinigung von Antiserum C3

Dabei zeigte sich, daß bereits die Elution mit dem Glycinpuffer pH 2.5 ausreichte, um die gegen Permethrinsäure gerichteten Antikörper von der Säule zu eluieren. In den nachfolgenden Fraktionen war keine nennenswerte Antikörperaktivität mehr feststellbar.

Neben Antiserum C3 wurden die Antiseren A3, B3 und G3 auf die gleiche Weise gereinigt. Die Antiseren A3 und B3 wurden ausgewählt, obwohl sie bei den bisherigen Untersuchungen durch einen sehr viel geringeren Titer aufgefallen waren als die übrigen Seren. Es sollte überprüft werden, ob durch die Affinitätschromatographie eine Aufkonzentrierung eventuell vorhandener, gegen Permethrinsäure gerichteter Antikörper erreicht werden konnte. Dabei zeigte sich, daß bei Antiserum A3 eine Aufkonzentrierung stattfand, während sie bei Antiserum B3 mißlang. Die Antiseren C3 und G3 wurden ausgewählt, weil sie sich in den bisherigen Untersuchungen als die vielversprechendsten herausgestellt hatten. Zur besseren Unterscheidung wird bei der Bezeichnung der affinitätschromatographisch gereinigten Antiseren im weiteren Verlauf der Zusatz „affi“ ergänzt (z.B. C3 affi).

4.4.10 ELISA mit den affinitätschromatographisch gereinigten Antiseren

Nach der affinitätschromatographischen Reinigung der Antiseren wurde in Vorversuchen (Schachbrett-Titration, siehe Kapitel 3.9, Seite 39) eine geeignete Kombination von Antikörperverdünnung und Antigenkonzentration ermittelt und der ELISA durchgeführt. Als Hapten-Protein-Konjugate wurden PMS-BSA (GA) und PMS-pOHPE-BSA (AE) eingesetzt. Auf den so beschichteten Mikrotiterplatten wurde die Reaktion der drei affinitätschromatographisch gereinigten Antiseren mit verschiedenen Kompetitoren getestet. Getestet wurden trans-Permethrinsäure, Permethrinsäureglucuronid und PMS-ABA. Glucuronid und Amid waren im Rahmen dieser Arbeit hergestellt worden. Das Glucuronid wurde getestet, weil die Permethrinsäure in glucuronidierter Form im Urin vorliegen kann. Das Amid war die Ausgangsverbindung für die zur Immunisierung verwendeten Konjugate und sollte zeigen, ob eine Konkurrenz prinzipiell möglich ist.

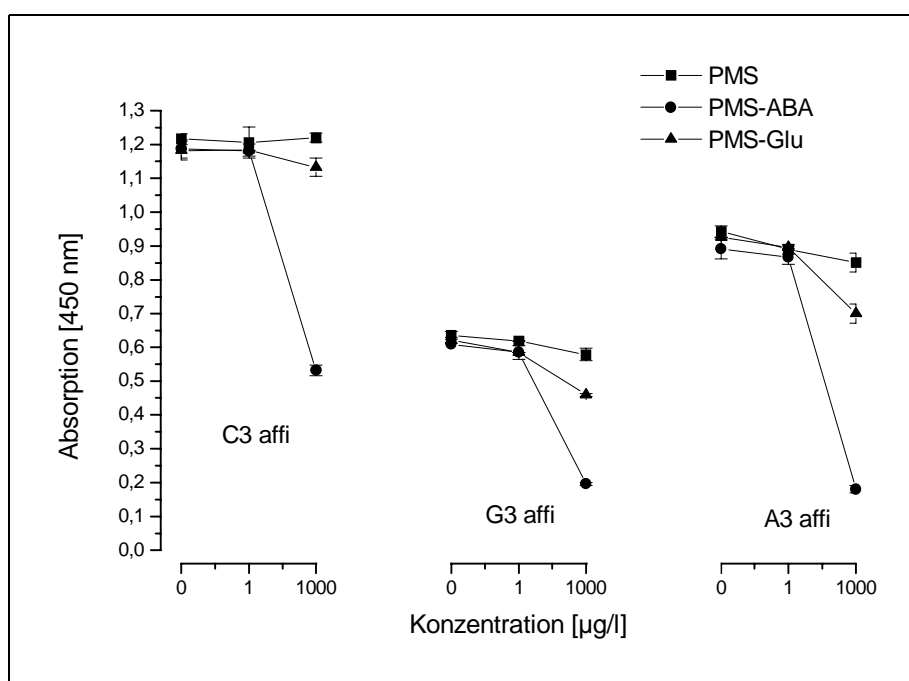


Abbildung 29: Test der affinitätschromatographisch gereinigten Antikörper mit verschiedenen Standards auf Coatingantigen PMS-BSA (GA)

Bedingungen: Coatingantigen PMS-BSA (GA), 2 mg/L in Carbonatpuffer, 100 µl, 16 h bei 4 °C inkub.; Standards sowie alle Antikörper: 1:2000, 50 µl, 1 h bei RT inkub.; Tracer: anti-Rabbit IgG, POD markiert, 1: 10000 in PBS + 1% BSA, 1 h bei RT inkub.; TMB 30 min.

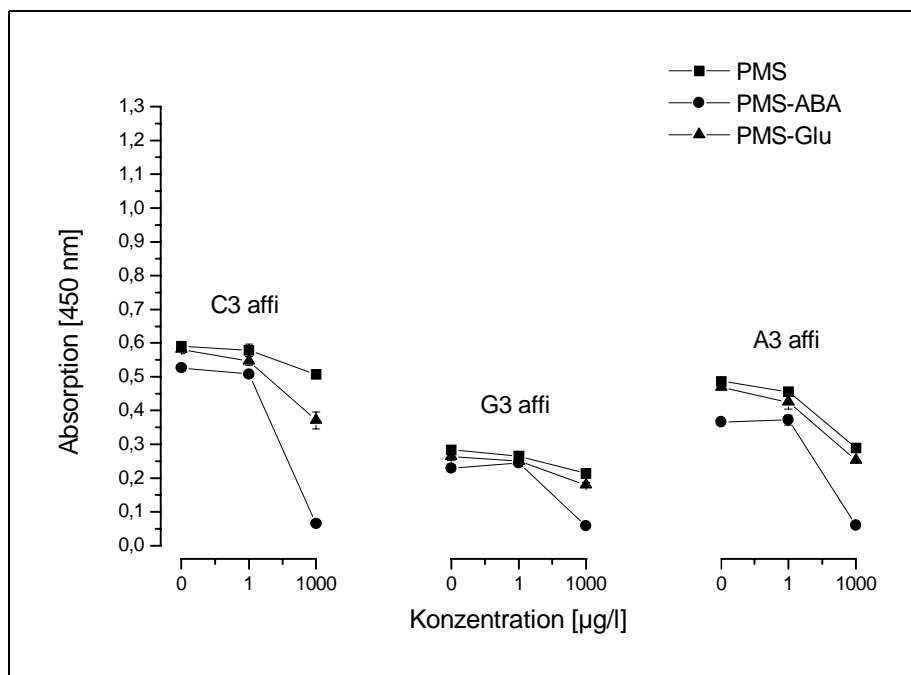


Abbildung 30: Test der affinitätschromatographisch gereinigten Antikörper mit verschiedenen Standards auf Coatingantigen PMS-pOHPE-BSA (AE)

Bedingungen: Coatingantigen PMS-pOHPE-BSA 5 mg/L in Carbonatpuffer, 100 µl, 16 h bei 4 °C inkub.; Standards sowie alle Antikörper: 1:2000, 50 µl, 1 h bei RT inkub.; Tracer: anti-Rabbit IgG, POD markiert, 1: 10000 in PBS + 1% BSA, 1 h bei RT inkub.; TMB 30 min.

Jeder Standard wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen getestet. Dies war zur Beurteilung der Reaktion des Antikörpers auf den jeweiligen Standard ausreichend. Vergleicht man Abbildung 29 und Abbildung 30, so fällt auf, daß mit PMS-BSA (GA) als Coatingantigen bei gleicher Antikörperverdünnung doppelt so hohe Absorptionen erzielt wurden, wie das bei Coatingantigen PMS-pOHPE-BSA (AE) der Fall war. In keinem Fall aber, war bei den Standards Permethrinsäure und Permethrinsäureglucuronid eine ausreichende Kompetitionswirkung zu erkennen. Daß eine Kompetition möglich war, bewiesen die Tests mit PMS-ABA. Hiermit konnten durch Zugabe einer 1 mg/L Lösung Rückgänge der Absorption bis zu 80 % erreicht werden (A3 affi, PMS-BSA (GA)). Die Unterschiede in den Reaktionen der einzelnen Antikörper waren nicht sehr groß. Die besten Ergebnisse konnten mit der Kombination Antikörper A3 affi und Coatingantigen PMS-pOHPE-BSA (AE) erzielt werden. Ein Vergleich der affinitätschromatographisch gereinigten Antiseren mit den unbehandelten ließt keine großen Unterschiede erkennen. Lediglich bei Antiserum A wurde, bedingt durch die Aufkonzentrierung der Antikörperfraktion, eine deutliche Verbesserung erzielt.

4.4.11 Entwicklung eines indirekten ELISA auf Basis kovalent gebundener Haptene

Es sind verschiedene Mikrotiterplatten im Handel, die die direkte kovalente Kopplung eines Permethrinsäurederivats an die Kunststoffoberfläche ermöglichen. Durch den Einsatz dieser Platten sollte überprüft werden, ob die direkte Kopplung eine Verbesserung gegenüber der adsorptiven Immobilisierung eines Hapten-Protein-Konjugats ermöglichte. Als Hapten wurde PMS-pOHPE ausgewählt, da es sich in den bisherigen Tests als am besten geeignet erwiesen hatte. Zunächst wurde in Vorversuchen die optimale Haptenkonzentration ermittelt. Daraufhin erfolgte die Auswahl des Antikörpers und die Ermittlung der besten Antikörperverdünnung. Ein Blockingschritt mit einer 5 %igen Casein-Lösung in PBS erwies sich als gut geeignet, um die unspezifischen Bindungen zu reduzieren.

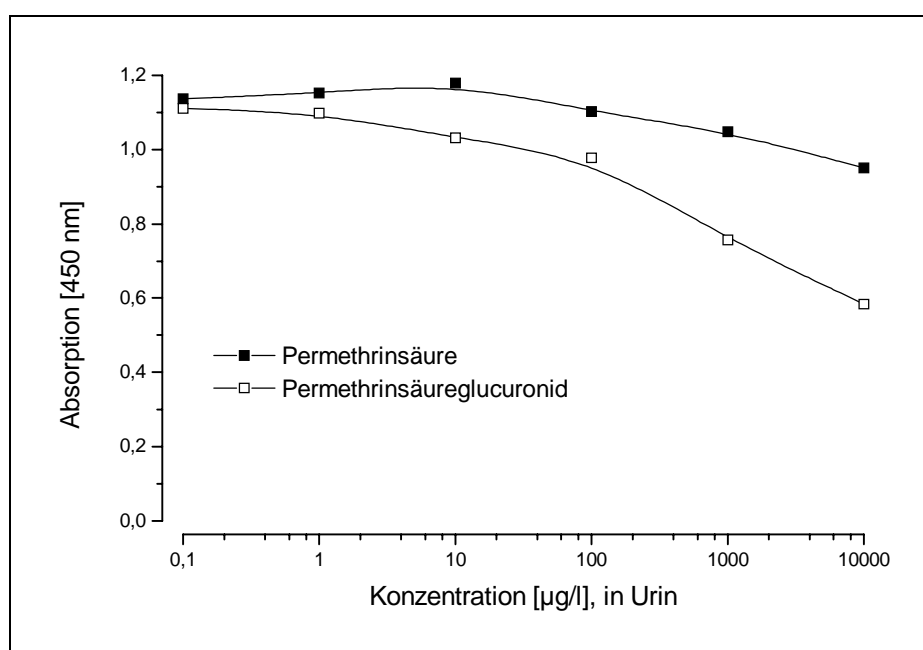


Abbildung 31: Indirekter ELISA mit kovalent an die Mikrotiterplatte gebundenem Hapten

Bedingungen: PMS-pOHPE, 2,5 mg/L, 100 µl, Reaktion durchführen; Blocking mit 5 % Casein in PBS, 100 µl, 3 h bei RT, Antikörper C3 affi, 1:2000 in PBS und Standards in versch. Konz., je 50 µl, 1 h bei RT, Tracer: anti-Rabbit IgG, POD markiert, 1:10000 in PBS + 5 % Casein, 100 µl, 1h bei RT; TMB 30 min.

Abbildung 31 zeigt den ELISA unter optimierten Bedingungen. Als Antikörper wurde C3 affi eingesetzt, als Standard wurden sowohl Permethrinsäure als auch Permethrinsäureglucuronid verwendet. Die Konkurrenz durch Permethrinsäure war äußerst gering. Selbst bei Konzentrationen von 10 mg/L konnte das kovalent

gebundene Hapten nicht vom Antikörper verdrängt werden. Die Kompetitionswirkung von Permethrinsäureglucuronid war deutlich stärker. Ab Konzentrationen von 100 µg/L setzte eine gleichmäßige Konkurrenz ein. Die Ergebnisse waren aber nicht besser, als die oben beschriebenen (siehe Kapitel 4.4.11, Seite 60), so daß dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

4.4.12 Abschließende Untersuchungen

Zum Abschluß der Versuche zur Entwicklung eines indirekten ELISAs sollte noch einmal ein Test durchgeführt werden, in den alle bisherigen Erkenntnisse der Optimierungsversuche einfließen sollten. Als Coatingantigen wurde PMS-pOHPE-BSA (AE) eingesetzt, als Antikörper wurden A3 affi und C3 affi verwendet. Permethrinsäureglucuronid wurde als Standard benutzt. Es wurden sieben Kalibrierlösungen in Urin angesetzt und im ELISA gemessen.

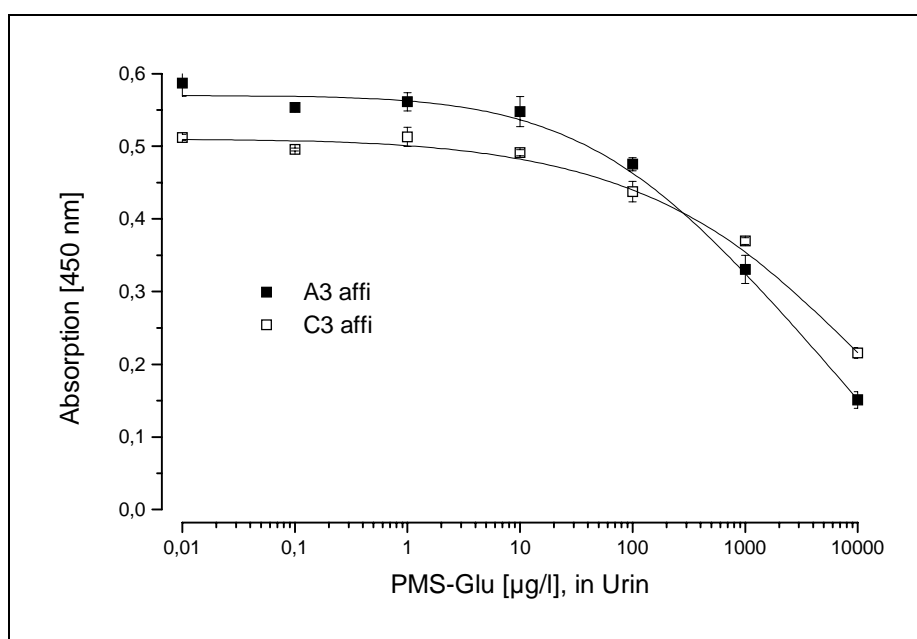


Abbildung 32: Vergleich der affinitätschromatographisch gereinigten Antiseren im indirekten ELISA unter optimierten Bedingungen

Bedingungen: Coatingantigen PMS-pOHPE-BSA 5 mg/L in Carbonatpuffer, 100 µl, 16 h bei 4 °C inkub.; Standards sowie alle Antikörper: 1:1000, 50 µl, 1 h bei RT inkub.; Tracer: anti-Rabbit IgG, POD markiert, 1: 10000 in PBS + 1% BSA, 1 h bei RT inkub.; TMB 30 min.

Im Vergleich zu den vorherigen Kompetitionskurven, die immer mehr oder weniger parallel zur x-Achse verliefen, ist diesmal ein deutlicher Rückgang der Absorptionen zu beobachten. Dieser Rückgang ist bei Antikörper A3 affi noch etwas stärker ausgeprägt als bei Antikörper C3 affi, was auf eine höhere Empfindlichkeit hindeutet. Die Empfindlichkeit konnte soweit gesteigert werden, daß mit Antikörper A3 affi Permethrinsäureglucuronid im Urin in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,1 und 10 mg/L nachgewiesen werden konnte. Das Ansetzen der Standards in Urin statt in Puffer hatte keinen Einfluß auf den Test.

4.5 Entwicklung eines direkten ELISAs

4.5.1 Herstellung und Screening der Tracer

Für die Entwicklung eines direkten ELISAs mußte Permethrinsäure oder ein Derivat unter Erhaltung der Enzymaktivität an Peroxidase gekoppelt werden. Dieser Tracer wurde anschließend im ELISA eingesetzt und konkurrierte mit freier Permethrinsäure um die Antikörperbindungsstellen. Die Herstellung der Tracer erfolgte nach der in Kapitel 3.3.4 (Seite 32) beschriebenen Methode. Vier Substanzen wurden als Haptenkomponente ausgewählt, die sich durch die Spacergruppe unterschieden. Neben Permethrinsäure waren dies PMS-ABA, PMS-AHA und PMS-pOHPE.

Nach Synthese und Reinigung der Tracer wurde ihre Funktionsfähigkeit im ELISA überprüft. Jeder Tracer wurde mit allen Antiseren getestet. Zu diesem Zweck wurden Mikrotiterplatten zeilenweise mit den acht verschiedenen Antiseren in unterschiedlichen Verdünnungen beschichtet. Anschließend wurde jeweils einer der Tracer zugegeben und der ELISA durchgeführt.

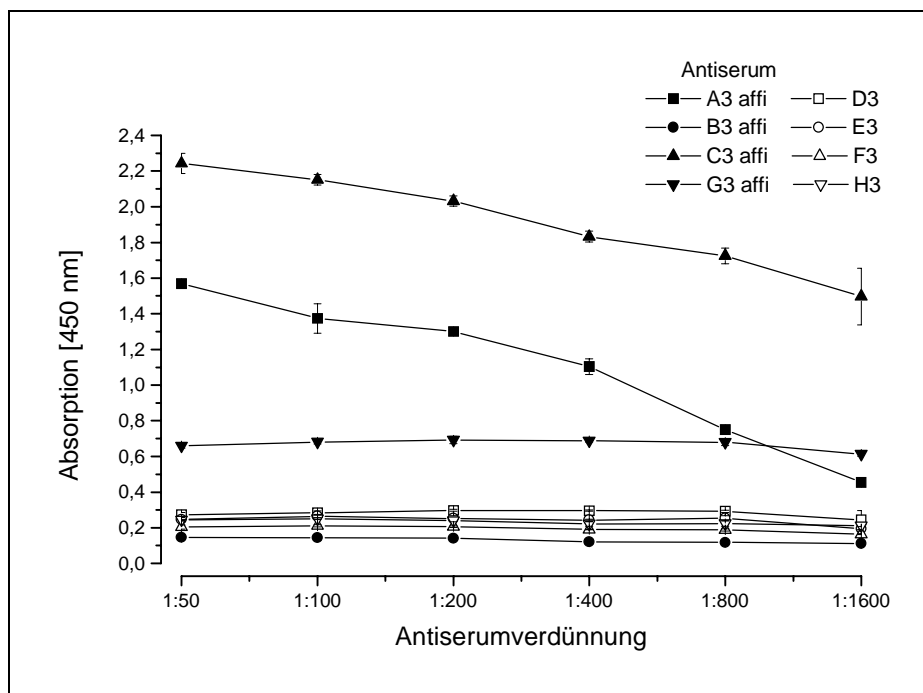


Abbildung 33: Überprüfung der Funktionstüchtigkeit der neuen Tracer am Beispiel von PMS-pOHPE-HRP

Bedingungen: Vorbeschichten mit Protein A, 1 mg/L in PBS, 16 h bei 4 °C inkub.; Antiseren in verschiedenen Verd. in PBS auftragen, 1 h bei RT inkub.; Tracer 1:5000 in PBS auftragen; TMB 20 min.

Abbildung 33 zeigt beispielhaft die Reaktion des Tracers PMS-pOHPE-HRP mit den einzelnen Antiseren. Lediglich die Antiseren A3 affi, C3 affi und G3 affi wiesen erhöhte Extinktionswerte auf, die über denen unspezifischer Bindungen lagen. Von diesen drei zeigten nur die Antiseren A3 affi und C3 affi einen konzentrationsabhängigen Rückgang der Extinktionen bei steigenden Verdünnungen der Antiseren. Diese Beobachtung wurde auch durch die Ergebnisse der anderen ELISAs bestätigt. Allgemein bewiesen die erhaltenen Kurven aber die erfolgreiche Koppelung der einzelnen Haptene mit Peroxidase. Die weiteren Optimierungsversuche wurden mit den Antiseren A3 affi, C3 affi und G3 affi durchgeführt.

4.5.2 Schachbrett-Titration

Wiederum wurde in Schachbrett-Titrationen getestet, welche Kombination aus Antiserum- und Tracer die besten Ergebnisse liefert. Im Unterschied zu den vorherigen Schachbrett-Titrationen (siehe Kapitel 3.9, Seite 39), wurde diesmal gleichzeitig die Reaktion mit einem Standard getestet. Die Schachbrett-Titrationen wurden mit den Antiseren A3 affi, C3 affi und G3 affi durchgeführt.

Jedes Serum wurde in sieben verschiedenen Verdünnungen auf einer Mikrotiterplatte inkubiert und auf seine Reaktion mit den vier unterschiedlichen Tracern bei Einwirkung eines Null-, Niedrigst- und höchstkonzentrierten Standards getestet. Die Tracer wurden dabei in zwei Verdünnungen eingesetzt. Als Standard wurde Permethrinsäureglucuronid in Konzentrationen von 1 µg/L und 1 mg/L verwendet.

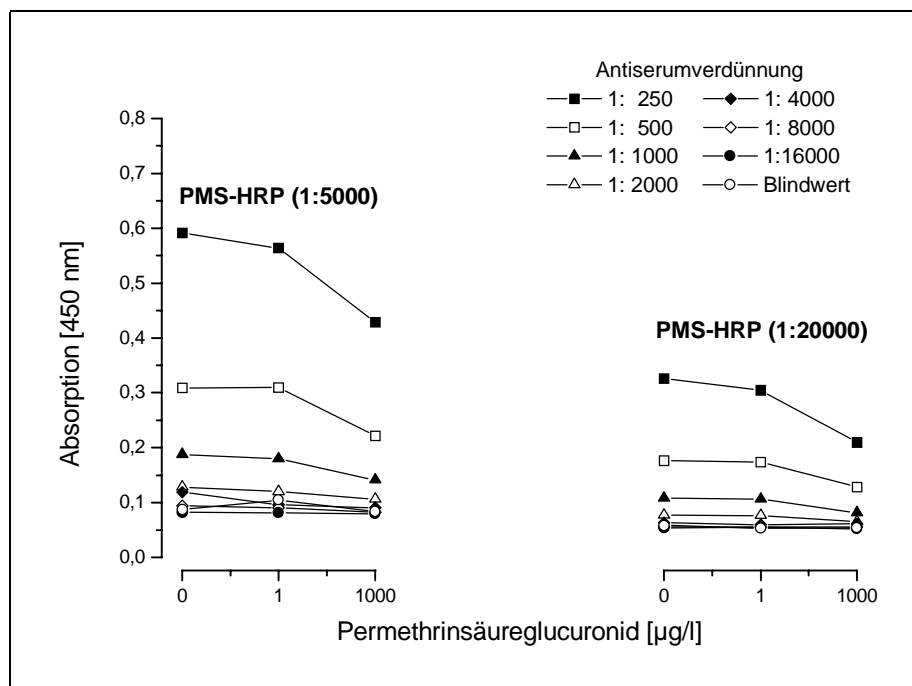


Abbildung 34: Schachbrett-Titration mit Ak G3 affi und PMS-HRP

Bedingungen: Vorbeschichten mit Protein A, 1 mg/L in PBS, 16 h bei 4 °C inkub.; Antiseren in verschiedenen Verd. in PBS auftragen, 1 h bei RT inkub.; Standard 0, 1 und 1000 µg/L in PBS + 1% EtOH; Tracer 1:5000 und 1:20000 in PBS auftragen; TMB 20 min.

Abbildung 34 zeigt beispielhaft die Reaktion von G3 affi mit dem Tracer PMS-HRP. Man erkennt, daß die erzielten Signalintensitäten gering waren. In der niedrigsten Verdünnungsstufe des Antiserums erreichte die Extinktion nur einen Wert von 0,6 und schon bei Verdünnungen größer 1:1000 sanken die Extinktionen auf Werte, die sich im Bereich des Grundrauschens befanden. Dies war ein Zeichen dafür, daß zu wenige Antikörper vorhanden waren, die mit dem Tracer reagieren konnten. Dazu kommt, daß selbst eine Konzentration des Standards von 1 mg/L nur einen geringen Rückgang der Extinktion bewirkte. Die Kombination Ak G3 affi/PMS-pOHPE-HRP wurde deshalb in weiteren Versuchen nicht mehr berücksichtigt.

Wie am Beispiel in Abbildung 34 erläutert, konnte mit dieser Art der Schachbrett-Titration Aufschluß darüber gewonnen werden, welche Kombination Antise-

rum/Tracer am empfindlichsten auf den Standard reagierte. Des weiteren konnten die ungefähren Arbeitsverdünnungen bestimmt werden, die dann in weiteren Versuchen optimiert werden mußten. Die besten Ergebnisse wurden bei einer Reaktion von Antiserum A3 affi mit dem Tracer PMS-pOHPE-HRP erzielt.

4.5.3 Test verschiedener Plattenvorbeschichtungen

Neben der Möglichkeit, die Antiseren direkt auf der Mikrotiterplatte zu immobilisieren, sollte geprüft werden, ob das Vorbeschichten der Platten mit Protein A oder einem gegen Kaninchenantikörper gerichteten Antikörper (anti Rabbit IgG) einen positiven Effekt hat. Es wurden Platten mit beiden Reagenzien in verschiedenen Konzentrationen getestet, um eine ausreichende Bindung der Antiseren zu gewährleisten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 35 dargestellt.

