

**Versuche zur Gewinnung von
katalytischen Antikörpern zur Hydrolyse
von Arylcarbamaten und Arylharnstoffen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin „Biochemie“

vorgelegt an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von

Deljana Werner
geb. am 16.03.1968 in Sopot

Potsdam, März 2002

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Monoklonale Antikörper gegen Haptene	1
1.3	Katalytische Antikörper	2
1.3.1	Methoden zur Generierung katalytischer Antikörper	3
1.3.1.1	Immunisierung mit einem Übergangszustandsanalogon	3
1.3.1.2	Antiidiotypischer Ansatz	5
1.3.1.3	Weitere Methoden	5
1.3.2	Natürlich existierende Abzyme	6
1.3.3	Antikörper-katalysierte Reaktionen	7
1.3.3.1	Hydrolytische Reaktionen	7
1.3.3.2	Weitere Reaktionen	9
1.3.4	Potenzielle Anwendungen von katalytischen Antikörpern	9
1.5	Zielstellung	11
2.	Materialien und Methoden	13
2.1	Substanzen und Immunoreagenzien	13
2.1.1	Substrate	14
2.1.1.1	Arylcarbamate	14
2.1.1.2	Arylharnstoffe	16
2.1.2	Potenzielle Produkte der Hydrolysereaktionen	18
2.1.3	Übergangszustandsanaloga	19
2.1.3.1	Phosphorhaltige Übergangszustandsanaloga	19
2.1.3.2	Schwefelhaltige Übergangszustandsanaloga	19
2.2	Kopplung von Haptenen an Proteine	19
2.2.1	Kopplung von Haptenen mit freier Aminogruppe über Glutaraldehyd	20
2.2.2	Kopplung von Haptenen mit freier Aminogruppe über 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino- propyl)-carbodiimid HCl (EDC)	21
2.2.3	Kopplung von Haptenen mit freier Aminogruppe über Disuccinimidylsuberat (DSS)	22
2.2.4	Kopplung von Haptenen mit freier Carboxylgruppe über EDC/NHS	23
2.2.4	Kopplung von Haptenen mit freier Chloracetylgruppe über Traut's Reagenz	24

2.3	Herstellung von monoklonalen Antikörpern	25
2.3.1	Immunisierungen	25
2.3.2	Hybridomtechnik und Zellkultivierung	25
2.3.3	Reinigung von Immunoglobulinen	29
2.3.3.1	Affinitätschromatographie an Protein A oder Protein L	30
2.3.3.2	Ionenaustauschchromatographie an Bakerbond ABx	31
2.3.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	31
2.3.5	Umpuffern und Einengen der Antikörper	31
2.4	Charakterisierung der monoklonalen Antikörper	32
2.4.1	Bindungsassays	32
2.4.2	Kompetitive Immunoassays	33
2.4.3	Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante mittels BIACORE®	34
2.5	Nachweis der hydrolytischen Aktivität der monoklonalen Antikörper	34
2.5.1	Nachweis der Substratabnahme mit Anti-Substrat-Antikörpern	35
2.5.2	Nachweis der Produktentstehung	37
2.5.2.1	Detektion von Anilinen mit Dimethylzimaldehyd	37
2.5.2.2	Detektion von Phenolen	39
2.5.2.2.1	Amperometrische Detektion von Phenolen	39
2.5.2.2.2	Detektion von Phenolen mit HPLC	40
2.6	Kinetische Untersuchungen	41
2.7	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Tests mit Antikörpern gegen Diuron	42
2.7.1	<i>In vitro</i> Tests an isolierten Thylakoiden	43
2.7.2	<i>In vivo</i> Tests an intakten Algen	44
3.	Ergebnisse	47
3.1	Charakterisierung der Hapten-Protein-Konjugate	47
3.1.1	Kopplung von Haptenen mit freier Aminogruppe an Proteine	47
3.1.2	Kopplung von Haptenen mit freier Carboxylgruppe an Proteine	48
3.1.3	Kopplung von Haptenen mit freier Chloracetylgruppe an Proteine	48
3.2	Gewinnung, Charakterisierung und Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen Substrate	48
3.2.1	Antikörper gegen OC2	49
3.2.2	Antikörper gegen Diuron	50
3.3	Gewinnung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen potenzielle Produkte der hydrolytischen Reaktion	57
3.3.1	Antikörper gegen POCc10	58
3.3.2	Antikörper gegen POCc17	60