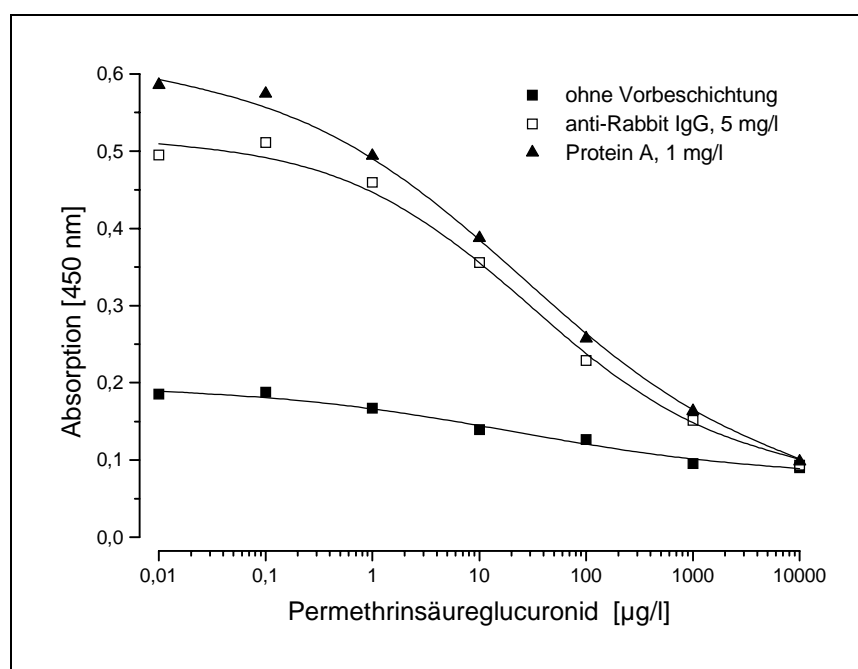


Abbildung 35: Test verschiedener Plattenvorbeschichtungen

Bedingungen: Vorbeschichtung siehe Graphik, 100 µl, 16 h bei 4 °C inkub., Ak A3 affi 1:1000, 100 µl, 16 h bei 4 °C; Standard und Tracer PMS-pOHPE-HRP 1:1000, je 50 µl, 3 h bei RT; TMB 20 min.

Sowohl die Vorbeschichtung der Mikrotiterplatte mit Protein A als auch mit anti-Rabbit IgG bewirkten eine deutliche Verbesserung der Assayperformance. Unter ansonsten gleichen Bedingungen bewegten sich die Extinktionen der direkt mit A3 affi beschichteten Platte nur wenig über dem Grundrauschen, während man bei den vorbeschichteten Platten Extinktionen erreichte, die mehr als doppelt so hoch waren. Bereits ab einer Konzentration des Standards von 10 $\mu\text{g/L}$, im Falle von Protein A sogar schon von 1 $\mu\text{g/L}$, war eine deutliche Konkurrenz zu beobachten. Da die Vorbeschichtung der Platten eine deutlich effektivere Immobilisierung der Antikörper ermöglichte, wurde in allen weiteren Versuchen eine Vorbeschichtung der Platten mit Protein A durchgeführt. Dabei erwies sich eine Konzentration von 1mg/L als ausreichend, mit höheren Konzentrationen ließ sich die Extinktion nicht mehr steigern.

4.5.4 Optimierung von Antikörper- und Tracerverdünnung

Nachdem die optimalen Parameter für die Vorbeschichtung gefunden waren, sollte nach dem Muster der in Kapitel 4.5.2 (Seite 63) beschriebenen Schachbrett-Titration die beste Kombination von Antikörper- und Tracerverdünnung für den Antikörper A3 affi und den Tracer PMS-pOHPE-HRP bestimmt werden. Sowohl der Antikörper als auch der Tracer wurden in vier verschiedenen Verdünnungen eingesetzt, so daß 16 verschiedene Antikörper/Tracer-Kombinationen auf ihre Reaktion mit Permethrinsäureglucuronid getestet werden konnten.

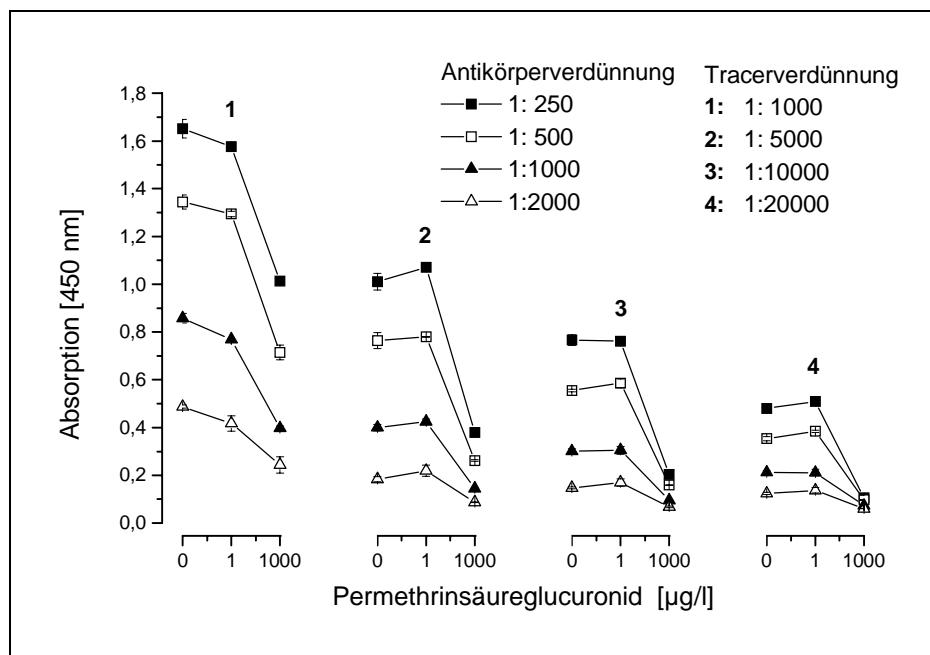


Abbildung 36: Schachbrett-Titration zur Bestimmung der besten Antikörper- und Tracerverdünnung

Bedingungen: Protein A, 1 mg/L, 100 µl, 16 h bei 4 °C inkub., Ak A3 affi in verschiedenen Verd., 100 µl, 3 h bei RT °C; Standard und Tracer PMS-pOHPE-HRP in verschiedenen Verd., je 50 µl, 1 h bei RT; TMB 20 min.

Die Antikörper- und Tracerverdünnung wurden so gewählt, daß die Extinktion des Nullstandards zwischen 0,8 und 1 lag (Kompromiß zwischen möglichst hoher Extinktion und möglichst geringem Verbrauch des nur begrenzt vorhandenen Antikörpers). Dies traf für mehrere Kombinationen zu. Die Kombination aus A3 affi, 1:1000 verdünnt und PMS-pOHPE-HRP, 1:1000 wies den größten Rückgang der Extinktion bei einer Standardkonzentration von 1 µg/L auf und schien die höchste Empfindlichkeit zu liefern. In den weiteren Tests wurde daher mit diesen Verdünnungen weitergearbeitet.

4.5.5 Variation der Antikörperinkubationszeiten

Im Hinblick auf eine möglichst kurze Dauer der Testdurchführung sollte überprüft werden, welchen Einfluß die Inkubationszeit des Antikörpers auf die Testperformance hat. Zu diesem Zweck wurden drei ELISAs unter identischen Bedingungen durchgeführt, lediglich die Antikörperinkubationszeiten variierten zwischen einer bzw. drei Stunden bei Raumtemperatur und einem Tag bei 4 °C.

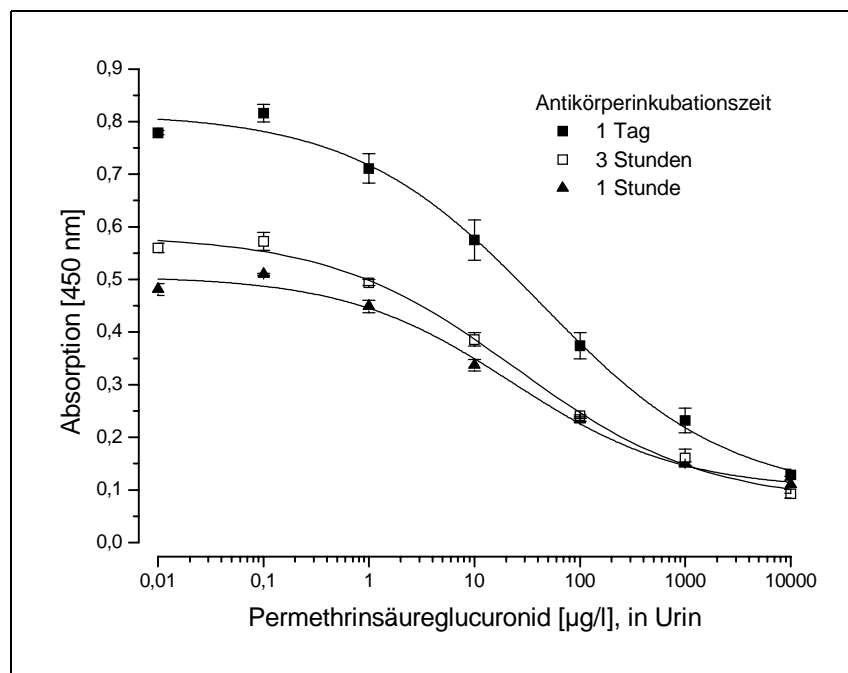


Abbildung 37: Variation der Antikörperinkubationszeiten

Bedingungen: Protein A, 1 mg/L, 100 µl, 16 h bei 4 °C inkub., Ak A3 affi 1:1000 in PBS., 100 µl, Inkubation siehe Grafik; Standard und Tracer PMS-pOHPE-HRP 1:1000, je 50 µl, 1 h bei RT; TMB 20 min.

Der Unterschied zwischen einer Inkubationsdauer von einer oder von drei Stunden war gering. Die Verlängerung um zwei Stunden führte nur zu etwas höheren Signalintensitäten, während die Testempfindlichkeit ungefähr gleich blieb. Bei einer Inkubationsdauer von einem Tag war dagegen eine deutliche Zunahme der Signalintensitäten zu erkennen. Auf den ersten Blick schien diese Kurve durch die größte Differenz der Extinktion von Null- und höchstkonzentriertem Standard das beste Testergebnis zu liefern. Entscheidend waren aber die Testmittelpunkte der einzelnen Kurven. Durch eine Datenanpassung der Meßdaten nach dem 4-Parametermodell (siehe Kapitel 2.2.2, Seite 17) wurden die Testmittelpunkte der einzelnen Kalibrierfunktionen berechnet. Der Testmittelpunkt stieg mit Verlängerung der Inkubationszeit. Bei einer Inkubationszeit von einer Stunde lag er bei 23 µg/L, für drei Stunden bei 25 µg/L und für eine Inkubationszeit von einem Tag bei 43 µg/L. Betrachtet man den Testmittelpunkt als Maß für die Empfindlichkeit des ELISAs, so sank diese bei der Inkubation von einem Tag um ca. die Hälfte gegenüber den beiden anderen Inkubationszeiten. Aus diesem Grund wurde die Antikörperinkubationsdauer trotz der geringeren Signalintensitäten auf eine Stunde begrenzt und trug damit auch zu einer schnellen Testdurchführung bei.

4.5.6 Variation der Tracerinkubationszeit

Ähnlich wie die Untersuchungen zum Einfluß der Inkubationszeit des Antikörpers auf die Testperformance, sollte auch der Einfluß der Tracerinkubationszeit geprüft werden. Es wurden vier verschiedene Tracerinkubationszeiten untersucht, alle anderen Testparameter waren konstant.

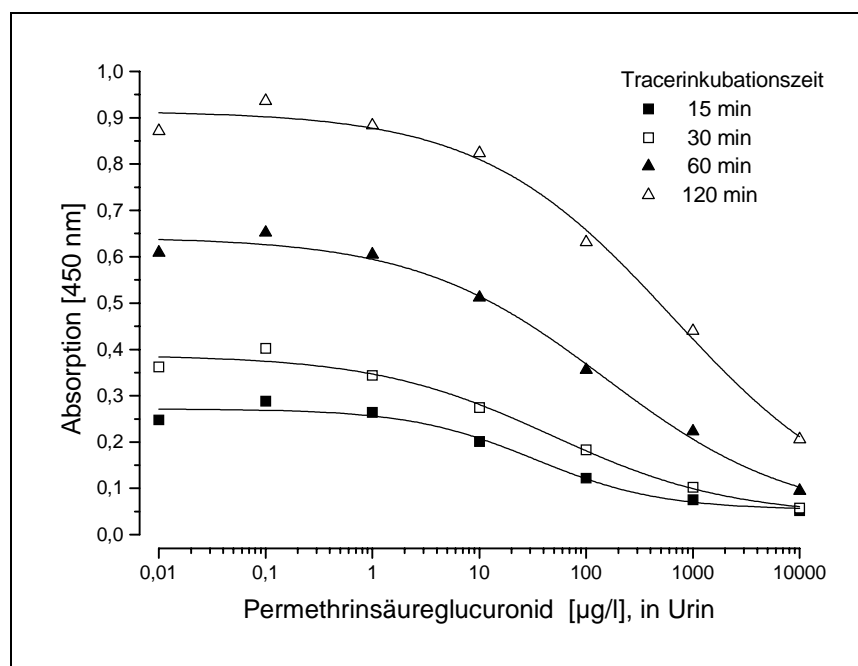


Abbildung 38: Einfluß der Tracerinkubationszeit auf die Testperformance

Bedingungen: Protein A, 1 mg/L, 100 µl, 16 h bei 4 °C inkub., Ak A3 affi 1:1000 in PBS., 100 µl, 1 h bei RT inkub., Standard und Tracer PMS-pOHPE-HRP 1:1000, je 50 µl; TMB 20 min.

Die Datenanpassung und Berechnung der Testmittelpunkte erfolgte wiederum nach dem 4-Parametermodell. Dabei zeigte sich, daß sich mit einer Verkürzung der Inkubationszeit auch die Testmittelpunkte zu niedrigeren Konzentrationen verschoben. Gleichzeitig nahm aber auch die Signalintensität ab, so daß die Inkubationszeit nicht beliebig weit verkürzt werden konnte. Es mußte daher ein Kompromiß gefunden werden zwischen einem möglichst niedrigen Testmittelpunkt bei einer ausreichend hohen Signalintensität. Dieser wurde mit einer Inkubationsdauer von einer Stunde gefunden. Weitere Tests wurden daher mit einer Tracerinkubationszeit von einer Stunde durchgeführt.

4.5.7 Einfluß von pH-Wert und Pufferkonzentration

Wie bereits bei der Entwicklung des indirekten ELISAs (siehe Kapitel 4.4.4, Seite 49), so wurde auch hier der Einfluß des pH-Wertes auf die Competition untersucht. Zusätzlich wurde, nachdem ein optimaler pH-Wert gefunden war, die Salzkonzentration des Puffers variiert. Als Antikörper wurde A3 affi verwendet, als Tracer wurde PMS-pOHPE-HRP eingesetzt. Im ersten Schritt wurde der Test bei sechs verschiedenen pH-Werten durchgeführt.

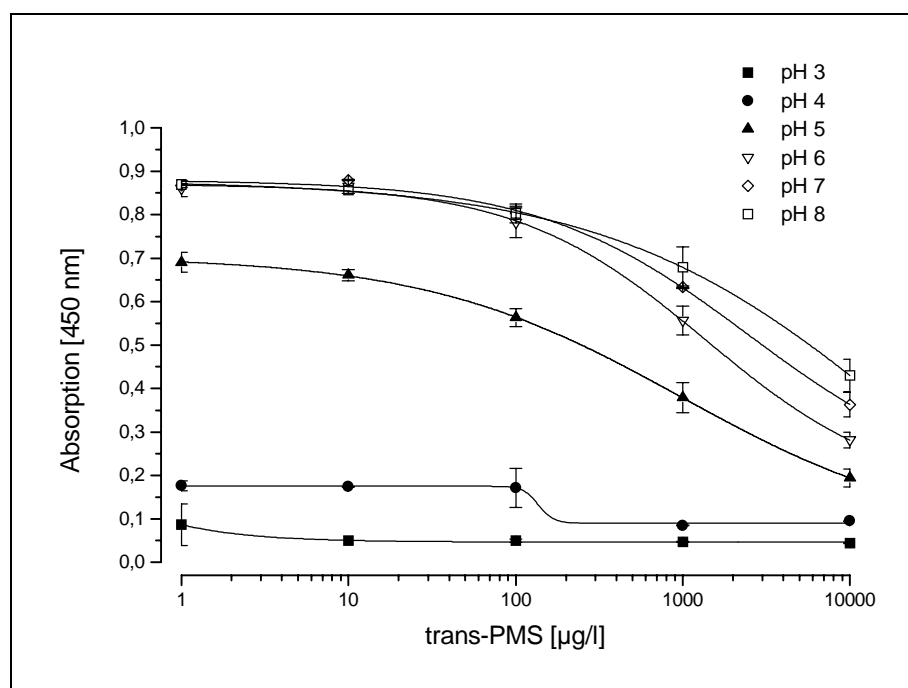


Abbildung 39: Einfluß des pH-Wertes auf die Competition

Bedingungen: Protein A, 1 mg/L, 100 µl, 16 h bei 4 °C inkub., Ak A3 affi 1:1000 in PBS., 100 µl, 1 h bei RT inkub., Standard und Tracer PMS-pOHPE-HRP 1:1000 in verschiedenen Puffern, je 50 µl; TMB 20 min.

Bei pH-Werten von 3 und 4 waren die Absorptionen sehr viel geringer als bei den übrigen pH-Werten. In diesen Fällen konnte von einer Schädigung der Peroxidase durch die sauren Puffer ausgegangen werden, so daß eine Testdurchführung nicht möglich war. Ab einem pH-Wert von 5 waren die gemessenen Absorptionen ausreichend hoch und die Kalibrierfunktionen zeigten den typischen Verlauf. Die Competition setzte bei Permethrinsäurekonzentrationen größer 10 µg/L ein. Mit steigendem pH-Wert nahm das Ausmaß der Competition ab. Die besten Ergebnisse wurden bei pH 5 erzielt. Bei diesem pH-Wert wies die Kalibrierfunktion den niedrigsten (besten) Testmittelpunkt auf. Die im Vergleich zu höheren pH-Werten etwas erniedrigten Absorptionen waren auf Unterschiede der Enzymaktivität der Peroxidase bei verschiedenen pH-Werten zurückzuführen.

In einem zweiten Schritt sollte der Einfluß der Salzkonzentration der eingesetzten Puffer auf die Testperformance ermittelt werden. Die Tests wurden unter identischen Bedingungen bei einem pH-Wert von 5 wiederholt. Variiert wurden die Salzkonzentrationen der eingesetzten Puffer. Sie schwankten zwischen 0,15 und 1,5 mol/L.

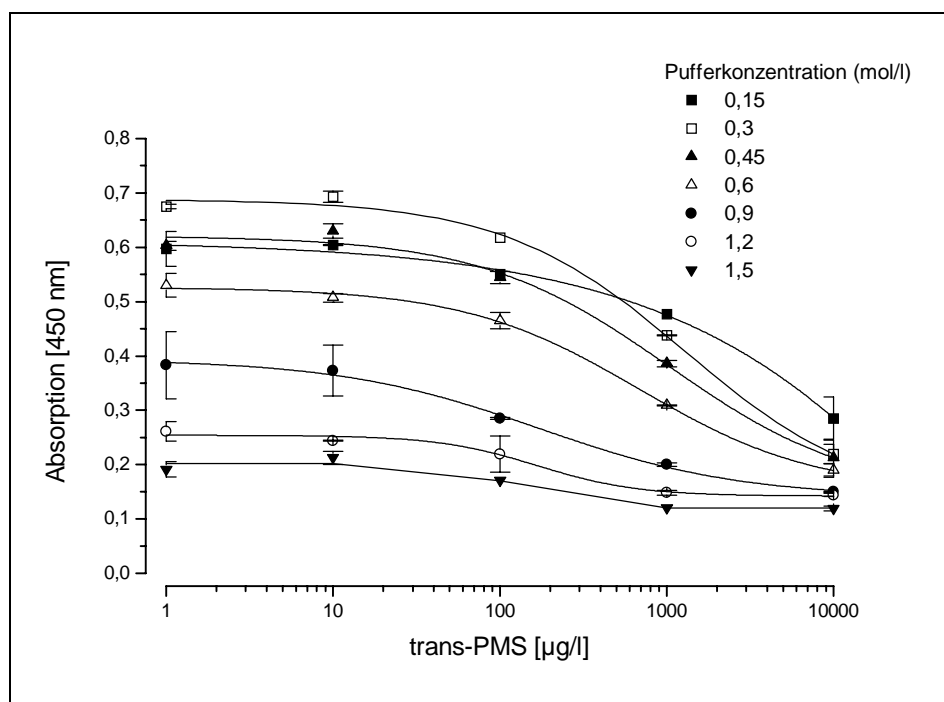


Abbildung 40: Einfluß der Pufferkonzentration auf die Kompetition

Bedingungen: Protein A, 1 mg/L, 100 µl, 16 h bei 4 °C inkub., Ak A3 affi 1:1000 in PBS., 100 µl, 1 h bei RT inkub., Standard und Tracer PMS-pOHPE-HRP 1:1000 in Puffer verschiedener Salzkonzentration, je 50 µl; TMB 20 min.

Die größten Absorptionen wurden bei 0,3 mol/L erzielt. Ab dieser Konzentration nahm mit zunehmender Pufferkonzentration auch die Absorption immer weiter ab. Das Ausmaß der Kompetition war in allen Fällen ungefähr gleich und setzte bei Permethylinsäurekonzentrationen größer 10 µg/L ein. Eine Sonderstellung nahm der Puffer mit der Konzentration von 0,15 mol/L ein. Bei geringerer Absorption war auch die Kompetition weniger ausgeprägt als in den übrigen Fällen. Der optimale Wert schien bei 0,3 mol/L zu liegen. In allen weiteren ELISAs wurde deswegen ein Puffer mit einem pH-Wert von 5 und einer Konzentration von 0,3 mol/L verwendet.

4.5.8 ELISA unter optimierten Bedingungen

Mit den bisher gewonnenen Erkenntnissen sollte ein ELISA unter optimierten Bedingungen durchgeführt werden. Als Antikörper wurde A3 affi (1:1000 verdünnt) eingesetzt, als Tracer wurde PMS-pOHPE-HRP (1:1000 verdünnt) verwendet. Der Permethrinsäureglucuronidstandard wurde frisch angesetzt und der ELISA durchgeführt. Das Ergebnis entsprach nicht den Erwartungen, die sich aus den bisherigen Optimierungsversuchen ergaben. Die Empfindlichkeit war deutlich geringer. Um die Ursache für diese Verschlechterung herauszufinden, wurde der Test wiederholt. Neben dem frisch angesetzten Permethrinsäureglucuronidstandard (PMS-Glu neu) wurden parallel der alte Standard (PMS-Glu alt), Permethrinsäure und Permethrinsäuremethylester (PMS-Me) im ELISA getestet.

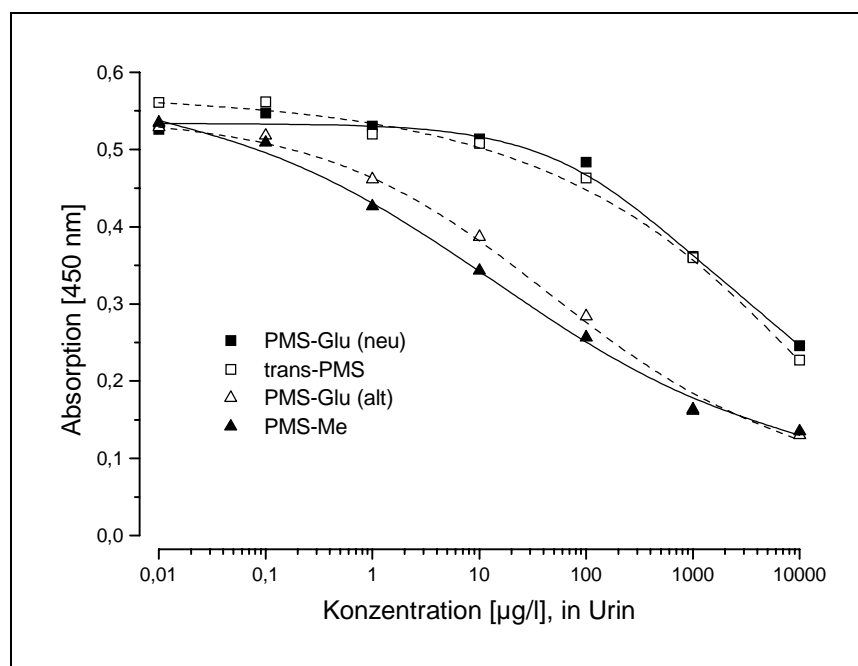


Abbildung 41: Durchföhrung des ELISAs unter optimierten Bedingungen

Bedingungen: Protein A, 1 mg/L, 100 μl , 16 h bei 4 $^{\circ}\text{C}$ inkub., Ak A3 affi 1:1000 in PBS., 100 μl , 1 h bei RT inkub., Standards und Tracer PMS-pOHPE-HRP 1:1000, je 50 μl , 1 h bei RT; TMB 20 min.

Es bestand ein deutlicher Unterschied zwischen „altem“ und frisch angesetztem Permethrinsäureglucuronid. Einer der beiden Standards mußte neben Permethrinsäureglucuronid eine „Verunreinigung“ enthalten, die für die unterschiedliche Konkurrenz verantwortlich war. Die Kalibrierfunktion des „alten“ Standards glich der von Permethrinsäuremethylester. Dies legte die Vermutung nahe, daß es sich bei der „Verunreinigung“ ebenfalls um einen Permethrinsäureester handeln könnte. Entsprechende Untersuchungen mit Hilfe der Massenspektrometrie bestätigten diese Vermutung. Der „alte“ Standard bestand zu einem großen Teil aus

Permethrinsäureethylester. Im Laufe der Lagerung des Standards fand eine Umesterung mit Ethanol statt, welches als Lösungsmittel verwendet worden war. Die weiteren Stammlösungen wurden daher nicht mehr in Ethanol, sondern in Acetonitril angesetzt.

Die Umesterung des Permethrinsäureglucuronid bedeutete, daß die vorherigen Optimierungsversuche nicht mit dem Glucuronid, sondern mit dem Ethylester durchgeführt worden waren. Ein Blick auf Abbildung 41 (Seite 72) macht deutlich, daß mit dem direkten ELISA sowohl Permethrinsäure als auch das Glucuronid erst in Konzentrationen größer 100 µg/L nachgewiesen werden konnten.

4.5.9 Ermittlung der Kreuzreaktivitäten

Zur näheren Charakterisierung des Antikörpers A3 affi sollten die Kreuzreaktivitäten mit strukturverwandten Substanzen ermittelt werden. Es wurden Verbindungen getestet, die sich durch unterschiedliche Substituenten an der Vinylgruppe auszeichneten. Dazu gehörten Deltamethrin, bei dem die beiden Chloratome an der Vinylgruppe durch Bromatome ersetzt sind und Bifenthrin, bei dem ein Chloratom durch eine Trifluormethylgruppe ersetzt ist. Mit cis-Permethrinsäure wurde eine Verbindung mit unterschiedlicher Stereochemie getestet. Die anderen Verbindungen unterschieden sich durch die Reste an der Carboxylfunktion der Permethrinsäure.

Zur genauen Bestimmung der Kreuzreaktivitäten waren Verdünnungsreihen des jeweiligen Kreuzreaktanden und der Analyten trans-Permethrinsäure bzw. Permethrinsäureglucuronid unter gleichen Bedingungen gemessen worden. Zur besseren Löslichkeit wurden alle Standards in PBS + 10 % Methanol angesetzt.

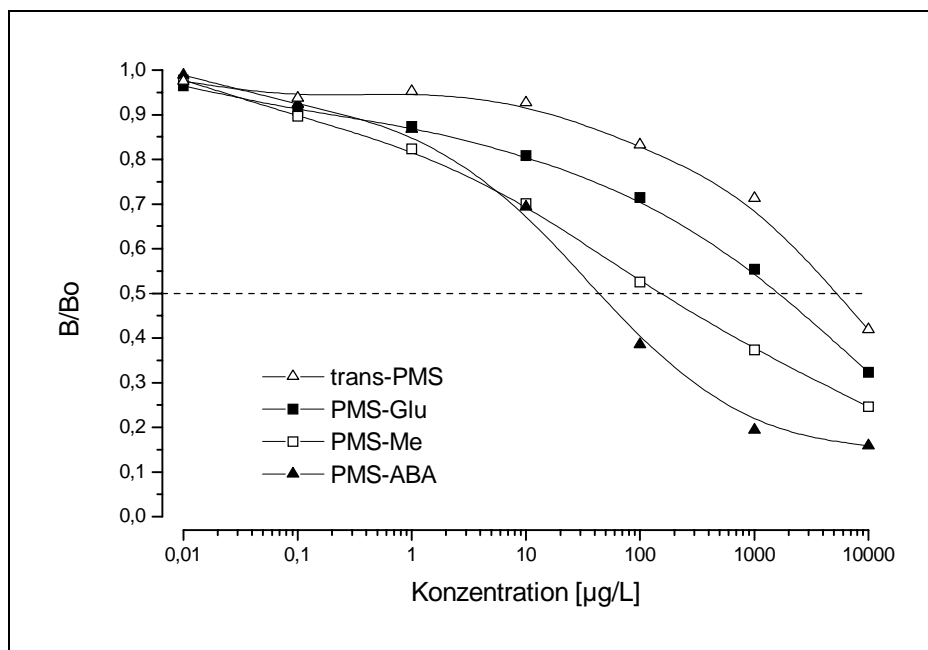
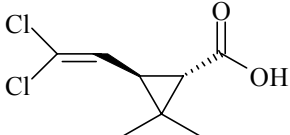
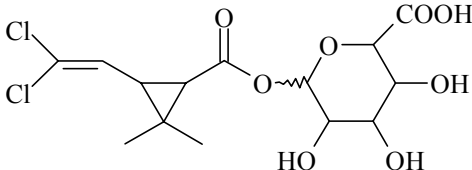
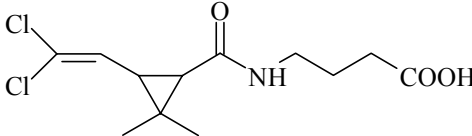
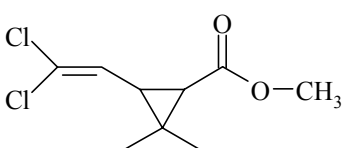


Abbildung 42: Kalibrierfunktionen zur Ermittlung der Kreuzreaktivitäten (Teil 1)

Bedingungen: Protein A, 1 mg/L, 100 µl, 16 h bei 4 °C inkub., Ak A3 affi 1:1000 in PBS., 100 µl, 1 h bei RT inkub., Standards und Tracer PMS-pOHPE-HRP 1:1000, je 50 µl, 1 h bei RT; TMB 20 min.

Tabelle 7: Übersicht über die getesteten Kreuzreaktanden (Teil 1)

Substanz	Testmittelpunkt (IC ₅₀) [µg/L]	KR [%]
trans-PMS 	5100	
PMS-Glu 	1700	300
PMS-ABA 	43	~12000
PMS-Me 	160	~ 3200

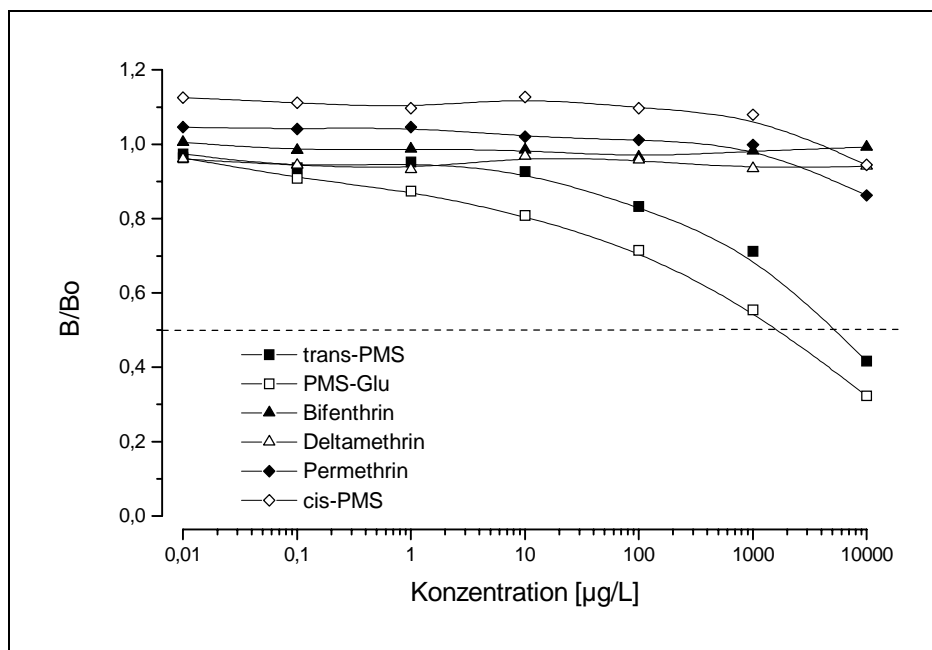
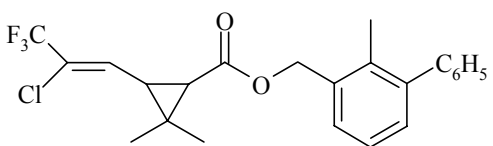
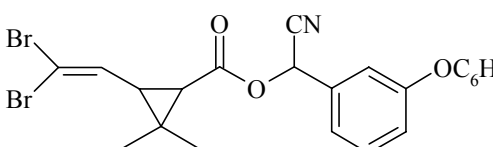
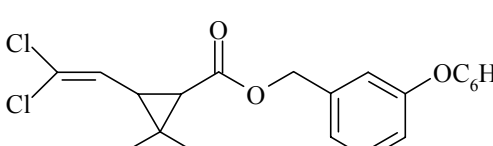
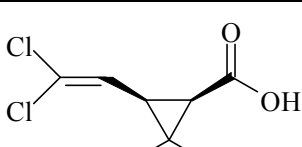


Abbildung 43: Kalibrierfunktionen zur Ermittlung der Kreuzreaktivitäten (Teil 2)

Bedingungen: Protein A, 1 mg/L, 100 µl, 16 h bei 4 °C inkub., Ak A3 affi 1:1000 in PBS., 100 µl, 1 h bei RT inkub., Standards und Tracer PMS-pOHPE-HRP 1:1000, je 50 µl, 1 h bei RT; TMB 20 min.

Tabelle 8: Übersicht über die getesteten Kreuzreaktanden (Teil 2)

Substanz	Testmittelpunkt (IC ₅₀) [µg/L]	KR [%]
Bifenthrin 	-	-
Deltamethrin 	-	-
Permethrin 	-	-
cis-PMS 	-	-

Die Testmittelpunkte für trans-PMS und PMS-Glu konnten nicht berechnet werden, da die Datenanpassung zu keinen sinnvollen Ergebnissen führte. Sie wurden daher aus dem Graphen abgeschätzt. Für eine präzisere Abschätzung wurden die Absorptionenwerte nicht als Absolutwerte, sondern normiert aufgetragen (B/B₀).

Die Kreuzreaktivität von PMS-ABA wies den höchsten Wert auf. Dieser Standard wurde von dem Antikörper am besten erkannt. Der Antikörper reagierte ebenfalls gut auf Permethrinsäuremethylester. Trans-Permethrinsäure und Permethrinsäureglucuronid führten erst ab Konzentrationen von 10 µg/L zu einer deutlichen Konkurrenz. Der Meßbereich der Kalibrierfunktionen lag zwischen 100 µg/L und 10 mg/L. Permethrin und cis-Permethrinsäure konnten erst in Konzentrationen größer 1 mg/L den Tracer vom Antikörper verdrängen. Bifenthrin und Deltamethrin wurden vom Antikörper nicht erkannt. Für die vier letztgenannten Werte war es nicht möglich, eine Kreuzreaktivität zu bestimmen, da keine auf den Nullwert bezogene 50 %ige Konkurrenz erreicht wurde.

Die Selektivität des Antikörpers war sehr hoch. Er erkannte fast ausschließlich das zu seiner Herstellung verwendete PMS-ABA. Selbst bei kleinsten Änderungen im Molekül, wie es bei PMS-Me der Fall ist, war die Erkennung schon deutlich schlechter, der typische sigmoidale Kurvenverlauf der Kalibrierfunktion von PMS-ABA ging in eine gleichmäßig abfallende Kurve über. Berechnet man die Kreuzreaktivitäten auf der Basis von PMS-ABA, ergeben sich für trans-PMS und PMS-Glu Werte von 0,86 bzw. 2,5 %. Dies macht deutlich, wie wenig der Antikörper diese beiden Strukturen erkennt und erklärt auch die hohen Konzentrationen, die eingesetzt werden müssen, um eine Konkurrenz zu erreichen.

5 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sollte ein Enzymimmunoassay zum Nachweis des Pyrethroidmetaboliten Permethrinsäure ((1RS)-trans-3-(2,2-Dichlorvinyl)-2,2-dimethylcyclopropancarbonsäure) (PMS) entwickelt werden. Es wurden geeignete Haptene synthetisiert, die zur Herstellung von Hapten-Protein-Konjugaten verwendet wurden. Die Hapten-Protein-Konjugate wurden sowohl für die Produktion der Antikörper, als auch zur Entwicklung des quantitativen Permethrinsäurenachweises eingesetzt.

5.1 Synthese und Charakterisierung von Haptenen und Hapten-Protein-Konjugaten

Der Antikörper ist das selektive Element in einem Immunoassay. Er entscheidet über die Qualität des Tests. Das Problem ist nur: Wie macht man dem Immunsystem des zu immunisierenden Tieres klar, welchen Antikörper es produzieren soll? Aus der Literatur geht hervor, daß die Produktion von Antikörpern in der Praxis weitgehend empirisch verläuft. Immunisierungen mit vorhersehbarem oder auch nur erklärbarem Ergebnis sind mit dem derzeitigen Wissensstand nur selten möglich. Trotz langjähriger Forschung sind aus der Sprache des Immunsystems nur Fragmente bekannt. Es ist nicht genau erforscht, wie die Selektion und Stimulierung von Immunzellen funktioniert. Sicher angenommen werden kann, daß das Immunogen die Information, die Botschaft an das Immunsystem ist. Wenn die Botschaft falsch oder mißverständlich formuliert wird, führt dieses zu einem falschen Ergebnis.

Bei der Herstellung von Antikörpern gegen niedermolekulare Verbindungen wie Permethrinsäure ist zu berücksichtigen, daß diese Substanz wegen ihrer geringen Größe alleine nicht in der Lage ist, in Vertebraten eine Immunantwort auszulösen. Eine wichtige Voraussetzung ist daher die Synthese geeigneter Hapten-Protein-Konjugate für die Immunisierung. Als Carrier zur kovalenten Kopplung von Haptenen eignen sich Proteine von Spezies, die mit dem Antikörperproduzenten nicht verwandt sind. Sie werden von dessen Immunsystem als körperfremd erkannt und können eine Antikörperproduktion induzieren. Die Kopplung eines Haptens an ein Enzym bzw. Protein kann mit diversen Methoden durchgeführt werden. Übersichtsartikel wurden z.B. von Means und Feeney (1990) oder Brinkley (1992) publiziert. Die Kopplung von Permethrinsäure konnte nur über die Carboxylfunktion

als reaktive Gruppe erfolgen, als Kopplungsmethoden kamen die Carbodiimidmethode, die Methode der aktivierten Ester und die Methode der gemischten Anhydride in Frage. Letztere hat sich besonders bei der Kopplung von schwer wasserlöslichen Haptenen bewährt (Erlanger, 1980) und führte auch bei der Kopplung der ebenfalls schlecht wasserlöslichen Permethrinsäure zu guten Ergebnissen. Die nach der Methode der gemischten Anhydride hergestellten Konjugate wiesen dabei die höchsten Haptendichten auf. Auch die Methode der aktivierten Ester wurde erfolgreich angewendet. Die hohe Aminolysierbarkeit der N-Hydroxysuccinimide gegenüber der geringen Hydrolyse- und Alkoholyseempfindlichkeit gestattete es, Peptidsynthesen nicht nur in organischen Lösungsmitteln, sondern auch in wäßrigen Medien wie Ethanol/Wasser, Dioxan/Wasser oder DMSO/Wasser durchzuführen. Ein gewisser Anteil organischen Lösungsmittels erwies sich als notwendig für eine erfolgreiche Kopplungsreaktion. Silberberg (1998) berichtete von erfolglosen Versuchen, Permethrinsäure mit Hilfe der Carbodiimidmethode und der Methode der aktivierten Ester an verschiedene Proteine zu koppeln. Vermutlich war die schlechte Wasserlöslichkeit der Permethrinsäure die Ursache, die zur Präzipitierung führte, bevor eine Reaktion mit dem Protein erfolgen konnte. Eigene Versuche konzentrierten sich daher zunächst darauf, herauszufinden, in welchem Umfang organische Lösungsmittel von den gelösten Proteinen toleriert wurden, ohne daß es zur Denaturierung kam. Es zeigte sich, daß ein Anteil von bis zu 30 % DMF oder DMSO problemlos eingesetzt werden konnte. Bei den Kopplungsreaktionen wurden daher die Proteinlösungen nicht in Wasser, sondern in einem Wasser/DMF- bzw. Wasser/DMSO-Gemisch angesetzt. Auf diese Weise konnten die Kopplungsreaktionen durchgeführt werden, ohne daß es zu Löslichkeitsproblemen kam.

Bei relativ kleinen Molekülen wie Permethrinsäure befindet sich das Hapten sehr dicht am Trägermolekül. Da der Bereich eines Epitops oft größer als das Hapten selbst ist, kann es unter Umständen zur Bildung strukturdiffuser unspezifischer Antikörper kommen. Durch die Einführung eines Spacers zwischen Hapten und Trägerprotein soll der Abstand des Haptens zum Trägerprotein vergrößert werden. Bei der Verwendung eines Spacers können jedoch auch Antikörper gegen den Gesamtbereich Hapten/Spacer gebildet werden. In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben bezüglich einer optimalen Spacerlänge: Hawes et al. (1984) verglichen den Einfluß von C2- bzw. C4-Spacern auf den Antikörpergehalt und erzielten mit C2-Spacern bessere Ergebnisse. Landon und Moffat (1976) dagegen fanden eine Erhöhung der Immunogenität bei der Verwendung von C4-Spacern. Inman et al. (1973) formulierten die These, daß ein längerer Spacer den Einfluß des Trägerproteins reduziert. Um den unterschiedlichen Literaturangaben Rechnung zu tragen, wurden für die Immunisierung Hapten-Protein-Konjugate ohne, sowie mit C4- und mit C6-Spacer synthetisiert. Die Synthese der Spacerkonjugate

wurde zunächst nach einer von Bonwick et al. (1994) beschriebenen Methode durchgeführt. Dieser koppelte in einer zweistufigen Reaktion zunächst den Spacer (4-Aminobutansäure bzw. 6-Aminohexansäure) mit Hilfe der Carbodiimidmethode an das Trägerprotein. Im zweiten Schritt wurde dann das Hapten an den Spacer gekoppelt, wofür wiederum die Carbodiimidmethode verwendet wurde. Bei den so hergestellten Konjugaten war eine einheitliche Bindung des Haptens über den Spacer an das Protein nicht gewährleistet. Es war nicht auszuschließen, daß das Hapten auch direkt an das Protein gebunden worden war.

Zur Synthese einheitlicher Konjugate wurde daher versucht, den Spacer in einer separaten Reaktion an Permethrinsäure zu binden. Dies geschah durch eine modifizierte Schotten-Baumann-Reaktion von 4-Aminobutansäure bzw. 6-Aminohexansäure mit Permethrinsäurechlorid in wäßrigem Alkali. Die erhaltenen Reaktionsprodukte wurden gereinigt und charakterisiert. Anschließend wurden die Kopplungsreaktionen mit dem Trägerprotein durchgeführt.

Als Trägerprotein für die Immunkonjugate wurde KLH eingesetzt. Es wird aus Schnecken gewonnen und bewirkt eine starke Stimulierung des Immunsystems von Säugetieren (Weller, 1992). Seine große Molekülmasse (450 – 13000 kDa) und die hohe Zahl koppelbarer Lysinreste (300-600) machen es zu einem beliebten Trägerprotein (Pierce, 1998).

Die Reinigung der Kopplungsprodukte stellte sich kompliziert dar. Aufgrund ihrer geringen Löslichkeit schied eine Reinigung durch Ultrafiltration oder Gelpermeation aus, da sie zur Verstopfung der Membran oder der Säule geführt hätten. Durchgeführt wurde die Reinigung durch Fällung der Konjugate mit Trichloroessigsäure und anschließendes Waschen des Niederschlags mit Aceton und Wasser. Dies sollte zusätzlich zur Reinigung den Effekt haben, die Tertiärstruktur des Proteins zu verändern, um auch die im Molekülinneren konjugierten unpolaren Haptenmoleküle für die Lymphozyten zugänglich zu machen. Es wurde in Kauf genommen, daß die Konjugate durch den Reinigungsprozeß teilweise unlöslich wurden, da für die Immunisierung selbst die Löslichkeit von weniger großer Bedeutung war und auch mit unlöslichen Konjugaten gute Antikörpertiter erzielt wurden (Schecklies, 1996).

Die Charakterisierung der Immunkonjugate vor der Immunisierung ist von großer Bedeutung, da die Haptendichte des zur Immunisierung verwendeten Konjugats einen Einfluß auf den Antikörpertiter besitzt. Die Immunisierungsdauer beträgt meist einige Monate und stellt bei der Entwicklung von Immunoassays einen erheblichen Zeitfaktor dar. Werden Konjugate eingesetzt, bei denen keine Kopplung stattgefunden hat, oder bei denen nur wenige Haptene kovalent gebunden sind, so kann keine ausreichende Antikörperbildung ausgelöst werden. Wittmann (1991)

konnte durch Verwendung eines Konjugats mit einer Haptendichte von 4 keinen nennenswerten Titer erreichen, während mit einer Haptendichte von 35 ein empfindlicher Test für Atrazin entwickelt werden konnte. Feng et al. (1992) erreichten mit Haptendichten zwischen 11 und 21 brauchbare Titer und einen Testmittelpunkt von 10 µg/L für das Herbizid Amidochlor. Hurn und Chantler (1980) empfehlen für eine erfolgreiche Immunisierung eine möglichst hohe Haptendichte mit molaren Raten zwischen 15 und 30 (Hapten : Carrier), während Erlanger (1980) Haptendichten zwischen 8 und 25 für geeignet hält. Es gibt allerdings auch Hinweise darauf, daß zu hohe Haptendichten ungünstig sein können (Weller, 1992).

Es wurde von mir der Ansatz verfolgt, Immunkonjugate mit einer möglichst hohen Haptendichte zu synthetisieren. Zu diesem Zweck wurde das Hapten in der jeweiligen Reaktion in einem hohen molaren Überschuß eingesetzt. Für die Überprüfung des Kopplungserfolges werden in der Literatur verschiedene Methoden vorgeschlagen. Eine Methode zur Ermittlung der Haptendichte stellt die spektralphotometrische Bestimmung dar (Erlanger et al., 1959). Als Voraussetzung müssen das Carriermolekül sowie das Hapten ein charakteristisches Absorptionsspektrum im UV-Bereich aufweisen. Da dies bei Permethrinsäure nicht gegeben war, schied diese Methode aus. Eine indirekte Bestimmung der angebotenen Haptenmenge kann durch Bestimmung der freien Lysin-Aminogruppen des Trägermoleküls vor und nach einer Kopplungsreaktion mit Trinitrobenzolsulfonsäure erfolgen (Habeeb, 1966). Diese und andere Methoden führen aber, bedingt durch die Tatsache, daß es sich bei dem Trägerprotein KLH um ein nicht genau charakterisierbares Molekül mit einer Molmasse zwischen 450 und 13000 kDa handelt, zu keinen genauen Ergebnissen. Durchgeführt wurde die Charakterisierung schließlich auf zwei verschiedene Weisen. Einerseits wurde der Kopplungserfolg qualitativ durch einen Enzymimmunoassay nachgewiesen. Andererseits konnte durch Hydrolyse der Hapten-Protein-Bindung und anschließender Bestimmung des Haptengehaltes mit Hilfe der GC-MS die Haptendichte abgeschätzt werden. Die dabei erzielten Ergebnisse korrelierten mit den durch den Enzymimmunoassay erhaltenen. Die nach der Methode der aktivierten Ester hergestellten Hapten-Protein-Konjugate wiesen Haptendichten von unter 50 Molekülen Hapten pro Molekül KLH auf, während die Haptendichten bei den nach der Methode der gemischten Anhydride hergestellten Hapten-Protein-Konjugaten mit Raten von über 200 deutlich höher waren.

5.2 Immunisierung und Antiseren

Die Auswahl der Tierart und Rasse erfolgte nach praktischen Erwägungen. In der vorliegenden Arbeit wurden Kaninchen der Rasse „White New Zealand“ gewählt. Sie waren leicht zu halten und lieferten eine ausreichende Menge Serum. Zur Unterstützung der immunogenen Wirkung der Immunkonjugate erfolgten die Immunisierungen als Emulsion, bei der das Immunkonjugat in physiologischer Kochsalzlösung mit Freund's Adjuvans (Freund und McDermont, 1942) emulgiert wurde. Man unterscheidet zwischen komplettem Freund'schen Adjuvans (cFA) und inkomplettem Freund'schen Adjuvans (iFA). Das cFA besteht aus abgetöteten Bakterien (*Mycobacterium tuberculosis*), Mineralöl und einem Emulgator, beim iFA fehlen die Bakterien. Die Emulsion zwischen Immunogen und Mineralöl erzeugt nach einer subkutanen Injektion ein Depot, aus dem das Immunogen langsam in den Tierkörper freigesetzt wird. Durch die Bakterien kommt es zu einer allgemeinen Verstärkung der Immunantwort (Roitt, 1988). Freund's Adjuvans kann allerdings bei Versuchstieren Entzündungen an der Injektionsstelle, Fieber und Granulombildung verursachen (Price und Newman, 1997). Neuere synthetische Adjuvantien wie z.B. Titermax® bestehen aus nichtionischen Detergenzien, die aus Block-Copolymeren in metabolisierbaren Ölen bestehen. Diese zeigten bei guter Immunstimulation weniger unerwünschte Nebenwirkungen als Freund's Adjuvans (Bennett et al., 1992; Nicklas, 1993). Auch Aluminiumhydroxid und methyliertes BSA wurden schon vor längerer Zeit als Adjuvans beschrieben. Trotzdem haben sie das Freund's Adjuvans nicht verdrängen können.

Die Zahl der in der Literatur beschriebenen Immunisierungsschemata ist etwa so groß wie die Zahl der Autoren, und oft ist die verwendete Technik „Geheimrezept“ des Experimentators und beruht im allgemeinen auf langjährigen Erfahrungen. Allen gemeinsam ist lediglich die Unterteilung in Grundimmunisierung und Boosterinjektionen. Strobach (1994) empfiehlt eine dreiwöchige Grundimmunisierung mit täglichen Injektionen und daran anschließend Boosterinjektionen über einen Zeitraum von 2 bis 4 Monaten mit wöchentlichen Injektionen. Queffelec et al. (1998) haben mit einer einmaligen Grundimmunisierung und 3 Boosterinjektionen in zweiwöchigem Abstand gute Ergebnisse erzielt. Die Firma EUROGENTEC in Belgien, die seit mehreren Jahren Auftragsimmunisierungen durchführt und bei der auch für diese Arbeit zwei Kaninchen immunisiert wurden, führt nach einer einmaligen Grundimmunisierung 3 Boosterinjektionen nach 2, 4 und 8 Wochen durch. Da auf keine eigenen Erfahrungen zurückgegriffen werden konnte, wurde dieses Immunisierungsschema übernommen.

Ein Blick auf den zeitlichen Verlauf der Immunantwort zeigt, daß es in allen Fällen gelungen ist, selektive Antikörper in den Kaninchen zu erzeugen. Das Ausmaß der Antikörperbildung war aber sehr unterschiedlich und macht einmal mehr deutlich, wie unterschiedlich die Immunantwort ausfallen kann. So war der Antikörpertiter von Kaninchen C viermal so hoch wie der des Kaninchens A. Die Angabe des Titers ist allerdings nur bedingt für die Beurteilung der Antikörper geeignet und sollte lediglich als ein Maß für die Quantität verstanden werden. Wie sich im späteren Verlauf der Arbeit zeigte, waren die Antikörper des Kaninchens A allen anderen Antikörpern in puncto Sensitivität überlegen und lieferten trotz des geringen Titers die besten Testergebnisse. Kaninchen B, das mit dem gleichen Hapten-Protein-Konjugat immunisiert worden war, lieferte dagegen keine sensitiven Antikörper. Das bestätigt die Tatsache, daß verschiedene Versuchstiere der gleichen Rasse unter identischen Bedingungen unterschiedliche Antikörper gegen dasselbe Hapten-Protein-Konjugat bilden und wie wenig vorhersagbar die Immunantwort ist. Eine Abhängigkeit zwischen der Struktur des zur Immunisierung eingesetzten Hapten-Protein-Konjugats und dem daraus resultierenden Antikörper konnte aufgrund der geringen Anzahl immunisierter Kaninchen nicht ausgemacht werden. Auch der Einfluß der Haptendichte auf den Erfolg der Immunisierung ließ sich nicht bestimmen. Antikörper A, der aus der Immunisierung mit einem Hapten-Protein-Konjugat mit niedriger Haptendichte hervorgegangen war, zeigte ähnliche Sensitivität wie Antikörper C, der aus der Immunisierung mit einem Hapten-Protein-Konjugat mit hoher Haptendichte resultierte.

5.3 Entwicklung des Enzymimmunoassays

5.3.1 Indirektes Testformat

Die Bemühungen zur Entwicklung eines Testsystems konzentrierten sich zunächst auf das indirekte Testformat. Dazu wurde ein Hapten-Protein-Konjugat benötigt, welches auf der Mikrotiterplatte immobilisiert werden mußte. Dieses Hapten-Protein-Konjugat wurde nach derselben Methode (Methode der gemischten Anhydride) hergestellt, wie die zur Immunisierung verwendeten Konjugate. Da davon auszugehen war, daß während der Immunisierung nicht nur Antikörper gegen das Hapten, sondern auch gegen das Trägerprotein gebildet worden waren, mußte ein anderes Protein für die Synthese verwendet werden. Versuche mit Rindersealbumin (BSA) und Ovalbumin (OVA) zeigten, daß die mit Rindersealbumin hergestellten Konjugate eine bessere Löslichkeit aufwiesen. Es wurde da-

her ein PMS-BSA-Konjugat für die Beschichtung der Mikrotiterplatte verwendet. Nach der Immunisierung standen acht Antiseren zur Verfügung. Jedes Serum wurde genauer charakterisiert. Zunächst wurden die Reaktionen der einzelnen Seren mit dem Beschichtungskonjugat untersucht. Gleichzeitig wurde ein Kontrollkonjugat mitgetestet, das nach den gleichen Bedingungen wie das Beschichtungskonjugat hergestellt worden war, allerdings kein Hapten enthielt. Es sollte damit die Beobachtung von Gendloff et al. (1986) überprüft werden, die beobachtet hatten, daß Antikörper, die nach der Methode der gemischten Anhydride hergestellt worden waren, keine Inhibition durch Haptene zeigten, wenn auch das Beschichtungskonjugat nach dieser Methode hergestellt worden war. Als Erklärung gaben sie das Vorhandensein von störenden Antikörpern an, die durch die Kopplungsreaktion bedingt waren. Ergebnis der eigenen Untersuchungen war, daß alle Antikörper das Beschichtungskonjugat erkannten. Die Reaktionen auf das Kontrollkonjugat lagen in allen Fällen im Bereich unspezifischer Bindungen. Nicht umgesetztes, natives Rinderserumalbumin wurde von keinem Antikörper erkannt.

Nach der Synthese des Beschichtungskonjugats mußten die Arbeitsverdünnungen im ELISA ermittelt werden. Als Methode wurde eine Schachbrett-Titration verwendet (Crowther, 1995; Müller-Esterl, 1986). Es wurden dabei sechs verschiedene Konzentrationen des Beschichtungskonjugats gegen acht verschiedene Antikörperverdünnungen getestet. Als geeignete Kombinationen wurden solche mit einer Extinktion von 0,8 bis 1 angesehen. Im Anschluß daran wurden erste Kompetitionsversuche mit trans-Permethrinsäure durchgeführt. Es zeigte sich, daß keines der Antiseren die freie Permethrinsäure erkannte. Selbst Konzentrationen von 10 mg/L führten nur zu einem minimalen Rückgang der Extinktionen.

Bei der Suche nach den Ursachen der mangelhaften Kompetition wurden zunächst äußere Faktoren wie z.B. die Inkubationstemperatur verändert. Geprüft wurde, ob eine Durchführung der Inkubation bei 37 °C statt bei Raumtemperatur zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der freien Permethrinsäure und damit zu einer Verbesserung der Kompetition führte. Dies war leider bei keinem der Antiseren der Fall. Es konnte lediglich eine durchgehende Erhöhung der Extinktion beobachtet werden. Diese könnte darauf zurückzuführen sein, daß bei höheren Temperaturen eine größere Anzahl peroxidasemarkierter anti-Kaninchen-Antikörper gebunden wird.

Ein weiterer Punkt war die Variation des pH-Wertes. Permethrinsäure ist eine dissoziierende Verbindung, die bei physiologischen Bedingungen zum überwiegenden Teil als Carboxylat vorliegt. Es war zu vermuten, daß der Ladungszustand des Moleküls die Erkennung durch den Antikörper beeinflussen würde. Durch die Kopplung an ein Protein oder eine Spacergruppe wurde das geladene Carboxylat-

Anion in ein neutrales Amid verwandelt. Damit war der Ladungszustand von Hapten und Analyt nicht mehr identisch, was Auswirkungen auf die Antigen-Antikörper-Reaktion hatte. Weiler und Wieczorek (1981) koppelten für die Entwicklung eines Radioimmunoassays Gibberellinsäure über die Carboxylfunktion an ein Protein. Sie stellten fest, daß die Bindung der Gibberellinsäure bei niedrigem pH-Wert stärker wurde, was mit der Protonierung des Carboxylats erklärt werden konnte. Die ungeladene Carbonsäure ähnelte dem Immunogen mehr als das Carboxylat-Anion. Der ungeladene Methylester wurde über 100fach empfindlicher detektiert als die freie Säure.

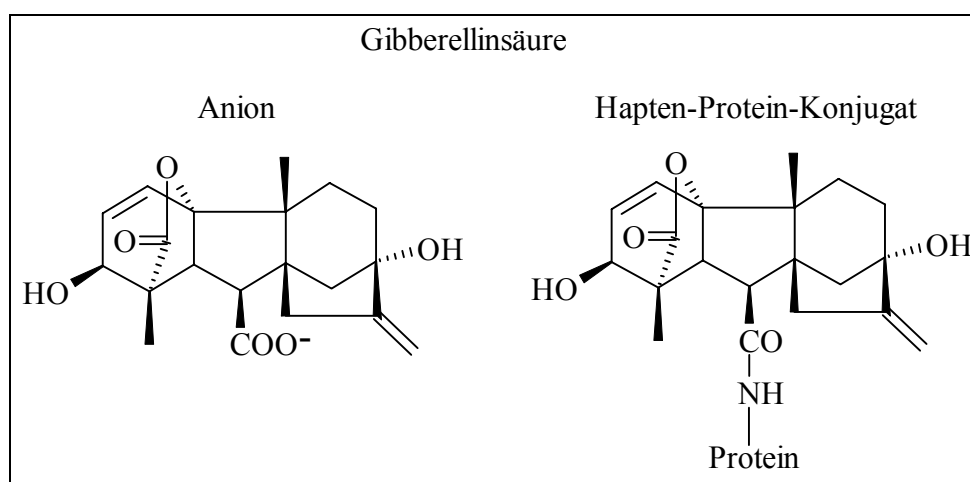


Abbildung 44: Struktur von Gibberellinsäure

Die gleichen Probleme traten bei der Herstellung von Immunoassays für Chlorphenoxyalkancarbonsäuren auf (z.B. 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure oder 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure). Hier wurde zur Herstellung von Hapten-Carrier-Konjugaten fast immer an der stark aciden ($pK_A = 2,64$) Carbonsäure gekoppelt (Knopp et al., 1985). So erhielt man relativ unempfindliche Tests, die hohe Kreuzreaktionen gegen die analogen Ester bzw. Amide aufwiesen (Matuszczyk et al., 1996; Razak et al., 1998). Eigene Untersuchungen bestätigten, daß eine Absenkung des pH-Wertes die Erkennung der Permethrinsäure verbesserte. Dies galt allerdings nur für die Antiseren C und G und auch bei diesen war der Effekt nur schwach ausgeprägt. Bei den anderen Antiseren wurde der Effekt möglicherweise durch unspezifische Bindungen überlagert. Ein Absenken des pH-Wertes unter 4 führte zu einem so starken Rückgang der Extinktion, daß von einer Denaturierung des Antikörpers ausgegangen werden mußte. Dies stand im Einklang mit Beobachtungen von Yarmush et al. (1992), nach der pH-Werte von 2 oder 3 eine Bindung zwischen Antikörper und Antigen verhindern bzw. brechen können.

Durch die Einführung eines zusätzlichen Blockingschrittes nach der Immobilisierung des Coatingantigens sollte überprüft werden, ob eventuell vorhandene unspezifische Bindungen für die mangelnde Konkurrenz verantwortlich waren und

durch das Blocking zurückgedrängt werden konnten. Es werden diverse Reagenzien in der Literatur beschrieben, wobei Rinderserumalbumin das gängigste zu sein scheint (Law, 1996). In verschiedenen Veröffentlichungen wird Casein als das effektivste Blockingreagenz beschrieben (Kenna et al., 1985; Pratt und Roser, 1997; Robertson et al., 1985). Eigene Untersuchungen wurden mit Rinderserumalbumin, Casein, Humanserum und Magermilchpulver durchgeführt. Es zeigte sich, daß keines der Blockingreagenzien zu einer signifikanten Verbesserung der Sensitivität im ELISA führte. Die Unterschiede zu einem ohne Blockingschritt durchgeführten ELISA waren minimal. Ähnliche Beobachtungen wurden von Weller (1992) gemacht, der einen ELISA zum Nachweis von Terbutylazin beschrieb und herausfand, daß sich weder Empfindlichkeit, noch Reproduzierbarkeit durch Blocking signifikant verbessern ließen. Es bestand zwar immer noch die Möglichkeit, daß die getesteten Blockingreagenzien ungeeignet waren, aber die bisherigen Ergebnisse ließen unspezifische Bindungen als Ursache für die mangelnde Konkurrenz unwahrscheinlich erscheinen.

Nachdem es nicht gelungen war, durch Veränderung äußerer Faktoren wie Temperatur, pH-Wert oder Blockingreagenzien eine Verbesserung der Empfindlichkeit zu erzielen, konzentrierten sich die weiteren Bemühungen auf die Antigen-Antikörper-Bindung. Zunächst wurde auf Ergebnisse von Gendloff et al. (1986) zurückgegriffen, nach der bei Kopplungsreaktionen mit der Methode der gemischten Anhydride durch die Kopplungsreaktion bedingte antigene Strukturen entstehen, die eine Inhibition durch Haptene verhindern, wenn auch das Beschichtungskonjugat nach derselben Kopplungsmethode hergestellt wurde. Dieser Beobachtung war zwar schon durch die Synthese eines Kontrollkonjugats Rechnung getragen worden, aber um letzte Zweifel auszuräumen, wurden neue Beschichtungskonjugate nach einer anderen Methode hergestellt. Es handelte sich dabei um die Methode der aktivierten Ester. Von den sechs neu hergestellten Konjugaten zeigte keines eine Verbesserung der Empfindlichkeit. Damit war die Hypothese, daß durch die Kopplungsreaktion bedingte Antikörper den Test störten, widerlegt.

Ein nächster Versuch, die Empfindlichkeit zu erhöhen, war die Synthese von Beschichtungskonjugaten mit geringer Haptendichte. Dies geschah vor dem Hintergrund, daß jeder Antikörper zwei mögliche Antigenbindungsstellen besitzt und daher ein bivalenter Mechanismus möglich ist.

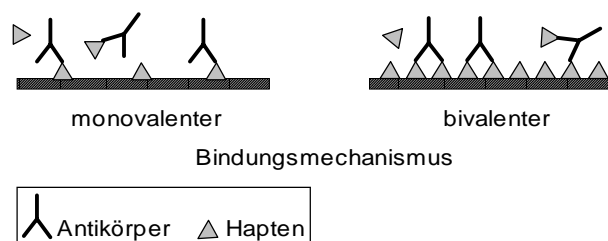


Abbildung 45: Mono- und bivalenter Bindungsmechanismus von Antikörpern

Wenn der Antikörper gleichzeitig an zwei verschiedene Haptene eines Hapten-Protein-Konjugats bindet, ist die Wahrscheinlichkeit der gleichzeitigen Lösung dieser Bindung durch den Analyten sehr viel geringer, als wenn der Antikörper nur monovalent, d.h. an ein Hapten gebunden wäre. Mit anderen Worten, die Antikörper würden bei einem bivalenten Mechanismus mit wesentlich höheren Affinitäten gebunden als bei einem monovalenten. Die Wahrscheinlichkeit eines bivalenten Mechanismus steigt mit zunehmender Haptendichte. Um dieses zu verhindern, mußte ein der Synthese der Immunkonjugate gegensätzliches Ziel verfolgt werden, nämlich die Synthese von Konjugaten mit einer möglichst geringen Haptendichte. Gerdes et al. (1999) konnten an einem ELISA zum Nachweis von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure zeigen, daß die monovalenten Antikörperfragmente einen zehnfach empfindlicheren Test ermöglichten als der bivalente Antikörper. Daneben zeigte sich bei den monovalenten Antikörperfragmenten, im Gegensatz zu den bivalenten Antikörpern, keine Veränderung der Empfindlichkeit bei einer Zunahme der Haptendichte des Beschichtungskonjugats. Durch die Synthese neuer Beschichtungskonjugate mit geringer Haptendichte sollte überprüft werden, ob mögliche bivalente Bindungsmechanismen zurückgedrängt werden konnten und eine Steigerung der Empfindlichkeit möglich war. Es war aber bei keinem der neuen Konjugate eine Verbesserung der Kompetition zu erkennen. Es mußte nach anderen Möglichkeiten gesucht werden, um die Erkennung des Analyten zu verbessern.

Die bisherigen Erkenntnisse deuteten darauf hin, daß die Affinität der Antikörper zum jeweiligen Antigen höher war als zur freien Permethrinsäure, so daß diese nicht in der Lage war, daß Antigen aus seiner Bindung zum Antikörper zu verdrängen. Erklärt werden könnte dies dadurch, daß die Antikörper nicht nur das Hapten erkennen, sondern einen Komplex aus Hapten und Lysinrest, über den an das Trägerprotein gekoppelt wurde (Danilova, 1994). In diesem Zusammenhang ist die Größe der Antigenbindungsstellen interessant. Nach Stryer (1991) liegen sie im Nanometerbereich. Etwas genauere Angaben findet man bei Price (1998), der die Größe eines Epitops mit 3-5 Aminosäureresten entsprechend einer Haptengröße zwischen 300 und 500 Dalton angibt. Beide Literaturquellen legten die Vermutung nahe, daß auch im Fall der Permethrinsäure die Antigenbindungsstelle größer als der Targetanalyt war. Es mußte daher versucht werden, die Ähnlichkeit

und damit die Affinität des Analyten zum Immunisierungskonjugat zu erhöhen und gleichzeitig die Antikörperaffinität zum Beschichtungskonjugat zu verringern. Versuche, die Affinität des Analyten durch Verringerung des pH-Wertes zu erhöhen, hatten nicht den gewünschten Erfolg. Die Senkung der Antikörperaffinität zum Beschichtungskonjugat konnte nur durch die Synthese eines neuartigen Haptens realisiert werden. Dieses sollte sich in zwei wesentlichen Punkten von den bisherigen Hapten-Spacer-Konjugaten unterscheiden. Die Verknüpfung zwischen Permethrinsäure und Spacer sollte nicht wie bisher durch eine Amidbindung, sondern durch eine Esterbindung erfolgen. Zusätzlich sollte der Spacer eine sperrige Komponente enthalten, die eine Erkennung durch den Antikörper erschweren und damit eine Verdrängung durch Permethrinsäure erleichtern sollte. Die Anforderungen wurden durch die Veresterung von Permethrinsäure mit p-Hydroxyphenylelessigsäure erfüllt. Die Amidbindung wurde durch eine Esterbindung ersetzt und ein Benzolring zwischen Permethrinsäure und dem Trägerprotein eingefügt. Die Kopplung des neuen Haptens an das Trägerprotein erfolgte nach der bewährten Methode der aktivierten Ester. Der anschließende ELISA zeigte, daß es gelungen war, die Affinität der Antikörper zum neuen Hapten-Protein-Konjugat deutlich zu senken. Deutlich wird dies dadurch, daß eine zehnfach höhere Antikörperkonzentration nötig war, um eine mit vorangegangenen Tests vergleichbare Extinktion zu erzielen. Trotz der Verringerung der Affinität zum Beschichtungskonjugat kam es nicht zu einer Kompetition. Offensichtlich war die Affinität der freien Permethrinsäure immer noch sehr viel geringer, als die der über eine Spacergruppe oder ein Trägerprotein gebundenen.

Die Unterschiede in der Extinktion zwischen den ELISAs, die mit den „normalen“ Beschichtungskonjugaten (mit C4- oder C6-Spacer) durchgeführt worden waren und dem ELISA mit dem neu synthetisierten Spacer (mit Benzolring) zeigten, daß die Antiseren nicht nur einen Antikörper enthielten (Polyklonalität). Es waren verschiedene Antikörperpopulationen vorhanden, die unterschiedliche Bereiche des Antigens erkannten. Somit könnten Antikörper vorhanden sein, die nur die Permethrinsäure erkennen, solche, die Permethrinsäure und Spacer erkennen, aber auch solche, die vielleicht nur den Spacer erkennen. Diese sogenannten Brückenantikörper, im englischen Sprachraum als „Spacer Recognition“, „Bridging Group Recognition“, „Handle Recognition“ oder „Bridge Binding“ bezeichnet, werden häufig für Mißerfolge im Immunoassay-Bereich verantwortlich gemacht (Bachas und Meyerhoff, 1986; Weiler, 1989). Es handelt sich dabei um die Beobachtung, daß Haptene, die zur besseren Präsentation mit einem Spacer versehen wurden, zwar gut bindende Antikörper ergeben, daß aber das Derivat mit Spacer wesentlich besser gebunden wird als der Analyt. Durch eine affinitätschromatographische Reinigung der Antiseren sollte versucht werden, Brückenantikörper zu entfernen und dadurch die Antikörperfraktion zu isolieren, die nur die Permethrin-

säure, nicht aber den Spacer erkannte. Choi et al. (1999) konnten durch die affinitätschromatographische Reinigung des Antiserums die Nachweisgrenze eines ELISAs für Methamphetamin deutlich steigern, während Weller (1992) der Meinung ist, daß die Affinitätschromatographie bei Hapten-Immunoassays nur unbedeutenden Erfolg habe, da man keine besseren Antikörper isolieren könne, als im Serum vorhanden seien. Er ließ dabei aber außer Acht, daß auch durch die Abtrennung störender Antikörper eine Verbesserung der Sensitivität erreicht werden kann. Für die eigenen Versuche wurde als Trägermaterial ein Agarosegel verwendet, an das Permethrinsäure über im Gel vorhandene Spacergruppen kovalent gebunden wurde (Amersham et al., 1999). Die Bindung erfolgte durch Reaktion mit einer primären Aminogruppe. Nach der Inkubation des Antiserums auf der Säule wurde durch Elution mit verschiedenen Puffern und Lösungen versucht, die spezifische Fraktion zu eluieren (Harlow und Lane, 1999). Dies gelang durch die Elution mit einem Glycinpuffer pH 2,5. Das Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen zum Einfluß des pH-Wertes im ELISA (siehe Seite 84), wonach bereits ein pH-Wert von 3 einen deutlichen Rückgang der Extinktion bewirkte, was auf eine Beeinträchtigung der Antigen-Antikörper-Bindung zurückgeführt worden war. Neben den Antiseren C und G wurden auch die Antiseren A und B affinitätschromatographisch gereinigt. Beide Antiseren waren bisher durch einen sehr geringen Titer aufgefallen, der sie für eine Verwendung im ELISA ungeeignet erscheinen ließ. Durch die affinitätschromatographische Reinigung konnten bei Antiserum B keine spezifischen Permethrinsäureantikörper isoliert werden, während dies bei Antiserum A gelang. Gleichzeitig war die Reinigung mit einer Aufkonzentrierung der Antikörperpopulation verbunden, so daß Antiserum A im ELISA eingesetzt werden konnte. In weiteren Tests wurde überprüft, ob die affinitätschromatographisch gereinigten Seren eine Verbesserung der Empfindlichkeit im ELISA bewirken konnten.

Als Standard wurde in diesen Tests erstmals Permethrinsäureglucuronid eingesetzt. Dieses war synthetisiert worden, da es den Anschein hatte, daß es für die Erkennung des Analyten durch den Antikörper von entscheidender Bedeutung war, daß der Analyt (die Permethrinsäure) nicht in freier Form als Säure, sondern in Form eines Esters oder Amids dem Antikörper präsentiert wurde. Da Permethrinsäure im Urin nicht nur als freie Säure, sondern auch als Glucuronid, Sulfat oder in anderer Form konjugiert vorliegt, könnte man auch über eine Bestimmung des Gehalts an Permethrinsäureglucuronid eine Quantifizierung vornehmen (Eadsforth et al., 1988).

Die Ergebnisse der Tests mit den Kompetitoren Permethrinsäureglucuronid (PMS-Glu) und PMS-ABA machten mehrere Dinge deutlich. Die besten Ergebnisse wurden mit den Antiseren A3 affi und C3 affi erzielt. Alle Antiseren zeigten mit PMS-ABA als Standard die größte Konkurrenz. Eine Konzentration dieses

Standards von 1 mg/L reichte aus, um den Antikörper fast vollständig vom Beschichtungskonjugat PMS-pOHPE-BSA zu verdrängen. Es war also prinzipiell möglich, die Extinktion durch Zugabe eines Standards zu reduzieren, ein weiterer Beweis, daß nicht unspezifische Bindungen die Ursache für die mangelnde Konkurrenz waren. Die Tatsache, daß PMS-ABA von allen Antiseren am besten erkannt wurde, erklärte sich dadurch, daß seine Struktur identisch mit der zur Immunisierung verwendeten war. Aber selbst mit diesem Standard trat bei einer Konzentration von 1 µg/L noch keine sichtbare Konkurrenz ein. Offensichtlich mangelte es den Antikörpern generell an Empfindlichkeit, oder es waren, trotz affinitätschromatographischer Reinigung der Antiseren, weiterhin Brückenantikörper vorhanden, die eine empfindlichere Erkennung der Standards verhinderten. Die Erkennung des Glucuronids durch die Antikörper war sehr viel geringer als erwartet und nicht wesentlich besser als die der freien Permethrinsäure. Dabei müßte der Ladungszustand der glucuronidierten Permethrinsäure ungefähr gleich sein mit dem der über eine Amidbindung verknüpften. Dieser Umstand schien in diesem Fall nicht so sehr zur Erkennung des Analyten beizutragen, wie der sperrige Glucuronsäurerest. Letztendlich konnte weder durch die affinitätschromatographische Reinigung der Antiseren, noch durch den Einsatz von Permethrinsäureglucuronid als Standard, eine entscheidende Verbesserung der Empfindlichkeit im ELISA erzielt werden.

Nur kurz erwähnt werden soll der Versuch, die Haptene kovalent an eine Mikrotiterplatte zu koppeln, um damit einen ELISA aufzubauen. Sondergard-Andersen et al. (1990) und Yonezawa et al. (1993) haben mit dieser Methode gute Ergebnisse erzielt. Vorteile dieser Technik sind zum einen der Verzicht auf die Synthese eines Beschichtungskonjugats. Damit vermeidet man die Verwendung eines Trägerproteins und kann potentielle unspezifische Bindungen, die den Test stören, unterdrücken. Ein weiterer Vorteil könnte die mehrfache Verwendung dieser Mikrotiterplatten sein. Dies sollte durch die kovalente Bindung des Haptens und geeigneten Waschschritten möglich sein, wurde bisher allerdings nicht näher untersucht. Eigene Versuche in diese Richtung zeigten, daß auch nach mehrfacher Verwendung der Mikrotiterplatte kein Verlust der Aktivität festzustellen war. Mit den kovalent gekoppelten Haptenen konnten aber keine besseren Ergebnisse erzielt werden als mit der bisherigen Methode. Daher wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt, nicht zuletzt deshalb, weil die Kosten für die speziellen Mikrotiterplatten einen routinemäßigen Einsatz des Tests unwirtschaftlich gemacht hätten.

Ebenfalls nur erwähnt werden soll eine Methode von Hofstetter et al. (1997), der die direkte Immobilisierung von Haptenen mit kleinem Molekulargewicht auf Mikrotiterplatten beschreibt. Der Mechanismus der Bindung zwischen Hapten und Polystyrolplatte ist noch unbekannt. Der Versuch, Permethrin auf einer Mi-

krotiterplatte zu immobilisieren, scheiterte allerdings, so daß dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

5.3.2 Direktes Testformat

Neben dem indirekten Testformat, bei dem ein Hapten-Protein-Konjugat auf der Mikrotiterplatte immobilisiert wird, gibt es auch die Möglichkeit, den Antikörper auf der Mikrotiterplatte zu immobilisieren. Diese Variante des ELISAs bietet Vorteile gegenüber dem indirekten ELISA in puncto Schnelligkeit der Testdurchführung, da ein ganzer Arbeitsschritt weniger durchzuführen ist (die Inkubation eines Sekundärantikörpers). Zudem ist es günstiger, daß größte Reagenzmolekül zu immobilisieren, da andernfalls verstärkt Diffusionsprobleme auftreten können (Antikörper 150 kDa gegenüber Peroxidase 40 kDa). Als Nachteil muß der direkte Kontakt des Enzyms mit der zu untersuchenden Probe genannt werden. Bestimmte Probenmatrizes könnten zu einer Beeinträchtigung der Enzymaktivität und damit zu einer Verfälschung der Testergebnisse führen. Voraussetzung für die Durchführung des direkten ELISAs war die Herstellung von permethrinsäuremarkierter Peroxidase (Tracer). Es wurden insgesamt vier verschiedene Tracer synthetisiert und auf ihre Funktionstüchtigkeit im ELISA untersucht. Sie entstanden durch die Kopplung der Permethrinsäure und ihrer drei zuvor hergestellten Derivate an Peroxidase. Die Reaktion erfolgte nach der bewährten Methode der aktivierten Ester, bei der es sich um ein so schonendes Verfahren handelt, daß die Enzymaktivität der Peroxidase erhalten bleibt. Peroxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) wird sehr oft in Enzymimmunoassays eingesetzt (Wisdom, 1976). Es ist deswegen so beliebt, weil es hohe Aktivität und Reinheit, einen günstigen Preis und überdurchschnittliche Stabilität bietet. In einem Vergleich der gebräuchlichsten Enzyme für Enzymimmunoassays kamen Sauer et al. (1989) zu dem Ergebnis, daß die Verwendung von Peroxidase zu den Tests mit der größten Empfindlichkeit führte. Begründet wurde dieses Resultat zum einen mit dem hohen Substratumsatz und zum anderen mit der geringen Zahl der zur Kopplung zur Verfügung stehenden Lysinreste (Welinder, 1976). Peroxidase hat nur 1 – 3 derivatisierbare Aminogruppen. Durch die geringe Haptendichte besteht nicht die Gefahr einer multivalenten Bindung der Tracer und damit einer Erhöhung ihrer Affinität. Des weiteren kann man bei der Synthese mit einem fast beliebigen Überschuß an Kopplungsreagenz arbeiten und erhält dennoch ein weitgehend quantitativ und einheitlich derivatisiertes Enzym.

Nach dem Screening aller Tracer wurde die beste Kombination aus Antikörper und Tracer ausgewählt und verschiedenen Optimierungsversuchen unterzogen. Als beste Kombination erwiesen sich Antikörper A3 affi und Tracer PMS-

pOHPE-HRP. Letztgenannter war der Tracer mit der geringsten Affinität zum Antikörper. Dadurch konnte er am leichtesten von dem Analyten verdrängt werden und so einen empfindlicheren Nachweis des Analyten ermöglichen. Bachas und Meyerhoff (1986) hatten mit dem Konzept der Reduzierung der Affinität des Antikörpers zum Tracer zur Erhöhung der Testempfindlichkeit ebenfalls gute Erfolge erzielt. Bei der Beschichtung der Mikrotiterplatte werden die Antikörper willkürlich durch adsorptive Kräfte in den Kavitäten gebunden. Dabei gehen nicht nur viele Antikörper verloren, es können auch Antigenbindungsstellen so ausgerichtet werden, daß sie für eine Antigen-Antikörper-Reaktion nicht mehr zur Verfügung stehen (Lu et al., 1996). Um eine gerichtete Bindung der Antikörper mit freien Bindungsstellen zu erzielen, wurde die Mikrotiterplatte mit Protein A vorbebeschichtet. Das Polypeptid mit einer Molekülmasse von 42000 Da ist ein Bestandteil der Zellwandproteine von *Staphylococcus aureus* und hat die Eigenschaft, spezifisch an die F_C-Domäne von Antikörpern bestimmter Spezies, darunter Kaninchen, zu binden. Neben der Vorbeschichtung mit Protein A wurde auch überprüft, welche Ergebnisse mit einem anti-Kaninchen-Antikörper als Vorbeschichtung erzielt werden konnten. Es zeigte sich, daß beide Verfahren einer direkten Immobilisierung des Antikörpers auf der Mikrotiterplatte deutlich überlegen waren. Protein A zeigte dabei im Vergleich zum anti-Kaninchen-Antikörper eine etwas bessere Empfindlichkeit und wurde daher in allen weiteren ELISAs eingesetzt. Auch Zherdev (1999) beschrieb Protein A als das am effektivsten wirksame Reagenz zur Immobilisierung von Antikörpern.

Die Maßnahmen zur Optimierung des direkten ELISAs unterschieden sich nicht wesentlich von denen, die beim indirekten ELISA angewandt worden waren. Alle Optimierungsversuche wurden mit Permethrinsäureglucuronid als Standard durchgeführt. Nach der Auswahl einer geeigneten Kombination aus Antikörper- und Tracerverdünnung wurden die Inkubationszeiten optimiert. Von entscheidender Bedeutung war dabei die Tracerinkubationszeit. In Abbildung 38 (Seite 69) ist der Einfluß einer Verkürzung der Tracerinkubationszeit dargestellt. Es war offensichtlich, daß eine Verkürzung der Inkubationszeit eine Verbesserung der Empfindlichkeit des Tests zur Folge hatte. Rodbard et al. (1971) gaben eine plausible Erklärung für dieses Phänomen, die auf der Polyklonalität des Antiserums beruhte. Das Antiserum enthält Antikörper unterschiedlicher Affinität. Binden niedrigaffine Antikörper Tracermoleküle nicht lange genug, um eine gute Adsorption an der Platte zu erreichen, so haben die hochaffinen Antikörper anfangs einen Vorsprung. Sie würden den Testmittelpunkt bestimmen. Später jedoch würde die schwache Bindung des Tracers zur Bindung an der Platte ausreichen. Auf diese Weise würden andere, häufigere Antikörperfraktionen mit geringeren Affinitäten die Oberhand gewinnen. Dies hätte eine kontinuierliche Verschiebung des Testmittelpunktes zur Folge, wie sie auch beobachtet wurde. Die Verkürzung der Tra-

cerinkubationszeiten hatte allerdings seine Grenzen. Einerseits ging mit zunehmender Verkürzung der Inkubationszeit eine Abnahme der Signalintensität einher. Andererseits nahm die Aufgabe der Proben und Standards eine bestimmte Zeit in Anspruch und war in erster Linie vom Geschick und der Ausrüstung des Anwenders abhängig. Also mußte im Rahmen dieser Arbeit ein Kompromiß zwischen Sensitivität auf der einen Seite und ausreichender Signalintensität sowie Durchführbarkeit auf der anderen Seite gesucht werden. Dieser wurde in einer Tracerinkubationszeit von einer Stunde gefunden.

Alle Optimierungsversuche ließen den Schluß zu, daß mit dem direkten Testformat des ELISAs ein Nachweis von Permethrinsäureglucuronid in einem Konzentrationsbereich zwischen $1\mu\text{g/L}$ und 10 mg/L möglich war. Bei den abschließenden Untersuchungen traten allerdings unerwartete Probleme auf. Der frisch angesetzte Glucuronidstandard wurde von dem Antikörper deutlich schlechter erkannt, als dies im Laufe der Optimierung der Fall gewesen war. Erst ab Konzentrationen größer $100\mu\text{g/L}$ kam es zu einem deutlichen Rückgang der Extinktion. Dies legte den Schluß nahe, daß der bei den Optimierungsversuchen eingesetzte Standard neben Permethrinsäureglucuronid eine weitere Substanz enthalten haben mußte, die der eigentliche Grund für den Rückgang der Extinktion war. Der direkte Vergleich der Substanzen Permethrinsäure, Permethrinsäuremethylester sowie des „alten“ und des frisch angesetzten Permethrinsäureglucuronids bestätigte erste Vermutungen, daß es sich bei der gesuchten Substanz um einen Permethrinsäureester handeln könnte, welcher durch Umesterung in der ethanolischen Stammlösung im Laufe der Lagerung entstanden sein könnte. Die Kompetitionskurven des „alten“ Glucuronidstandards und des Methylesters wiesen große Übereinstimmungen auf. Es hatte den Anschein, daß während der Lagerung des Glucuronidstandards in Ethanol eine Umesterung mit dem Lösungsmittel stattgefunden hatte. Diese These wird durch eine Veröffentlichung von Panfil gestützt, der von einer schnellen Umesterung von Acyl-Glucuroniden in Methanol berichtet (Panfil et al., 1992). Zur endgültigen Klärung dieser Frage wurde ein CI-Massenspektrum der Probe aufgenommen, mit dessen Hilfe die Anwesenheit von Permethrinsäureethylester eindeutig bewiesen werden konnte.

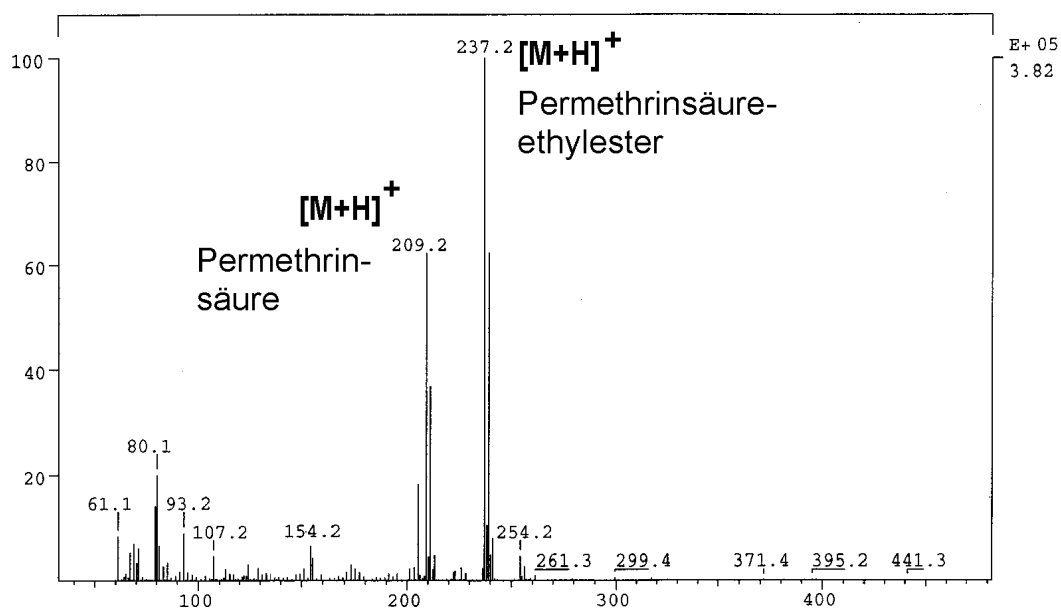


Abbildung 46: CI-Massenspektrum des „alten“ Standards

Warum überhaupt Permethrinsäureglucuronid synthetisiert und als Standard eingesetzt wurde, ergab sich durch die im Laufe der Arbeit gewonnenen Erkenntnisse. Sie machten deutlich, daß die Erkennung der freien Permethrinsäure durch die Antikörper stark eingeschränkt war. Die Konkurrenzreaktion um die Antigenbindungsstellen des Antikörpers fand immer zwischen freier und gebundener Permethrinsäure statt. Das galt sowohl für das direkte Testformat, bei dem die freie Permethrinsäure mit an Peroxidase gebundener Permethrinsäure konkurrierte, als auch für das indirekte Testformat, bei dem Permethrinsäure mit an Rinderserumalbumin oder Ovalbumin gebundener Permethrinsäure konkurrierte. Um das Gleichgewicht zugunsten der freien Säure zu verschieben, gab es zwei Möglichkeiten:

- Die Verringerung der Affinität des Tracers oder des Beschichtungskonjugats zum Antikörper
- Die Erhöhung der Affinität des Analyten

Die Verringerung der Affinität zu Tracer oder Beschichtungskonjugat konnte durch die Einführung einer neuen Spacergruppe (p-Hydroxyphenylelessigsäure) erzielt werden. Die Erhöhung der Affinität der Permethrinsäure war nur durch eine Derivatisierung möglich. Sie würde dadurch ebenfalls in gebundener Form vorliegen und müßte vom Antikörper besser erkannt werden. Da Permethrinsäure im Urin nicht nur als freie Säure, sondern auch als Glucuronid, Sulfat oder in anderer Form konjugiert vorliegt, war eine Quantifizierung auch über eine Bestimmung des Gehalts an Permethrinsäureglucuronid möglich (Eadsforth et al., 1988).

Genaue Untersuchungen, wie groß bei Menschen der Anteil an Permethrinsäure ist, der in glucuronidierter Form ausgeschieden wird, sind bisher nicht durchgeführt worden. Lediglich Kühn (1996) hat bei der Variation der Hydrolysebedingungen für die Konjugatspaltung der Cyfluthrinmetabolite festgestellt, daß bei Raumtemperatur in angesäuertem Harn ca. 75 % der Permethrinsäure in konjugierter Form vorliegt, ohne jedoch auf die Art der Konjugate einzugehen. In einer Untersuchung zum Permethrinmetabolismus in Ratten und Kühen wurde festgestellt, daß der größte Teil der Permethrinsäure in glucuronidierter Form ausgeschieden wurde (Gaughan et al., 1977). Der Synthese von Glucuroniden wurde in den letzten Jahren größere Aufmerksamkeit gewidmet, was unter anderem an der großen Rolle liegt, die Glucuronide bei der Entgiftung von Xenobiotica spielen (Stachulski und Jenkins, 1998). Im vorliegenden Fall erfolgte die Synthese durch direkte Umsetzung von Permethrinsäure und Glucuronsäure in Pyridin. Dies hatte zwar eine sehr geringe Ausbeute zur Folge, führte aber dennoch zum Erfolg. Ein direkter Vergleich von Permethrinsäure und Permethrinsäureglucuronid auf ihre Reaktion im ELISA zeigte, daß beide nahezu gleich erkannt wurden.

Abschließende Untersuchungen zur Ermittlung der Kreuzreaktivitäten sollten die Selektivität des Antikörpers zeigen. Das Amid wurde am besten erkannt, weil seine Struktur derjenigen entsprach, die für die Immunisierung verwendet worden war. Ebenfalls gut erkannt wurde der Methylester. Die Ursache hierfür dürfte die mit dem Amid ähnliche Ladungsverteilung und seine geringe Größe sein. Das eigentliche Zielmolekül, trans-Permethrinsäure, wurde erst ab Konzentrationen von 100 µg/L erkannt, da die Ladungsverteilung nicht mit der des zur Immunisierung verwendeten Konjugats übereinstimmte. Die glucuronidierte Form der trans-Permethrinsäure wurde nur unwesentlich besser als das freie Molekül erkannt. Gründe hierfür könnten in der Größe der Antigenbindungsstelle und in den deutlich hydrophileren Eigenschaften des Glucuronids liegen. Die Antigenbindungsstelle erfaßte das Permethrinsäuremolekül und einen Bereich des Spacers, der aber mit der Glucuronsäure nicht übereinstimmte und deswegen auch nicht erkannt wurde. Die Selektivität der Antikörper wurde besonders an ihrer Reaktion auf cis-Permethrinsäure deutlich. Diese wurde praktisch nicht erkannt, der Antikörper konnte also zwischen den beiden Stereoisomeren unterscheiden. Die Problematik der Stereoisomerie stand bisher nicht im Blickpunkt dieser Arbeit, soll hier aber kurz erwähnt werden. Die Anwesenheit von zwei Chiralitätszentren im Cyclopropanring der Permethrinsäure führt zur Bildung zweier Paare von Diastereomeren, die als cis- und trans-Isomere ([1RS, cis]- und [1RS, trans]-Permethrinsäure) bezeichnet werden (Elliott, 1977). Beim Einsatz von Pyrethroiden, die den Permethrinsäurerest enthalten, werden keine enantiomerenreinen Verbindungen, sondern Racemate eingesetzt. Da die Selektivität von Antikörpern im allgemeinen für die Unterscheidung von Diastereomeren ausreicht (Price und Newman, 1997), war es

für die Generierung sensitiver und selektiver Antikörper wichtig, mit diastereomerenreinen Verbindungen zu arbeiten. Alle Planungen in bezug auf die Entwicklung des ELISAs waren auf den Nachweis nur eines Diastereomeren ausgerichtet. Für die Synthese der Haptene, Hapten-Protein-Konjugate und des Glucuronids wurde daher ausschließlich das trans-Isomer eingesetzt. Der Nachweis von trans-Permethrinsäure wurde gewählt, weil in verschiedenen Arbeiten über den diastereoselektiven Metabolismus von cis- und trans-Permethrinsäure festgestellt wurde, daß es charakteristische Unterschiede im Konzentrationsverhältnis beider Isomere gab (Eadsforth et al., 1988; Woollen et al., 1992). Bei oraler Exposition war die Konzentration des trans-Isomeren im Urin bis zu dreimal so groß wie die des cis-Isomeren. Erklärt wurde dies mit der größeren Hydrolysestabilität der esterartigen Pyrethroide mit cis-Konfiguration. Obwohl bei dermalen Exposition kein Ungleichgewicht zwischen den Stereoisomeren gefunden wurde (Eadsforth et al., 1988), schien es sinnvoll, den Nachweis auf das Isomer zu konzentrieren, das potentiell in höheren Konzentrationen vorhanden war.

Die hohe Selektivität des Antikörpers wurde auch an seiner Reaktion auf die Pyrethroide Deltamethrin und Bifenthrin deutlich. Die im Vergleich zur Permethrinsäure unterschiedlichen Substituenten an der Vinylgruppe (bei Deltamethrin wurden die Chlor- durch Bromatome ersetzt, bei Bifenthrin wurde ein Chloratom durch eine Trifluormethylgruppe ersetzt) führten dazu, daß sie vom Antikörper nicht erkannt wurden.

5.3.3 **Schlußfolgerungen**

Die Pyrethroidmetaboliten cis- und trans-Permethrinsäure werden im Urin bisher mit Hilfe der GC-MS nachgewiesen. Die Nachweisgrenze des Verfahrens liegt bei 0,2 µg/L. Diese Nachweisgrenze konnte mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten ELISA nicht erreicht werden. Der entscheidende Grund für die geringe Sensitivität des Tests lag in der mangelnden Affinität der Antikörper zum Analyten. Diese hat bei kompetitiven Immunoassays entscheidende Bedeutung und es gibt keine Möglichkeit, ein Manko an dieser Stelle auszugleichen, abgesehen von der Generierung neuer Antikörper (Weller, 1992). Es ist nur möglich und sinnvoll, die potentielle Empfindlichkeit eines Antikörpers voll auszuschöpfen, was durch Variation verschiedener, im Rahmen dieser Arbeit beschriebener, Parameter geschehen ist. Die mangelnde Affinität des Antikörpers zum Analyten zeugt davon, daß es nicht gelungen ist, dem Immunsystem der Antikörper produzierenden Tiere (Kaninchen) klarzumachen, welcher Antikörper „gewünscht“ wurde. Das wirft die Frage nach dem richtigen Haptendesign für eine erfolgreiche Immunisierung auf. Harrison et al. (1991) beschreiben für verschiedene Pestizide Haptenstrukturen,

die zu erfolgreichen Immunisierungen geführt haben. Dabei bemängeln sie die Nichtveröffentlichung von Daten über Synthesen von Haptenen, die zu fehlgeschlagenen Antikörperproduktionen führten. Dadurch gebe es bis heute wenig Hinweise auf die strukturellen Anforderungen an Haptene für eine erfolgreiche Antikörperproduktion. Wichtig ist, daß bei der Haptensynthese keine strukturellen Fragmente des Moleküls, die für die Erkennung durch den Antikörper wichtig sein könnten, verändert werden (Goodrow et al., 1995). Besonders bei kleinen Molekülen wie Permethrinsäure war dies schwierig, da jede Kopplung an einen Spacer oder ein Protein mit einer Veränderung der Struktur, der Geometrie und der elektronischen Natur verbunden war. Durch die Kopplung über die Carboxylfunktion hatte sich die Struktur des Moleküls so stark verändert, daß keine sensitive Erkennung der Permethrinsäure erfolgte. Bei zukünftigen Versuchen, Antikörper gegen Permethrinsäure zu erzeugen, sollte diese Gruppe erhalten bleiben. Die Dichlorvinylgruppe besitzt ebenfalls großen Einfluß auf die Erkennung durch den Antikörper, wie die Kreuzreaktionen mit Deltamethrin und Bifenthrin beweisen und sollte nicht für eine Kopplungsreaktion modifiziert werden. Welche Bedeutung die beiden Methylsubstituenten am Cyclopropanring für die Antikörpererkennung haben, ist schwer abzuschätzen. Vielleicht wäre es ein geeigneter Ansatzpunkt für eine neue Haptensynthese, wenn es z.B. gelingen würde, eine Methylgruppe durch eine längere Alkylkette zu ersetzen und darüber die Kopplung an ein Protein durchzuführen.

Daß die Herstellung von sensitiven Antikörpern zum Nachweis von Permethrinsäure prinzipiell möglich ist, beweisen die Arbeiten von Pullen und Hock (1995), die einen ELISA zum Nachweis von Pyrethroiden entwickelten. Der dabei hergestellte monoklonale Antikörper wies eine Nachweisgrenze für trans-Permethrinsäure von 0,8 µg/L auf. Für die Immunisierung wurde ein Konjugat verwendet, bei dem Permethrinsäure direkt und ohne Spacer (die Synthese von Spacerkonjugaten schlug fehl) an Rinderserumalbumin gekoppelt wurde. Miyake et al. (1998) koppelten Chrysanthemumsäure (Dimethylvinyl- statt Dichlorvinylgruppe) an Rinderserumalbumin. Die resultierenden Antikörper zeigten eine gute Empfindlichkeit für Moleküle, die den Chrysanthemumrest enthielten, erkannten die freie Säure aber erst in Konzentrationen von 1 mg/L. Versuche von Wraith et al. (1986), mit Hapten-Protein-Konjugaten, die über einen 3-Carbon-Spacer an ein Trägerprotein gebunden worden waren, Antikörper gegen Permethrinsäure zu generieren, schlugen fehl. Die Antikörper erkannten zwar Cypermethrin, aber nicht Permethrinsäure. Bonwick et al. (1994) benutzten 6-Aminohexansäure oder 4-Aminobutansäure als Spacer für die Kopplung von Permethrinsäure an ein Protein. Die resultierenden Antikörper zeigten nur eine geringe Sensitivität für Permethrin, wobei Permethrinsäure selbst als Kompetitor nicht getestet wurde. Lee et al. (1998) verglichen 15 Antiseren, die mit acht unterschiedlichen Haptenen her-

gestellt worden waren. Dabei erwiesen sich die Antikörper, bei denen nur der Permethrinsäurerest zur Immunisierung verwendet worden war, als weniger empfindlich als solche, bei denen das ganze Pyrethroidmolekül oder die Phenoxybenzylgruppe verwendet wurde. Möglicherweise hat die Permethrinsäurestruktur allgemein eine geringe immunogene Wirkung. Neben den erwähnten sind in der Literatur weitere ELISAs beschrieben, die ausschließlich auf den Nachweis von Pyrethroiden, nicht aber ihrer Metabolite ausgerichtet sind (Shan et al., 2000; Stancker et al., 1989).

Alle Bemühungen zur Entwicklung des ELISAs machen einmal mehr deutlich, wie wenig vorhersehbar die Bildung von Antikörpern durch das komplexe Immunsystem ist. Die Affinität des Antikörpers zum Analyten stellt die entscheidende Begrenzung für die Sensitivität eines ELISAs dar. Ist sie zu gering, läßt sich die Nachweisgrenze auch mit verschiedensten Methoden nicht grundlegend verbessern. Die einzig effektive Strategie wäre in diesem Fall die Herstellung neuer Antikörper. Ein wichtiger Ansatzpunkt ist dabei die Entwicklung neuartiger Haptene, wobei die Substitution einer Methylgruppe am Cyclopropanring durch einen längerkettigen Alkylrest die erfolgversprechendste Strategie zu sein scheint. Mit einem geeigneten Hapten könnte es vielleicht sogar gelingen, aus dem polyklonalen Antiserum mit Hilfe der Affinitätschromatographie gezielt die Antikörperfraktion zu isolieren, die hochselektiv und spezifisch die freie Permethrinsäure oder das Glucuronid erkennt. Die Frage, ob eine solche Fraktion in einem der acht von mir produzierten Antiseren latent vorhanden ist, ließ sich mit den bisher zur Verfügung stehenden Haptenen nicht klären, liegt aber durchaus im Bereich des Möglichen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines Enzymimmunoassays als *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) zum Nachweis des Pyrethroidmetaboliten (1RS)-trans-3-(2,2-dichlorvinyl)-2,2-dimethyl-cyclopropancarbonsäure (trans-Permethrinsäure) in humanem Urin. Hierzu wurden verschiedene Konjugate, entstanden durch Kopplung von trans-Permethrinsäure an das Trägerprotein KLH (Keyhole Limpet Hämocyanin), hergestellt. Neben der direkten Kopplung wurden zusätzlich Konjugate mit einem 4-Carbon- bzw. 6-Carbonspacer synthetisiert. Mit diesen Konjugaten wurden acht Kaninchen immunisiert. Nach einer 12 wöchigen Immunisierungsphase wurden die Kaninchen vollständig entblutet. In allen Fällen führte die Immunisierung zur Bildung von Antikörpern, die den Permethrinsäureteil selektiv erkannten. Als Testsystem wurde sowohl ein indirekter kompetitiver ELISA mit immobilisiertem Hapten-Protein-Konjugat als auch ein direkter kompetitiver ELISA mit immobilisierten Antikörpern etabliert. Mit beiden Testsystemen konnte ein ELISA entwickelt werden, der einen qualitativen und quantitativen Nachweis von trans-Permethrinsäure ermöglichte. Eine Konzentrationsbestimmung war in einem Bereich zwischen 100 µg/L und 10 mg/L möglich.

Es wurden verschiedene Maßnahmen zur Steigerung der Nachweisfähigkeit des immunologischen Tests durchgeführt. Mit Hilfe der Affinitätschromatographischen Reinigung der Antiseren gelang es, aus dem polyklonalen Rohserum die Antikörper zu isolieren und anzureichern, die die Permethrinsäurestruktur erkannten. Weiterhin führte die Strategie, durch die Synthese eines neuartigen Haptens die Affinität des Antikörpers zum Hapten-Protein-Konjugat zu senken und damit indirekt die Kompetitionswirkung des Analyten zu erhöhen, zu einem sichtbaren Sensitivitätsgewinn. Die Synthese von Permethrinsäureglucuronid ermöglichte die Erprobung eines alternativen Kalibrierstandards. Permethrinsäure und das Glucuronid unterschieden sich allerdings nur unwesentlich in ihrer kompetitiven Wirkung. Durch Versuche mit verschiedenen strukturverwandten Standardsubstanzen konnte gezeigt werden, daß die Antikörper bevorzugt und sehr selektiv die amidisch gebundene Permethrinsäure erkannten. Keiner der Optimierungsversuche führte zu einer Sensitivitätssteigerung, die es ermöglicht hätte, einen Test mit einer Nachweisgrenze von unter 1 µg/l zu etablieren.

7 LITERATUR

- Abraham, G.E.** (1969) Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17 β . *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **29**, 866-870.
- Alcocer, M.J., Doyen, C., Lee, H.A. und Morgan, M.R.** (2000) Properties of polyclonal, monoclonal, and recombinant antibodies recognizing the organophosphorus pesticide chlorpyrifos-ethyl. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 4053-4059.
- Amersham, Pharmacia und Biotech** (1999) Affinity chromatography - principles and methods, Uppsala, Sweden.
- Angerer, J. und Ritter, A.** (1997) Determination of metabolites of pyrethroids in human urine using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **695**, 217-226.
- Appel, K.E. und Gericke, S.** (1993) Zur Neurotoxizität und Toxikokinetik von Pyrethroiden. *Bundesgesundhbl.* **36**, 219-228.
- Aston, J.P., Hitchings, E.J., Ball, R.L., Weeks, I. und Woodhead, J.S.** (1997) Water immiscible solvent based immunoassay. *J. Immunoassay* **18**, 235-246.
- Bachas, L.G. und Meyerhoff, M.E.** (1986) Theoretical models for predicting the effect of bridging group recognition and conjugate substitution on hapten enzyme immunoassay dose-response curves. *Anal. Biochem.* **156**, 223-238.
- Becker, H.G.O., Domschke, G. und Fanghänel, E.** (1990) Organikum, 18. berichtigte Auflage. Verlag der Wissenschaften, Berlin.
- Bennett, B., Check, I.J., Olsen, M.R. und Hunter, R.L.** (1992) A comparison of commercially available adjuvants for use in research. *J. Immunol. Methods* **153**, 31-40.
- Berkson, J.** (1944) Application of the logistic function to bio-assay. *J. Am. Statist. Assoc.* **39**, 357-365.
- Bermejo, A. und Veeken, H.** (1992) Insecticide-impregnated bed nets for malaria control: a review of the field trials. *Bull. World Health Organ.* **70**, 293-296.
- Berson, S.A., Yalow, R.S., Baumann, A., Rothschild, M.A. und Newerly, K.** (1956) Insulin ¹³¹I-metabolism in human subjects: Demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects. *J. Clin. Invest.* **35**, 170-190.
- Beyer, K.** (1998) Entwicklung und Charakterisierung eines Enzym-Immunoassays für die Analyten Benzol, Toluol und Xylole (BTX). *Dissertation*, TU München.

- Bonwick, G.A., Putman, M., Baugh, P.J., Smith, C.J., Armitage, R. und Davis, D.H.** (1994) Immunoassay development for permethrin residues. *Food Agr. Immunol.* **6**, 341-356.
- Bos, E.S., van der Doelen, A.A., van Rooy, N. und Schuurs, A.H.W.M.** (1981) 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine as an Ames test negative chromogen for horseradish peroxidase in enzyme-immunoassay. *J. Immunoassay* **2**, 187-204.
- Brady, J.F.** (1995) Interpretation of immunoassay data. In: J.P. Nelson, A.E. Karu und R.B. Wong (Hrsg.), *Immunoanalysis of Agrochemicals*, ACS Symposium Series 586. American Chemical Society, Washington, DC, USA, 266-287.
- Brinkley, M.** (1992) A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens, and cross-linking reagents. *Bioconjug. Chem.* **3**, 2-13.
- Butte, W., Walker, G. und Heinzow, B.** (1998) Referenzwerte der Konzentration von Permethrin-Metaboliten Cl2CA [3-(2,2-Dichlorvinyl)-2,2-dimethylcyclopropan-carbonsäure] und 3-PBA [3-Phenoxybenzoesäure] im Urin. *Umweltmed. Forsch. Prax.* **3**, 21-26.
- Casida, J.E. und Quistad, G.B.** (1998) Golden age of insecticide research. *Annu. Rev. Entomol.* **43**, 1-16.
- Chavez-Olortegui, C., Bohorquez, K., Alvarenga, L.M., Kalapothakis, E., Campolina, D., Maria, W.S. und Diniz, C.R.** (2001) Sandwich-ELISA detection of venom antigens in envenoming by *Phoneutria nigriventer* spider. *Toxicon* **39**, 909-911.
- Choi, J., Kim, C. und Choi, M.J.** (1999) Influence of the antibody purification method on immunoassay performance: Hapten-antibody binding in accordance with the structure of the affinity column ligand. *Anal. Biochem.* **274**, 118-124.
- Crowther, J.R.** (1995) ELISA: Theory and Practice. In: J.M. Walker (Hrsg.) *Methods in Molecular Biology*, Vol. 42. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, 131-176.
- Da Silva Gomes, M., Bernardei, M.M. und de Sousa Spinosa, H.** (1991a) Effects of prenatal pyrethroid insecticide exposure on the sexual development of rats. *Vet. Hum. Toxicol.* **33**, 427-428.
- Da Silva Gomes, M., Bernardei, M.M. und de Sousa Spinosa, H.** (1991b) Pyrethroid insecticides and pregnancy: Effect on physical and behavioral development of rats. *Vet. Hum. Toxicol.* **33**, 315-317.
- Danilova, N.P.** (1994) ELISA screening of monoclonal antibodies to haptens: Influence of the chemical structure of hapten-protein conjugates. *J. Immunol. Methods* **173**, 111-117.

- Davies, J.H.** (1985) The pyrethroids: An historical introduction. In: J.P. Leahey (Hrsg.) *The Pyrethroid Insecticides*. Taylor and Francis, London, U.K., 1-41.
- Dudley, R.A., Edwards, P., Ekins, R.P., Finney, D.J., McKenzie, I.G.M., Raab, G.M., Rodbard, D. und Rodgers, R.P.C.** (1985) Guidelines for immunoassay data processing. *Clin. Chem.* **31**, 1264-1271.
- Eadsforth, C.V. und Baldwin, M.K.** (1983) Human dose-excretion studies with the pyrethroid insecticide, cypermethrin. *Xenobiotica* **13**, 67-72.
- Eadsforth, C.V., Bragt, P.C. und van Sittert, N.J.** (1988) Human dose-excretion studies with pyrethroid insecticides cypermethrin and alphacypermethrin: relevance for biological monitoring. *Xenobiotica* **18**, 603-614.
- Elliott, M.** (1977) Synthetic pyrethroids. In: R.F. Gould (Hrsg.) *Synthetic Pyrethroids*, ACS Symposium Series 42. American Chemical Society, Washington, DC, USA, 1-20.
- Engvall, E. und Perlmann, P.** (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**, 871-874.
- Erlanger, B.F.** (1980) The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates: A survey. *Methods Enzymol.* **70**, 85-104.
- Erlanger, B.F., Borek, F., Beiser, S.M. und Lieberman, S.** (1959) Steroid-protein conjugates II. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with progesterone, deoxycorticosterone, and estrone. *J. Biol. Chem.* **234**, 1090-1094.
- Feng, P.C.C., Horton, S.R. und Sharp, C.R.** (1992) A general method for developing immunoassays to chloracetanilide herbicides. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 211-214.
- Freund, J. und McDermont, K.** (1942) Sensitization to horse serum by means of adjuvants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **49**, 548-553.
- Fromme, H.** (1991) Anwendung von Pestiziden in Innenräumen unter besonderer Berücksichtigung der Pyrethroide. Toxikologische Aspekte und Darstellung der Anwendungsproblematik, Teil 2. *Öffentl. Gesundheitswes.* **53**, 662-667.
- Gaughan, L.C., Unai, T. und Casida, J.E.** (1977) Permethrin metabolism in rats and cows and in bean and cotton plants. In: M. Elliott (Hrsg.) *Synthetic Pyrethroids*, ACS Symposium Series 42. American Chemical Society, Washington, DC, USA, 186-193.
- Gendloff, E.H., Casale, W.L., Ram, B.P., Tai, J.H., Pestka, J.J. und Hart, L.P.** (1986) Hapten-protein conjugates prepared by the mixed anhydride method. Cross-reactive antibodies in heterologous antisera. *J. Immunol. Methods* **92**, 15-20.

- Gerdes, M., Meusel, M. und Spener, F.** (1999) Influence of antibody valency in a displacement immunoassay for the quantitation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *J. Immunol. Methods* **223**, 217-226.
- Goodrow, M.H., Sanborn, J.R., Stoutamire, D.W., Gee, S.J. und Hammock, B.D.** (1995) Strategies for immunoassay hapten design. In: A.E. Karu, J.O. Nelson und R.B. Wong (Hrsg.), *Immunoanalysis of Agrochemicals*, ACS Symposium Series 586. American Chemical Society, Washington, DC, USA, 117-139.
- Habeeb, A.F.S.A.** (1966) Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal. Biochem.* **14**, 328-336.
- Harlow, E. und Lane, D.** (1999) *Using Antibodies : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Harrison, R.O., Goodrow, M.H., Gee, S.J. und Hammock, B.D.** (1991) Hapten synthesis for pesticide immunoassay development. In: *Immunoassay for Trace Chemical Analysis*, Vol. 451. American Chemical Society, Washington, DC, USA, 14-27.
- Hartung, G., Heeger, S., Bertsch, T., Frei, E., Wunder, A., Kranzle, M., Stehle, G., Weigand, M., Schrenk, H.H., Sinn, H. und Queisser, W.** (2000) Adaptation and clinical evaluation of a homogenous enzyme multiplied immunoassay technique (EMIT) for drug monitoring of a methotrexate-albumin conjugate (MTX-HSA) in humans. *Onkologie* **23**, 352-357.
- Hawes, E.M., Shetty, H.U., Cooper, J.K., Rauw, G., McKay, G. und Midha, K.K.** (1984) Radioimmunoassay for psychotropic drugs. III: Synthesis and properties of haptens for trifluoperazine and fluphenazine. *J. Pharm. Sci.* **73**, 247-250.
- Hofstetter, O., Hofstetter, H., Then, D., Schurig, V. und Green, B.S.** (1997) Direct binding of low molecular weight haptens to ELISA plates. *J. Immunol. Methods* **210**, 89-92.
- Hurn, B.A.L. und Chantler, M.** (1980) Production of reagent antibodies. *Methods Enzymol.* **70**, 104-142.
- Inman, J.K., Merchant, B. und Tacey, S.E.** (1973) Synthesis of large haptenic compounds having a common functional group that permits covalent linkage to proteins, cell surfaces, and adsorbents. *Immunochemistry* **10**, 153-163.
- Jenkins, S.H.** (1992) Homogeneous enzyme immunoassay. *J. Immunol. Methods* **150**, 91-97.
- Kenna, J.G., Major, G.N. und Williams, R.S.** (1985) Methods for reducing non-specific antibody binding in enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Immunol. Methods* **85**, 409-419.

- Knopp, D., Nuhn, P. und Dobberkau, H.-J.** (1985) Radioimmunoassay for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Arch. Toxicol.* **58**, 27-32.
- Köhler, G. und Milstein, C.** (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497.
- Krowchuk, D.P., Tunnessen, W.W., Jr. und Hurwitz, S.** (1992) Pediatric dermatology update. *Pediatrics* **90**, 259-264.
- Kühn, K.-H.** (1996) Bestimmung von Pyrethroiden und ihren Metaboliten in Blut und Urin mittels GC/MS und GC-ECD. *Dissertation*, TU Clausthal.
- Kühn, K.-H., Leng, G., Bucholski, K.A., Dunemann, L. und Idel, H.** (1996) Determination of pyrethroid metabolites in human urine by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* **43**, 285-292.
- Landon, J. und Moffat, A.C.** (1976) The radioimmunoassay of drugs. A review. *Analyst* **101**, 225-243.
- Law, B.** (1996) Immunoassay: A Practical Guide. Taylor & Francis, London, UK.
- Lee, N., McAdam, D.P. und Skerritt, J.H.** (1998) Development of immunoassays for type II synthetic pyrethroids. 1. Hapten design and application to heterologous and homologous assays. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 520-534.
- Leng, G., Kühn, K.-H. und Idel, H.** (1997) Biological monitoring of pyrethroids in blood and pyrethroid metabolites in urine: Applications and limitations. *Sci. Total Environ.* **199**, 173-181.
- Li, K. und Li, Q.X.** (2000) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the insecticide imidacloprid. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3378-3382.
- Lu, B., Smyth, M.R. und O'Kennedy, R.** (1996) Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassay and immunosensors. *Analyst* **121**, 29-32.
- Lukowicz-Ratajczak, J. und Krechinak, J.** (1992) Effects of deltamethrin on the immune system. *Environ. Res.* **59**, 467-475.
- Marquardt, H. und Schäfer, S.G.** (1997) Lehrbuch der Toxikologie. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Martin, P., Wilson, I.D. und Jones, G.R.** (2000) Optimisation of procedures for the extraction of structural analogues of propranolol with molecular imprinted polymers for sample preparation. *J. Chromatogr. A* **889**, 143-147.
- Matuszczyk, G., Knopp, D. und Niessner, R.** (1996) Development of an ELISA for 2,4-D: Characterization of two polyclonal antisera. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **354**, 41-47.
- McDaniel, K.L. und Moser, V.C.** (1992) Utility of neurobehavioral screening battery for differentiating the effects of two pyrethroids, permethrin and cypermethrin. *Neurotoxicol. Teratol.* **12**, 71-73.
- McElhiney, J., Lawton, L.A. und Porter, A.J.R.** (2000) Detection and quantification of microcystins (cyanobacterial hepatoxins) with recombinant anti-

body fragments isolated from a naive human phage display library. *FEMS Microbiol. Lett.* **193**, 83-88.

- Means, G.E. und Feeney, R.E.** (1990) Chemical modifications of proteins: History and applications. *Bioconjug. Chem.* **1**, 2-12.
- Mehlhorn, H.** (1989) Das Immunsystem des Menschen. In: H. Mehlhorn (Hrsg.) Grundriß der Zoologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 43-69.
- Meierhenrich, U.** (1997) Nachweis und Toxikologie pyrethroider Verbindungen. Untersuchungen für die Matrices Teppichfaser, Hausstaub, Raumluft sowie Urin. *Dissertation*, Universität Bremen.
- Microcal Origin 5** (1997). Microcal Software Inc., Northhampton, USA.
- Miyake, S., Beppu, R., Yamaguchi, Y., Kaneko, H. und Ohkawa, H.** (1998) Polyclonal and monoclonal antibodies specific to the chrysanthemic acid moiety of pyrethroid insecticides. *Pestic. Sci.* **54**, 189-194.
- Müller-Esterl, W.** (1986) Practical considerations in enzyme-immunoassays illustrated by a model system. In: H.U. Bergmeyer und M. Graßl (Hrsg.), *Methods of Enzymatic Analysis, Vol. IX, Proteins and Peptides*. VCH, Weinheim, 14-37.
- Müller-Mohnssen, H.** (1991) Insektizide: Wissenschaft ist als Frühwarnsystem ausgeschaltet. *Dt. Ärztebl.* **88**, A3495-A3501.
- Müller-Mohnssen, H. und Hahn, K.** (1995) Über eine Methode zur Früherkennung neurotoxischer Erkrankungen (am Beispiel der Pyrethroidintoxikationen). *Gesundh.-Wes.* **57**, 214-222.
- Nakane, P.K. und Pierce, G.B.** (1967) Enzyme-labeled antibodies: Preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.* **14**, 929-931.
- Narahashi, T.** (1986) Mechanism of action of pyrethroids on sodium and calcium channel gating. In: M.G. Ford, G.G. Lunt, R.C. Reay und P.N.R. Usherwood (Hrsg.), *Neuropharmacology and Pesticide Action*. VCH, Weinheim, 36-60.
- Narahashi, T., Carter, D.B., Frey, J., Ginsburg, K., Hamilton, B.J., Nagata, K., Roy, M.L., Song, J.-H. und Tatebayashi, H.** (1995) Sodium channels and GABA_A receptor-channel complex as targets of environmental toxicants. *Toxicol. Lett.* **82/83**, 239-245.
- Naumann, K.** (1990) Synthetic pyrethroid insecticides: Structures and properties. In: G. Haug und H. Hoffmann (Hrsg.), *Chemistry of Plant Protection, Vol. 4*. Springer, Berlin.
- Naumann, K.** (1998) Research into fluorinated pyrethroid alcohols - an episode in the history of pyrethroid discovery. *Pestic. Sci.* **52**, 3-20.
- Nicklas, W.** (1993) Grundgedanken zum Immunisieren von Versuchstieren. *Tierärztl. Umsch.* **48**, 166-171.

- Olsen, J., Martin, P., Wilson, I.D. und Jones, G.R.** (1999) Methodology for assessing the properties of molecular imprinted polymers for solid phase extraction. *Analyst* **124**, 467-471.
- Palmieri, G.M., Yalow, R.S. und Berson, S.A.** (1971) Adsorbent techniques for the separation of antibody-bound from free peptide hormones in radioimmunoassay. *Horm. Metab. Res.* **3**, 301-305.
- Panfil, I., Lehman, P.A., Zimniak, P., Ernst, B., Franz, T., R, L. und Radominska, A.** (1992) Biosynthesis and chemical synthesis of carboxyl-linked glucuronide of lithocholic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **1126**, 1.
- Pfortner, P.** (1998) Entwicklung von Enzymimmunoassays (ELISAs) zur Bestimmung von huminstoffgebundenen Nitroaromaten. *Dissertation*, TU München.
- Pierce** (1998) Produktbeschreibung Imject Carrier Proteins BSA, KLH and OVA, Rockford, USA.
- Plückthun, A. und Skerra, A.** (1988) Assembly of a functional immunoglobulin F_v fragment in Escherichia coli. *Science* **240**, 1038-1041.
- Porstmann, T. und Kiessig, T.S.** (1992) Enzyme immunoassay techniques - An overview. *J. Immunol. Methods* **150**, 5-21.
- Pratt, R.P. und Roser, B.** (1997) Comparison of blocking agents for ELISA. Nunc Bulletin No. 7, Cambridge, UK, 1-3.
- Price, C.P.** (1998) Progress in immunoassay technology. *Clin. Chem. Lab. Med.* **36**, 341-347.
- Price, C.P. und Newman, D.J.** (1997) Principles and Practise of Immunoassay. Stockton Press.
- Procacci, P.G., Lamizana, L., Kumlien, S., Habluetzel, A. und Rotigliano, G.** (1991) Permethrin-impregnated curtains in malaria control. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85**, 181-185.
- Pullen, S. und Hock, B.** (1995) Development of enzyme immunoassays for the detection of pyrethroid insecticides: 2. Polyclonal antibodies for pyrethroid insecticides. *Anal. Lett.* **28**, 781-795.
- Queffelec, A.-L., Nodet, P., Haelters, J.-P., Thouvenot, D. und Corbel, B.** (1998) Hapten synthesis for a monoclonal antibody based ELISA for deltamethrin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **46**, 1670-1676.
- Rasanen, I., Neuvonen, M., Ojanpera, I. und Vuori, E.** (2000) Benzodiazepine findings in blood and urine by gas chromatography and immunoassay. *Forensic Sci. Int.* **112**, 191-200.
- Razak, C.N.A., Salam, F., Ampon, K., Basri, M. und Salleh, A.B.** (1998) Development of an ELISA for detection of Parathion, Carbofuran, and 2,4-dichlorphenoxyacetic acid in water, soil, vegetables, and fruits. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **864**, 479-484.

- Robertson, P.W., Whybin, L.R. und Cox, J.** (1985) Reduction of non-specific binding in enzyme immunoassays using casein hydrolysate in serum diluents. *J. Immunol. Methods* **76**, 195-197.
- Rodbard, D.** (1974) Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassay and immunoradiometric assays. *Clin. Chem.* **20**, 1255-1270.
- Rodbard, D.** (1978) Statistical estimation of the minimal detectable ("sensitivity") for radioligand assays. *Anal. Biochem.* **90**, 1-12.
- Rodbard, D., Ruder, H.J., Vaitukaitis, J. und Jacobs, H.S.** (1971) Mathematical analysis of kinetics of radioligand assays: Improved sensitivity obtained by delayed addition of labeled ligand. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **33**, 343-355.
- Roitt, I.M.** (1988) Leitfaden der Immunologie. 3. Aufl., Steinkopff Verlag, Darmstadt.
- Sauer, M.J., Foulkes, J.A. und O'Neill, P.M.** (1989) A comparison of alkaline phosphatase, β -galactosidase, penicillinase and peroxidase used as labels for progesterone determination in milk by heterologous enzyme immunoassay. *J. Steroid Biochem.* **33**, 423-437.
- Schecklies, E.** (1996) Polyklonale Antikörper. VCH, Weinheim.
- Shan, G.M., Leeman, W.R., Stoutamire, D.W., Gee, S.J., Chang, D.P.Y. und Hammock, B.D.** (2000) Enzyme-linked immunosorbent assay for the pyrethroid permethrin. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 4032-4040.
- Silberberg, K.** (1998) Entwicklung eines Enzymimmunoassays für die Bestimmung von (1 R,S)-trans-3-(2,2-Dichlorvinyl)-2,2-dimethylcyclopropan-carbonsäure [Cl₂CA]. *Diplomarbeit*, Universität Oldenburg.
- Snodgrass, H.L.** (1992) Permethrin transfer from treated cloth to the skin surface: potential for exposure in humans. *J. Toxicol. Environ. Health* **35**, 91-105.
- Sondergard-Andersen, J., Lauritzen, E., Lind, K. und Holm, A.** (1990) Covalently linked peptides for enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods* **131**, 99-104.
- Stachulski, A.V. und Jenkins, G.N.** (1998) The synthesis of O-glucuronides. *Nat. Prod. Rep.* **15**, 173-186.
- Stanker, L.H., Bigbee, C., Van Emon, J., Watkins, B., Jensen, R.H., Morris, C. und Vanderlaan, M.** (1989) An immunoassay for pyrethroids: Detection of permethrin in meat. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 834-839.
- Strobach, H.** (1994) Kochbuch der immunologischen Analytik: Radioimmunoassay und verwandte Methoden. Thieme, Stuttgart, New York.
- Stryer, L.** (1991) Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Taplin, D. und Meinking, T.L.** (1990) Pyrethrins and pyrethroids in dermatology. *Arch. Dermatol.* **126**, 213-221.

- Taplin, D., Meinking, T.L., Chen, J.A. und Sanchez, R.** (1990) Comparison of crotamiton 10% cream (Eurax) and permethrin 5% cream (Elimite) for the treatment of scabies in children. *Pediatr. Dermatol.* **7**, 67-73.
- Tijssen, P.** (1987) Practise and theory of enzyme immunoassay. In: R.H. Burdon und P.H. Van Knippenberg (Hrsg.), *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 15. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 123-130.
- TIME-LIFE** (1994) *Das Immunsystem - Faszination Menschlicher Körper*. Time-Life Books B.V., Amsterdam, NL.
- Tippe, A.** (1993) Sind Pyrethroide unbedenklich? Zur Bewertung experimenteller Befunde. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* **194**, 342-359.
- Uchida, Y., Ito, S. und Nukina, N.** (2000) Sandwich ELISA for the measurement of Apo-E4 levels in serum and the estimation of the allelic status of Apo-E4 isoforms. *J. Clin. Lab. Anal.* **14**, 260-264.
- van den Tweel, J.G.** (1991) *Immunologie. Spektrum der Wissenschaft* Verlagsges. mbH, Heidelberg.
- Van Weemen, B.K. und Schuurs, A.H.W.M.** (1971) Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett.* **15**, 232-236.
- Van Weemen, B.K. und Schuurs, A.H.W.M.** (1972) Immunoassay using hapten-enzyme conjugates. *FEBS Lett.* **24**, 77-81.
- Vanderlaan, M., Van Emon, J., Watkins, B. und Stanker, L.** (1987) Monoclonal antibodies for the detection of trace chemicals. In: R. Greenhalgh und T. Roberts (Hrsg.), *Pesticide Science and Biotechnology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, 597-602.
- Weiler, E.W.** (1989) Immunoassay for the quantitation of low molecular weight compounds in plants. In: G. Haug und H. Hoffmann (Hrsg.), *Chemistry of Plant Protection*, Vol. 3. Springer, Berlin, 151-155.
- Weiler, E.W. und Wieczorek, U.** (1981) Determination of femtomol quantities of gibberellic acid by radioimmunoassay. *Planta* **152**, 159-167.
- Welinder, K.G.** (1976) Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase. *FEBS Lett.* **72**, 19-25.
- Weller, M.G.** (1992) Strukturelle und kinetische Untersuchungen zur Entwicklung und Optimierung von Hapten-Enzymimmunoassay (ELISAs) am Beispiel von Triazinherbiziden. *Dissertation*, TU München.
- Wide, L. und Porath, J.** (1966) Radioimmunoassay of proteins with the use of Sephadex™-coupled antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* **130**, 257-260.
- Wisdom, B.G.** (1976) Enzyme-immunoassay. *Clin. Chem.* **22**, 1243-1255.
- Wittmann, C.** (1991) Entwicklung und Anwendung eines Enzymimmunoassays zur quantitativen Bestimmung von Atrazin und der Atrazin-Metaboliten Desethylatrazin, Deisopropylatrazin und Hydroxyatrazin. *Dissertation*, TU München.

- Woollen, B.H., Marsh, J.R., Laird, W.J.D. und Lesser, J.E.** (1992) The metabolism of cypermethrin in man: differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration. *Xenobiotica* **22**, 983-991.
- Wraith, M.J., Hitchings, E.J., Cole, E.R., Cole, D., Woodbridge, A.P. und Roberts, T.R.** (1986) Development of immunoassay methods for pyrethroid insecticides. In: The Sixth IUPAC Congress on Pesticide Chemistry, Ottawa, Canada. Abstract 5C-10.
- Yalow, R.S. und Berson, S.A.** (1959) Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* **184**, 1648-1649.
- Yalow, R.S. und Berson, S.A.** (1960) Immunoassay of endogeneous plasma insulin immunoassay in man. *J. Clin. Invest.* **39**, 1157-1175.
- Yarmush, M.L., Antonsen, K.P., Sundaram, S. und Yarmush, D.M.** (1992) Immunoabsorption: Strategies for antigen elution and production of reusable adsorbents. *Biotechnol. Prog.* **8**, 168-178.
- Yonezawa, S., Kambegawa, A. und Tokudome, S.** (1993) Covalent coupling of a steroid to microwell plates for use in a competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods* **166**, 55-61.
- Zaharko, D.S. und Beck, L.V.** (1968) Studies of a simplified plasma insulin immunoassay using cellulose powder. *Diabetes* **17**, 444-459.
- Zherdev, A.V., Bizova, N.A., Yaropolov, A.I., Lyubimova, N.V., Morozova, O.V. und Dzantiev, B.B.** (1999) Laccase from *Coriolus hisutus* as alternate label for enzyme immunoassay. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **76**, 203-215.

8 ANHANG

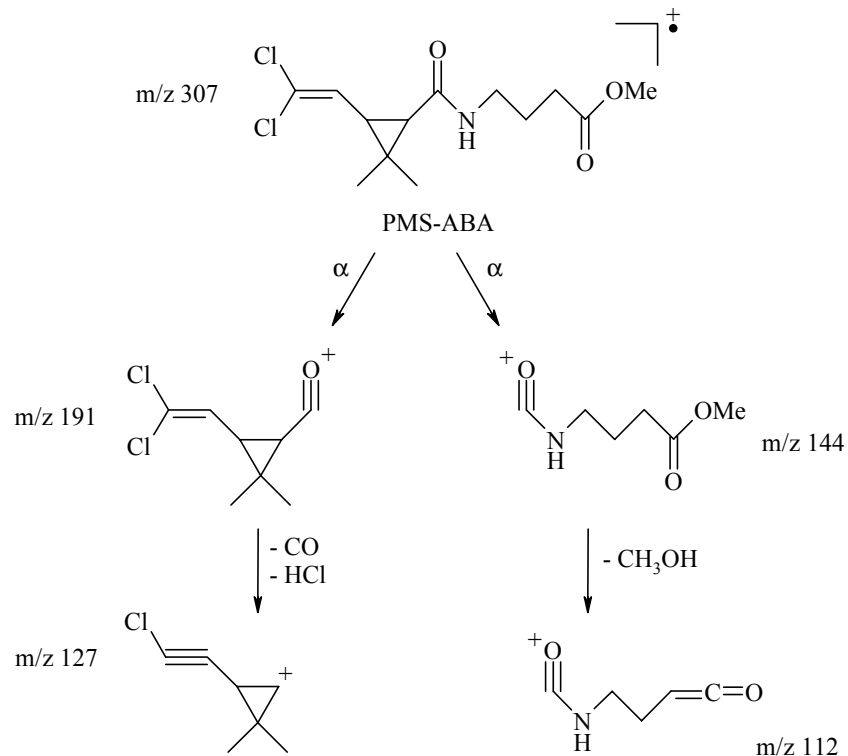
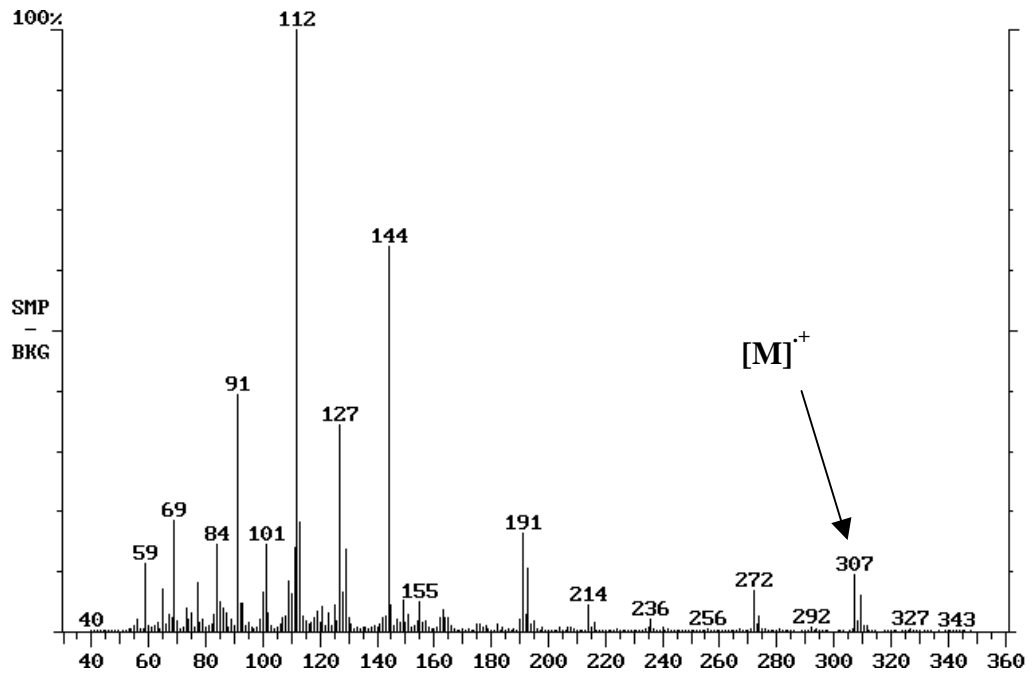
Massenspektren

EI-Massenspektrum und Fragmentierung von PMS-ABA	110
EI-Massenspektrum und Fragmentierung von PMS-AHA	111
EI-Massenspektrum und Fragmentierung von PMS-pOHPE	112
ESI-MS Anionenspektrum von PMS-Glu	113
ESI-MS/MS Anionenspektrum und Fragmentierung von PMS-Glu	114

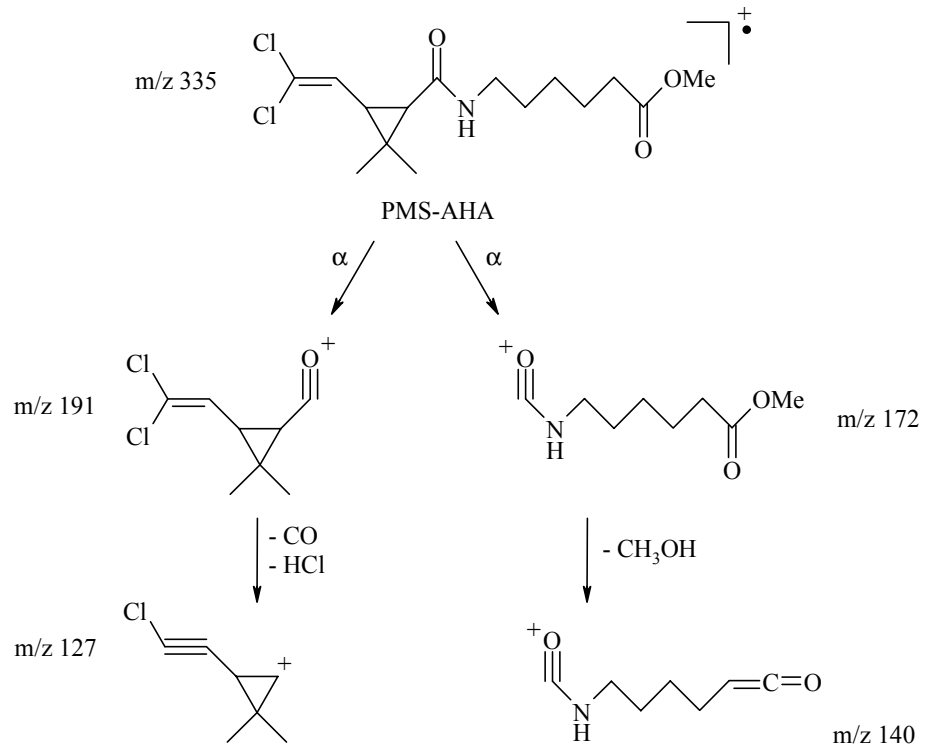
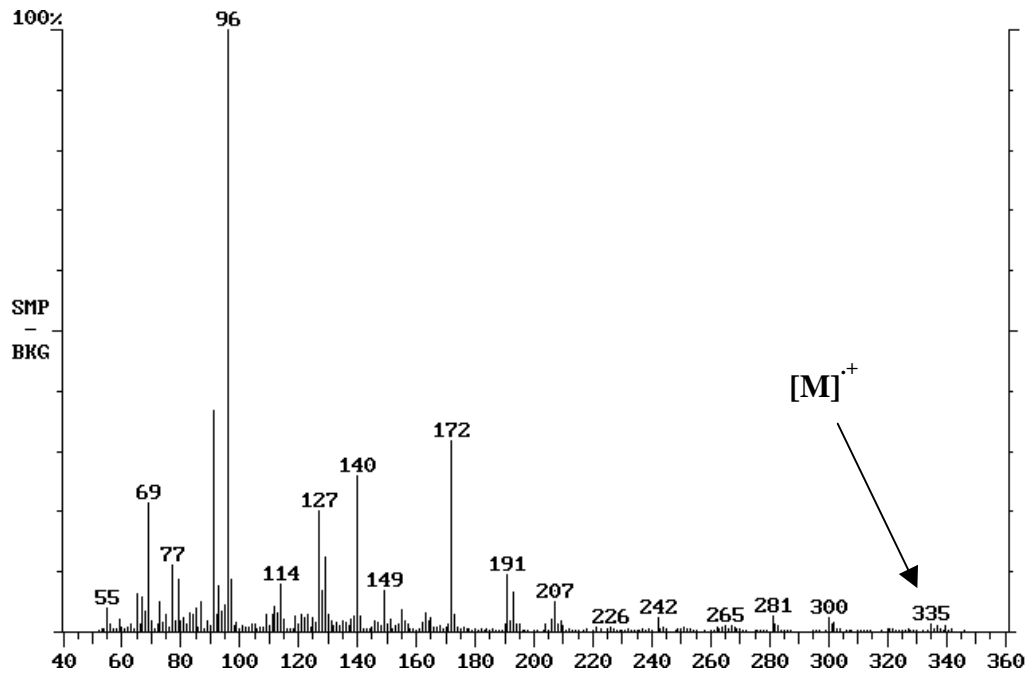
NMR-Daten und Spektren

NMR-Daten von PMS-ABA	115
¹ H-NMR von PMS-ABA	116
¹³ C-NMR von PMS-ABA	117
NMR-Daten von PMS-AHA	118
¹ H-NMR von PMS-AHA	119
¹³ C-NMR von PMS-AHA	120
NMR-Daten von PMS-pOHPE	121
¹ H-NMR von PMS-pOHPE	122
¹³ C-NMR von PMS-pOHPE	123
NMR-Daten von PMS-Glu	124
¹ H-NMR von PMS-Glu	125
¹³ C-NMR von PMS-Glu	126

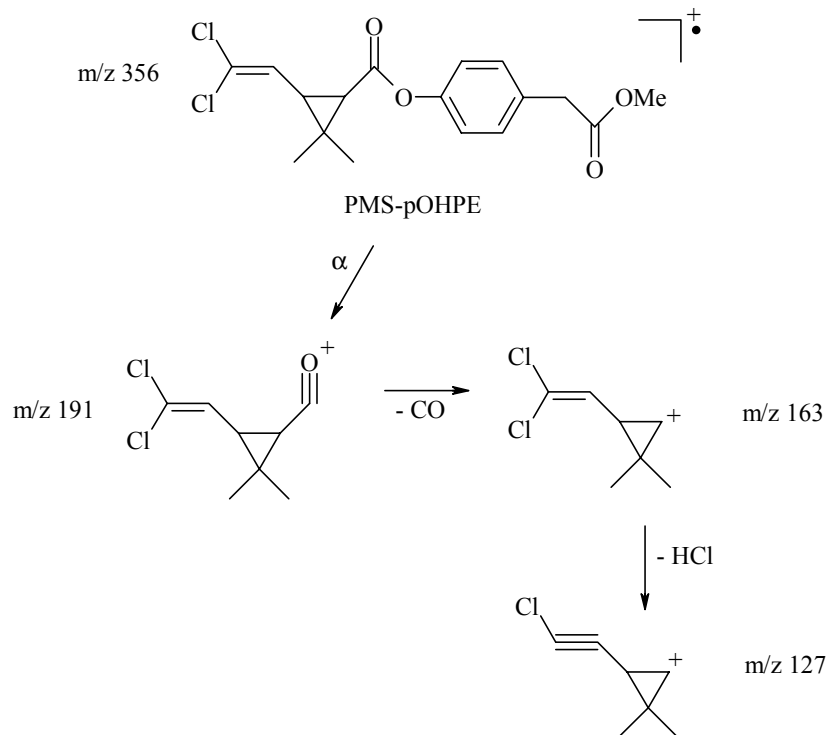
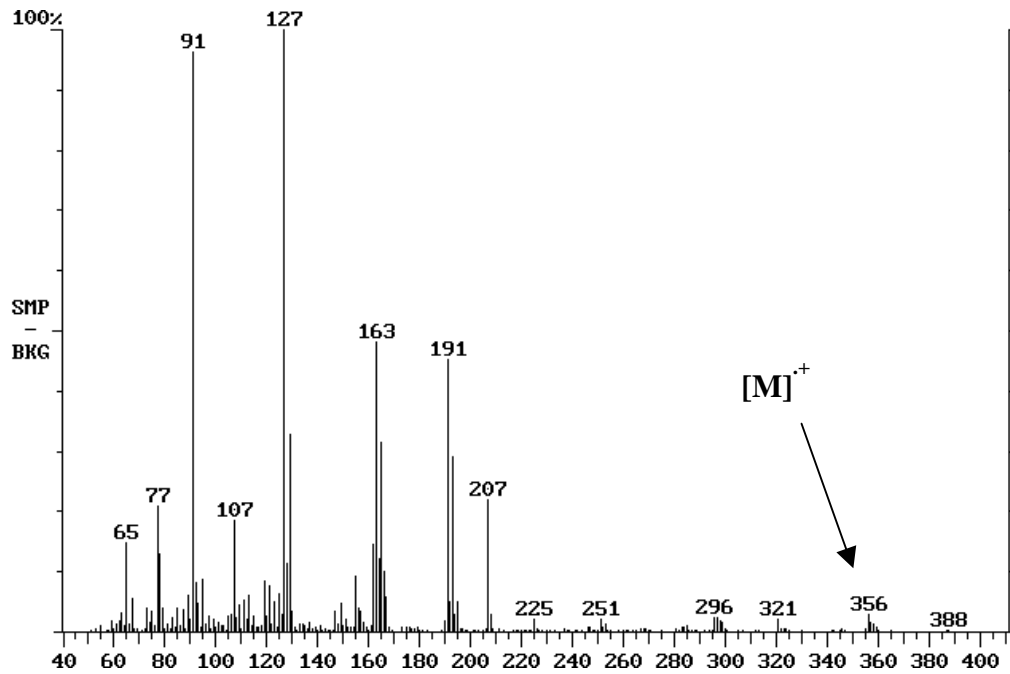
EI-Massenspektrum und Fragmentierung von PMS-ABA



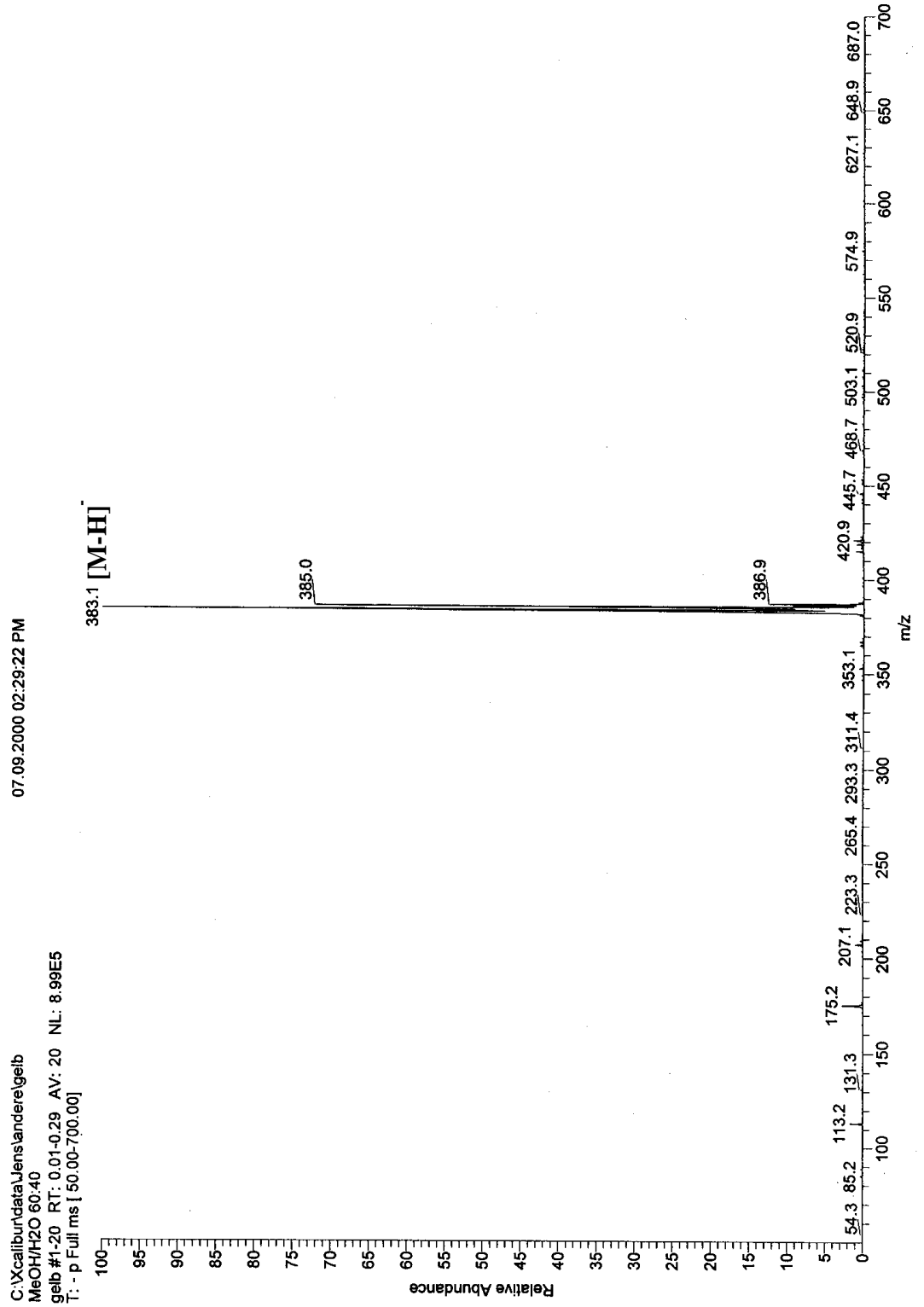
EI-Massenspektrum und Fragmentierung von PMS-AHA



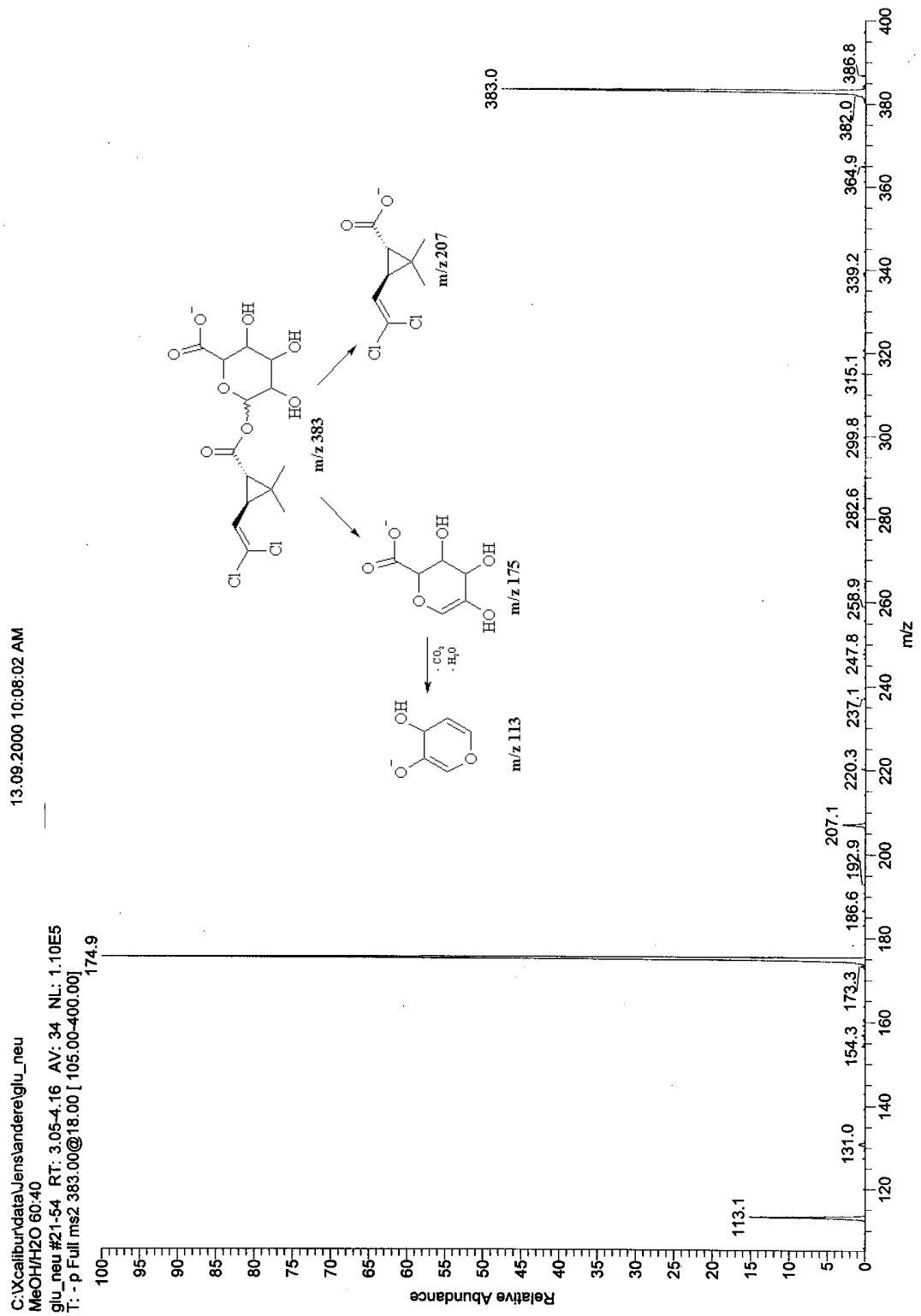
EI-Massenspektrum und Fragmentierung von PMS-pOHPE



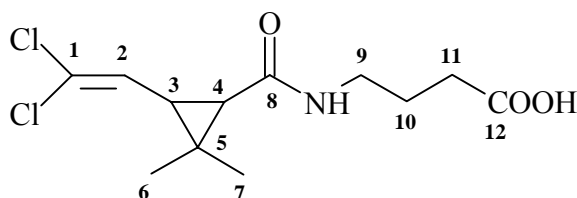
ESI-MS Anionenspektrum von PMS-Glu



ESI-MS/MS Anionenspektrum und Fragmentierung von PMS-Glu



NMR-Daten von PMS-ABA



PMS-ABA (4- {[(1R)-trans-3-(2,2-Dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropan-carbonyl]-amino}-butansäure)

^1H (500.13 MHz, DMSO, δ in ppm, J in Hz)

δ = 1.12 (s, 6 H, 2 x CH_3 ; H6, H7), 1.61 (m, 2 H; H10), 1.68 (d, 1 H; H4), 2.01 (dd, 1 H, $^3\text{J}_{3,4} = 5.2$; H3), 2.20 (t, 2 H; H11), 3.05 (m, 2 H; H9), 6.01 (d, 1 H, $^3\text{J}_{2,3} = 9.2$; H2), 8.03 (t, 1 H, $^3\text{J}_{\text{NH},9} = 5.4$; NH).

^{13}C (125.8 MHz, DMSO, δ in ppm)

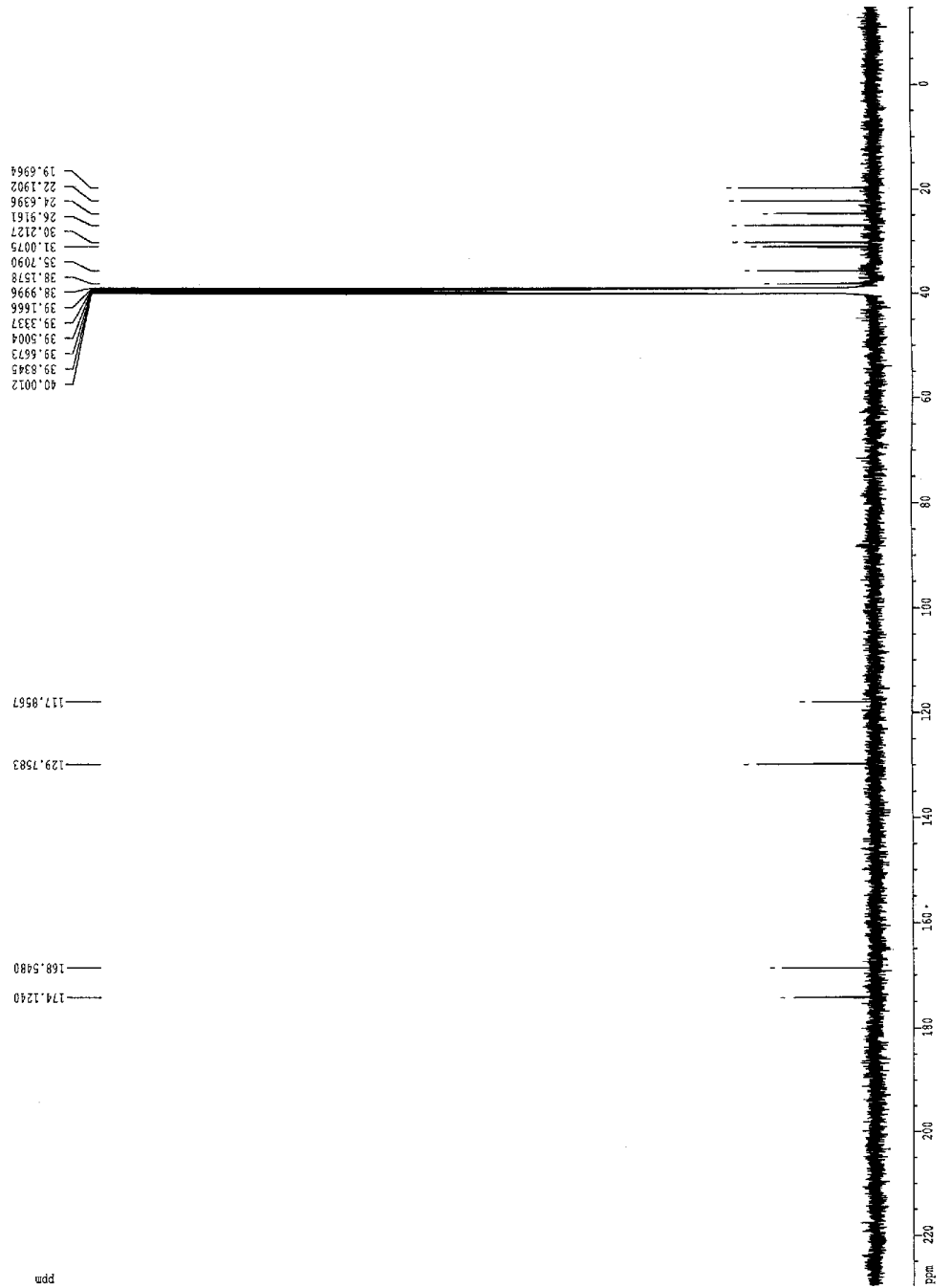
δ = 19.7, 22.2, 24.6, 26.9, 30.2, 31.0, 35.7, 38.2 (C3 – C7, C9 – C11), 117.9 (C2), 129.8 (C1), 168.5 (C8), 174.1 (C12).

¹³C-NMR von PMS-ABA

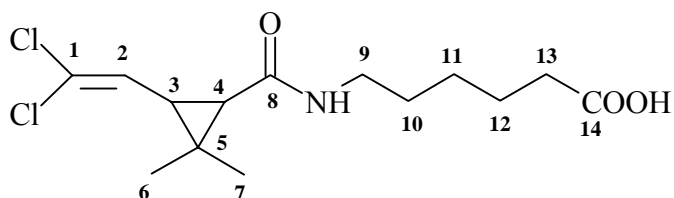
```

Current Data Parameters
NAME          PMSABA
EXPERNO      2
PROCNO       1
-----
F2 - Acquisition Parameters
Date_         9/02/23
Time          16.28
INSTRUM      spect
PROBHD       5 mm BBO
PULPROG      zgpg30
TD           65536
SOLVENT      DMSO
NS           2560
DS           4
SWH           30864.197 Hz
FIDRES       0.470950 Hz
AQ           1.0617332 sec
RG           327.85
SR           1.4255 usec
TE           302.0 K
TR           6.00 usec
TI           1.0000000 sec
D1           0.1000000 sec
D11          0.0000000 sec
D12          0.0000000 sec
-----
===== CHANNEL f1 =====
NUC1          13C
P1           1.30
PR1          6.00 dB
SFO1         125.7713105 MHz
=====
===== CHANNEL f2 =====
NUC2          13C
P2           1.40
PR2          6.00 dB
SFO2         125.7713105 MHz
=====
===== CHANNEL f3 =====
NUC3          13C
P3           1.40
PR3          6.00 dB
SFO3         125.7713105 MHz
=====
===== CHANNEL f4 =====
NUC4          13C
P4           1.40
PR4          6.00 dB
SFO4         125.7713105 MHz
-----
F2 - Processing parameters
SI           32768
SF           125.7683518 MHz
WDW          EM
SSB          0
LB           2.00 Hz
GB           0
PC           1.40
-----
ID MSB plot parameters
CX           34.00 cm
FIP          250.000 ppm
F1           125.7683518 MHz
F2           125.7683518 MHz
F3           125.7683518 MHz
F4           125.7683518 MHz
F5           125.7683518 MHz
F6           125.7683518 MHz
F7           125.7683518 MHz
F8           125.7683518 MHz
F9           125.7683518 MHz
F10          125.7683518 MHz
F11          125.7683518 MHz
F12          125.7683518 MHz
F13          125.7683518 MHz
F14          125.7683518 MHz
F15          125.7683518 MHz
F16          125.7683518 MHz
F17          125.7683518 MHz
F18          125.7683518 MHz
F19          125.7683518 MHz
F20          125.7683518 MHz
F21          125.7683518 MHz
F22          125.7683518 MHz
F23          125.7683518 MHz
F24          125.7683518 MHz
F25          125.7683518 MHz
F26          125.7683518 MHz
F27          125.7683518 MHz
F28          125.7683518 MHz
F29          125.7683518 MHz
F30          125.7683518 MHz
F31          125.7683518 MHz
F32          125.7683518 MHz
F33          125.7683518 MHz
F34          125.7683518 MHz
F35          125.7683518 MHz
F36          125.7683518 MHz
F37          125.7683518 MHz
F38          125.7683518 MHz
F39          125.7683518 MHz
F40          125.7683518 MHz
F41          125.7683518 MHz
F42          125.7683518 MHz
F43          125.7683518 MHz
F44          125.7683518 MHz
F45          125.7683518 MHz
F46          125.7683518 MHz
F47          125.7683518 MHz
F48          125.7683518 MHz
F49          125.7683518 MHz
F50          125.7683518 MHz
F51          125.7683518 MHz
F52          125.7683518 MHz
F53          125.7683518 MHz
F54          125.7683518 MHz
F55          125.7683518 MHz
F56          125.7683518 MHz
F57          125.7683518 MHz
F58          125.7683518 MHz
F59          125.7683518 MHz
F60          125.7683518 MHz
F61          125.7683518 MHz
F62          125.7683518 MHz
F63          125.7683518 MHz
F64          125.7683518 MHz
F65          125.7683518 MHz
F66          125.7683518 MHz
F67          125.7683518 MHz
F68          125.7683518 MHz
F69          125.7683518 MHz
F70          125.7683518 MHz
F71          125.7683518 MHz
F72          125.7683518 MHz
F73          125.7683518 MHz
F74          125.7683518 MHz
F75          125.7683518 MHz
F76          125.7683518 MHz
F77          125.7683518 MHz
F78          125.7683518 MHz
F79          125.7683518 MHz
F80          125.7683518 MHz
F81          125.7683518 MHz
F82          125.7683518 MHz
F83          125.7683518 MHz
F84          125.7683518 MHz
F85          125.7683518 MHz
F86          125.7683518 MHz
F87          125.7683518 MHz
F88          125.7683518 MHz
F89          125.7683518 MHz
F90          125.7683518 MHz
F91          125.7683518 MHz
F92          125.7683518 MHz
F93          125.7683518 MHz
F94          125.7683518 MHz
F95          125.7683518 MHz
F96          125.7683518 MHz
F97          125.7683518 MHz
F98          125.7683518 MHz
F99          125.7683518 MHz
F100         125.7683518 MHz
-----

```



NMR-Daten von PMS-AHA



PMS-AHA (6-[[[(1R)-trans-3-(2,2-Dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropan-carbonyl]-amino}-hexansäure)

^1H (500.13 MHz, DMSO, δ in ppm, J in Hz)

δ = 1.12 (s, 6 H, 2 x CH_3 ; H6, H7), 1.24, 1.37, 1.48 (m, 3 x CH_2 ; H10 – H12), 1.67 (d, 1 H; H4), 2.01 (dd, 1 H, $^3J_{3,4} = 5.2$; H3), 2.17 (t, 2 H, $^3J_{13,12} = 7.4$; H13), 3.02 (m, 2 H; H9), 6.00 (d, 1 H, $^3J_{2,3} = 9.2$; H2), 7.98 (t, 1 H, $^3J_{\text{NH},9} = 5.5$; NH).

^{13}C (125.8 MHz, DMSO, δ in ppm)

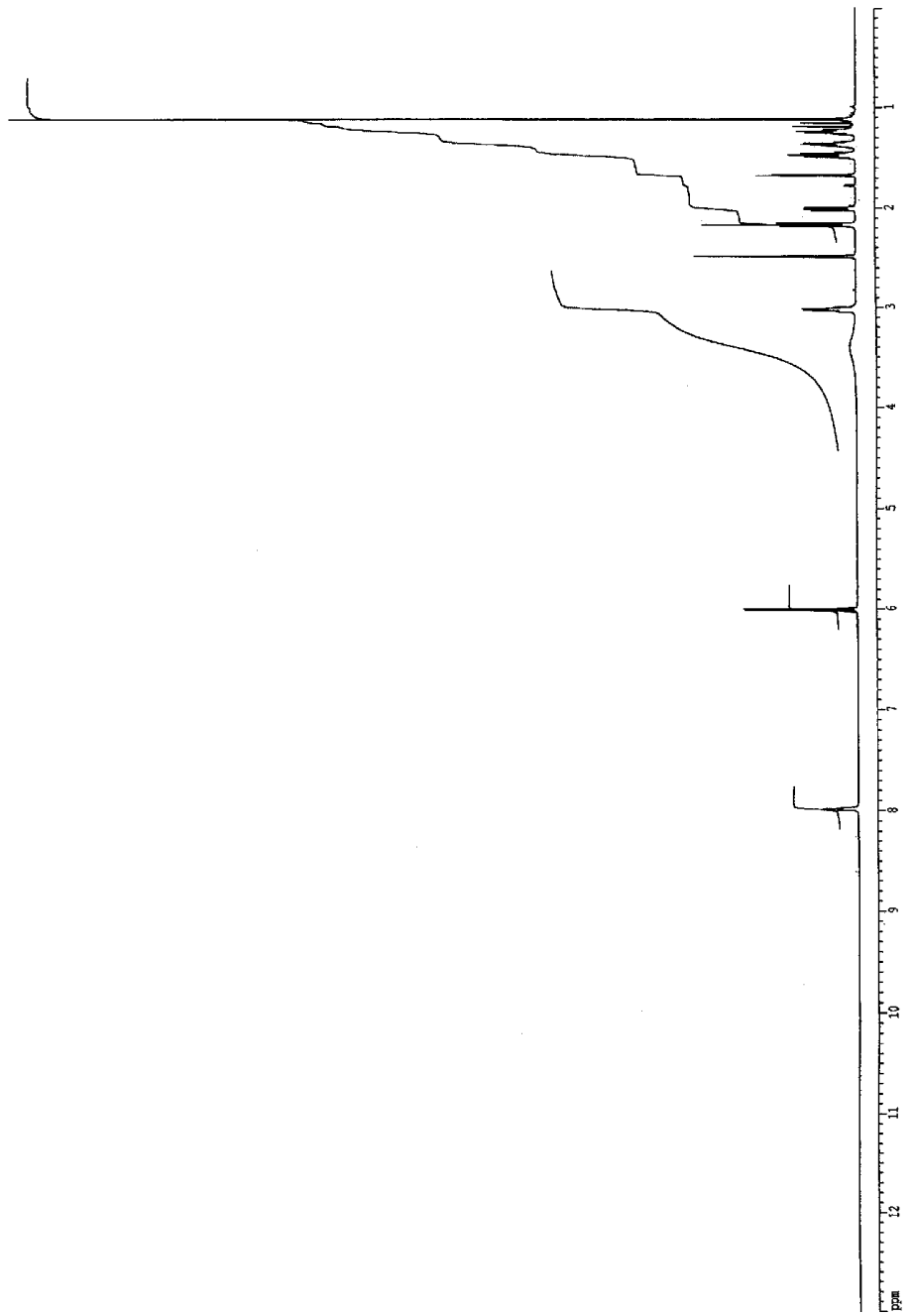
δ = 19.7, 22.2, 24.2, 25.9, 26.9, 28.9, 30.2, 33.6, 35.7, 38.6 (C3 – C7, C9 – C13), 117.8 (C2), 129.8 (C1), 168.4 (C8), 174.4 (C14).

¹H-NMR von PMS-AHA

```

CURRENT DATA PARAMETERS
NAME      PMS-AHA
EXPNO    1
PROCNO   1
-----
F2 - Acquisition Parameters
Date_    200202
Time     12.52
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm BBI 1H-
PULPROG  zgpg30
TD       65536
SOLVENT  DMSO
NS       8
DS       2
SWH      6921.600 Hz
AQ       0.22000000 sec
RG       1.6213508 Hz
SC       120
DM       55.500 UHMC
DC       0.00000000 sec
DE       300.0 UHMC
TE       0.20000000 sec
D1       0.20000000 sec
-----
===== CHANNEL f1 =====
NUC1      1H
P1        9.40 UHMC
PAL       2.00 dB
SFO1     500.130885 MHz
-----
F2 - Processing parameters
SI        1.6384
SF       500.130105 MHz
WDW      dm
SSB      0
GB       0
CB       0
PC       1.00
-----
ID MSB plus parameters
CA       34.00 cm
F1P     13.000 ppm
F1      631.69 Hz
F2P     0.000 ppm
F2      0.00 Hz
FREQH   0.38235 ppm/cm
HSCN    191.22618 Hz/cm

```



¹³C-NMR von PMS-AHA

```

Current Data Parameters
NAME      PMSAHA
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    990223
Time     5:17
INSTRUM  zgpg30
PROBHD   5 mm BBI 1H-1
PULPROG  zgpg30
TD       65536
AQ       0.48625
RG       4096
SFO      125.760361 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB       2.00 Hz
GB       0
PC       1.10

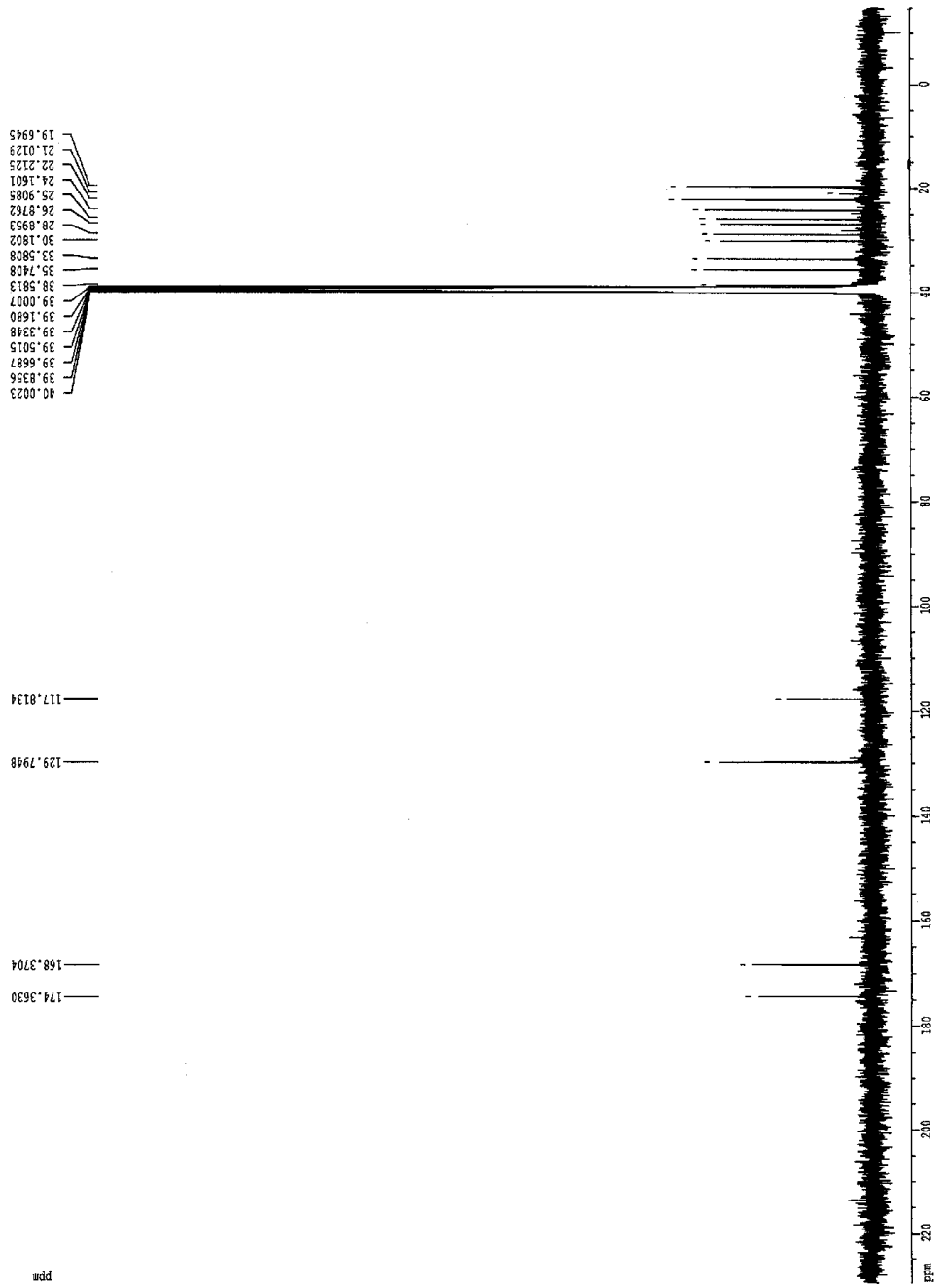
ID MSB plot parameters
CX      34.00 cm
FIP     230.000 ppm
F2P     230.000 ppm
F2Q     230.000 ppm
F2R     -1886.37 Hz
F2S     7.20588 ppm/cm
SFOCN   906.19835 Hz/cm

F2 - Processing parameters
SI      32768
SF      125.760361 MHz
WDW     EM
SSB     0
LB     2.00 Hz
GB     0
PC     1.10

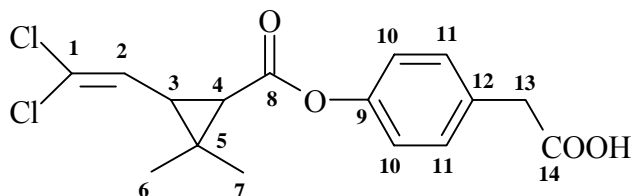
===== CHANNEL f1 =====
NUC1    13C
P1      8.60 usec
PC1     0.00 dB
SFO1    125.761815 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPROG2  waltz16
NUC2    1H
P2      65.00 usec
PC2     2.00 dB
SFO2    500.1320005 MHz

===== CHANNEL f3 =====
CPROG3  waltz16
NUC3    13C
P3      8.60 usec
PC3     0.00 dB
SFO3    125.761815 MHz
    
```



NMR-Daten von PMS-pOHPE



PMS-pOHPE ((1R)-trans-3-(2,2-Dichlorvinyl)-2,2-dimethyl-cyclopropan-carbon-säure 4-carboxymethyl-phenylester)

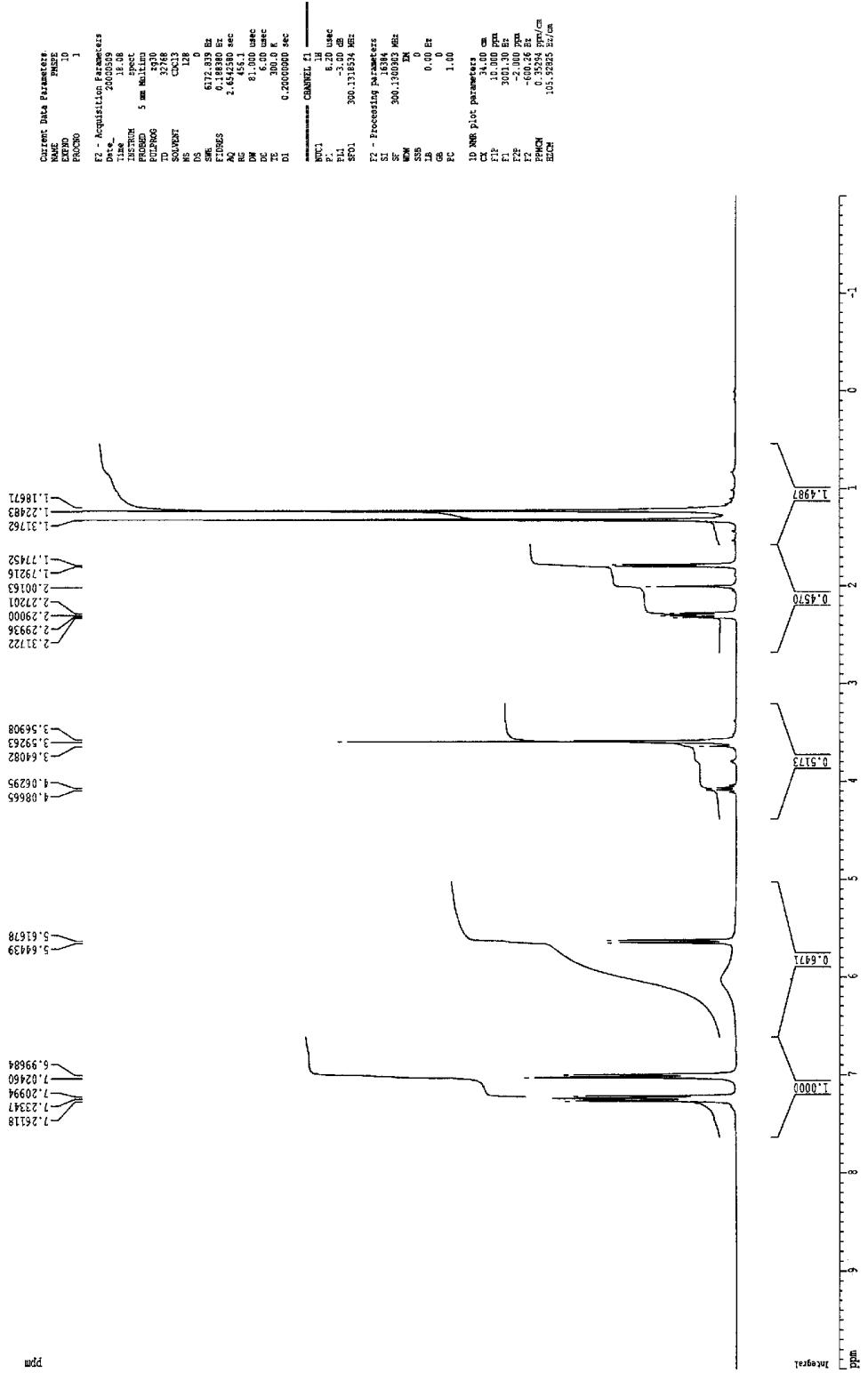
^1H (300.13 MHz, CDCl_3 , δ in ppm, J in Hz)

$\delta = 1.22$ (2s, 6 H, 2 x CH_3 ; H6, H7), 1.78 (d, 1 H; H4), 2.29 (dd, 1 H, $^3J_{3,4} = 5.4$; H3), 3.59 (s, 2 H; H13), 5.63 (d, 1 H, $^3J_{2,3} = 8.3$; H2), 6.99 - 7.26 (m, 4 H; H10, H11).

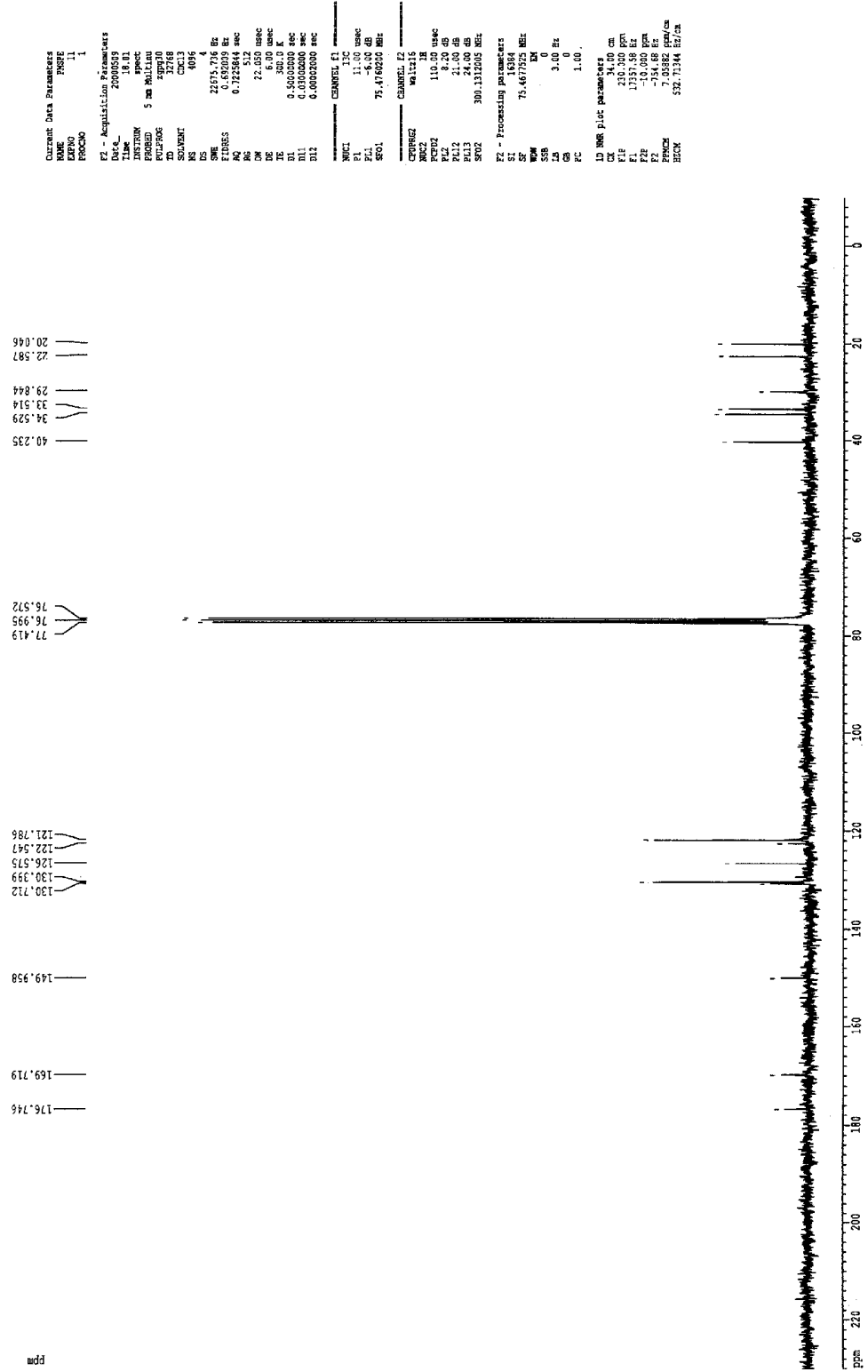
^{13}C (75.5 MHz, CDCl_3 , δ in ppm)

$\delta = 20.5, 22.6$ (C6, C7), 29.8 (C5), 33.5, 34.5 (C3, C4), 40.2 (C13), 121.8 (C2), 122.5 (C11), 126.6 (C12), 130.4 (C10), 130.7 (C1), 169.7 (C8), 176.7 (C14).

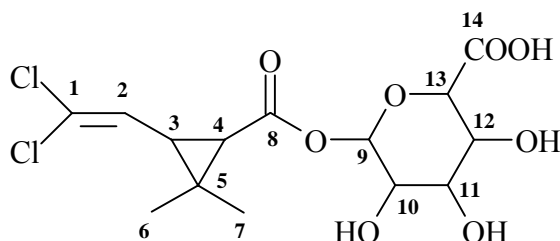
¹H-NMR von PMS-pOHPE



¹³C-NMR von PMS-pOHPE



NMR-Daten von PMS-Glu



PMS-Glu (6-[(1R)-trans-3-(2,2-Dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropan-carbonyloxy]-3,4,5-trihydroxy-tetrahydropyran-2-carbonsäure)

^1H (500.13 MHz, D_2O , δ in ppm, J in Hz)

$\delta = 1.19$ (s, 6 H, 2 x CH_3 ; H6, H7), 1.86 (d, 1 H; H4), 2.26 (dd, 1 H, $^3J_{3,4} = 5.4$; H3), 3.42 – 3.58 (m, 3 x 1 H; H10 – H12), 3.92 (d, 1 H, $^3J_{13,12} = 8.9$; H13), 5.54 (d, 1 H, $^3J_{2,3} = 8.0$; H2), 5.84 (d, 1 H, $^3J_{9,10} = 8.0$; H9).

^{13}C (125.8 MHz, D_2O , δ in ppm)

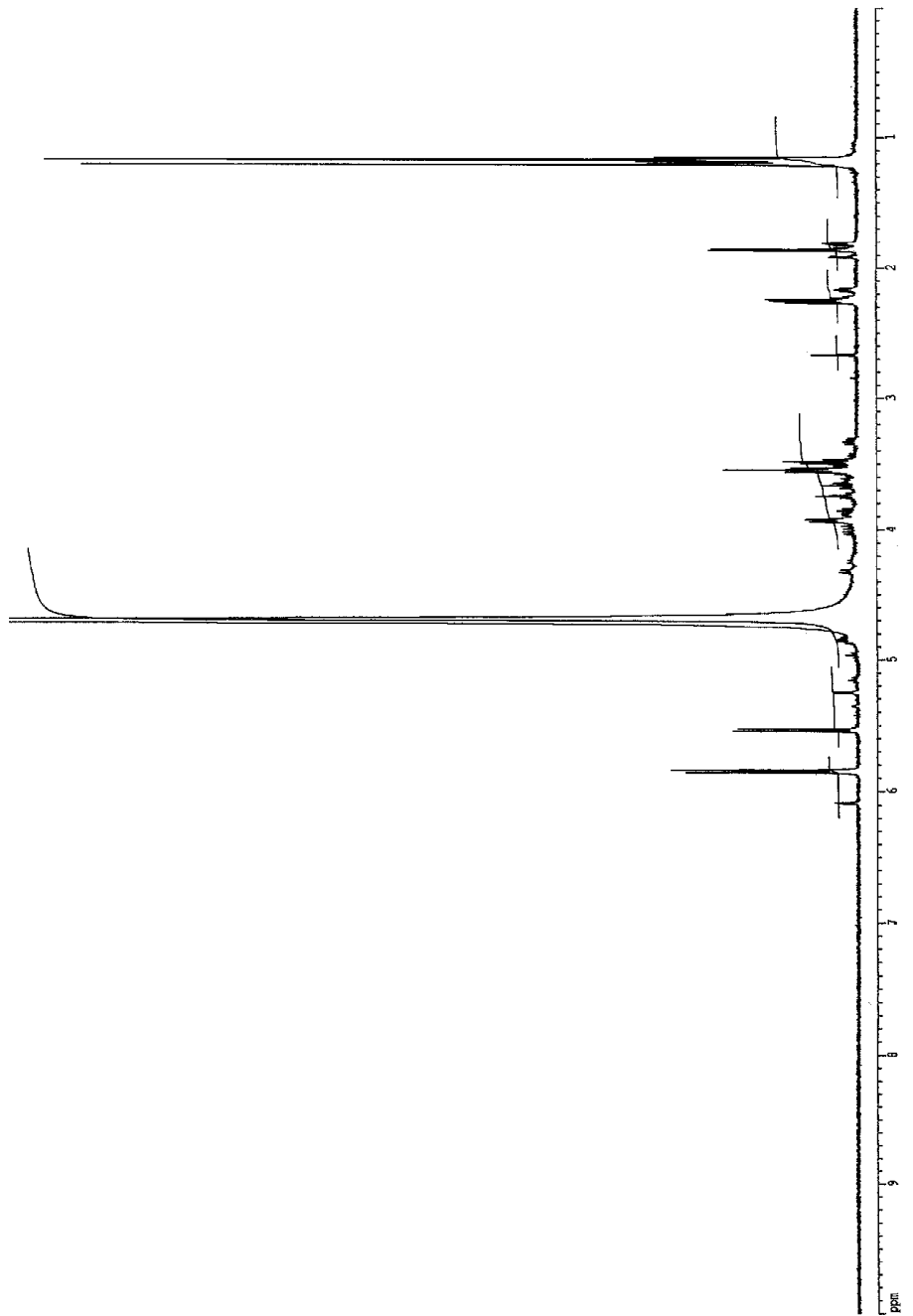
$\delta = 19.8, 19.9, 21.8, 30.2, 31.0, 33.6, 34.2, 34.4, 34.6$ (C3 – C7), 70.2, 70.7, 71.7, 72.0, 73.0, 73.7, 74.3, 75.6, 76.3 (C10 – C13), 94.1 (C9), 121.8 (C2), 127.4, 127.6 (C1), 172.6 (C8, C14).

¹H-NMR von PMS-Glu

```

Current Data Parameters
NAME          Paramch  1
PROCNO       1
F2 - Acquisition Parameters
Date_        20000912
Time         11.37
PROBHD      5 mm Nal3QNP
PULPROG     zgpg30
TD          32768
SOLVENT     DMSO
NS          2000
DS          2
SWH         8992.806 Hz
FIDRES     0.274439 Hz
AQ         1.481831446 s
RG         320
DM         55.600 uMsec
DE         5.50 uMsec
TE         300.2 K
D1         0.20000000 sec
----- CHANNEL f1 -----
NUC1        1H
P1          9.10 uMsec
PL1         2.10 dB
SFO1       500.1370665 MHz
F2 - Processing parameters
SI          500.1370664 MHz
SF          500.1370664 MHz
WDW         EM
SSB         0
LB          0.000000 Hz
GB          0
PC          1.00
D0 NMR plot parameters
SI          500.1370664 MHz
F2P        10.000 GHz
F1         5001.30 Hz
F2P        0.000 GHz
F1         0.000 GHz
FIDRES     0.274439 Hz
AQ         1.481831446 s
TE         300.2 K
D1         0.20000000 sec

```



Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich diese Arbeit selbständig verfaßt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Lebenslauf

Name, Vorname Willenborg, Ralf
Geburtsdatum 06.06.1971
Geburtsort Friesoythe
Familienstand ledig

Schulbildung

1977-1981 Grundschule Altenoythe
1981-1983 Orientierungsstufe Altenoythe
1983-1990 Gymnasium Friesoythe, Abitur

Studium

10/1990 – 06/1996 Studiengang Diplom-Chemie an der Carl-von-Ossietzky
Universität Oldenburg
12/1992 Diplom-Chemiker Vorprüfung
06/1996 Abschluß des Studiums mit der Diplomarbeit im Arbeits-
kreis von Prof. Dr. Werner Butte
Titel: *Kinetik der Akkumulation und Clearance von Triclo-
pyr und Picloram in Zebrafischen*
seit 02/1998 Doktorarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Werner Butte
Titel: *Entwicklung eines Enzymimmunoassays zum Nach-
weis von Permethrinsäure [(1RS)-trans-3-(2,2-Dichlorvinyl)-
2,2-dimethylcyclopropancarbonsäure] in Urin*

Berufstätigkeit

11/1996 – 11/2000 Wissenschaftlicher Angestellter, Carl-von-Ossietzky Uni-
versität Oldenburg