3.3.3	Antikörper gegen H1	60
3.3.4	Antikörper gegen H6	60
3.4	Gewinnung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen ÜZA	61
3.4.1	Antikörper gegen Hei3	63
3.4.2	Antikörper gegen OC4	64
3.4.3	Antikörper gegen OC7	65
3.4.4	Antikörper gegen POCs14	66
3.5	Nachweis der hydrolytischen Aktivität der monoklonalen Antikörpern gegen ÜZA	66
3.5.1	Nachweis der Substratabnahme mit dem Anti-Substrat-Antikörper B76-BF5	66
3.5.2	Nachweis der Entstehung potenzieller Spaltprodukte	66
3.5.2.1	Detektion von POCc10 mit Anti-Produkt-Antikörpern	66
3.5.2.2	Detektion von Anilinen mit Dimethylaminozimtaldehyd	67
3.5.2.3	Detektion von Phenolen	68
3.5.2.3.1	Amperometrische Detektion von Phenolen	68
3.5.2.3.2	Detektion von Phenolen mit HPLC	74
3.6	Kinetische und thermodynamische Charakterisierung des hydrolytischen Antikörpers N1-BC1-D11	75
4.	Diskussion	83
4.1	Haptene und Hapten-Protein-Konjugate	83
4.2	Gewinnung, Charakterisierung und Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen Substrate	88
4.2.1	Antikörper gegen OC2	88
4.2.2	Antikörper gegen Diuron	88
4.3	Gewinnung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen potenzielle Produkte der hydrolytischen Reaktion	94
4.3.1	Antikörper gegen POCc10	95
4.3.2	Antikörper gegen POCc17	95
4.3.3	Antikörper gegen H1	95
4.3.4	Antikörper gegen H6	95

4.4	Gewinnung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen ÜZA	96
4.4.1	Antikörper gegen Hei3, OC4 und OC7	96
4.4.2	Antikörper gegen POCs14	97
4.5	Nachweis der hydrolytischen Aktivität der monoklonalen Antikörpern gegen ÜZA	98
4.5.1	Nachweis der Substratabnahme mit dem Anti-Substrat-Antikörper B76-BF5	98
4.5.2	Nachweis der Entstehung potenzieller Spaltprodukte	100
4.5.2.1	Detektion von POCc10 mit Anti-Produkt-Antikörpern	100
4.5.2.2	Detektion von Anilinen mit Dimethylaminozimtaldehyd	100
4.5.2.3	Detektion von Phenolen	101
4.5.2.3.1	Amperometrische Detektion von Phenolen	101
4.5.2.3.2	Detektion von Phenolen mit HPLC	103
4.6	Kinetische und thermodynamische Charakterisierung des hydrolytischen Antikörpers N1-BC1-D11	103
4.7	Hydrolysemechanismus bei Carbamaten und Harnstoffen	109
4.8	Urease	114
4.9	Ausblick	115
5.	Zusammenfassung	116
6.	Literaturverzeichnis	118
7.	Abkürzungsverzeichnis	129
8.	Danksagung	130
9.	Anhang	I-V

1. Einleitung

1.1 Einführung

Die Bindung zwischen Antikörper und Antigen erfolgt wie die Bindung zwischen Enzym und Substrat nach dem Prinzip der molekularen Erkennung von komplementären Strukturen. Die Antikörper wurden im Laufe der Evolution zur spezifischen Erkennung von körperfremden Substanzen optimiert. Die hohe Spezifität und Bindungsstärke der Antikörper wird in den Biowissenschaften vielseitig benutzt. Besonders seit der Einführung der Hybridomtechnik durch Köhler und Milstein (1975), die es erlaubt, große Mengen Antikörper in gleichbleibender Qualität herzustellen, nahm die Entwicklung der Immunotechnologie einen rasanten Verlauf. Seit etwa 20 Jahren wird intensiv versucht, Antikörper mit neuen Eigenschaften herzustellen. Zu diesen zählen z.B. katalytische, antiidiotypische, bispezifische, rekombinante und chimäre Antikörper. Von besonderem Interesse sind katalytische Antikörper oder Abzyme (vom engl. antibody – Ab und enzyme), die Reaktionen katalysieren, für die keine geeigneten Katalysatoren bekannt sind. Eine dieser Reaktionen ist die Hydrolyse von Arylcarbamat- und Arylharnstoffherbiziden. Solche einzigartigen Abzyme könnten in der Umweltanalytik oder bei der Generierung Herbizid-toleranter Pflanzen angewendet werden. Darüber hinaus könnten sie zum Verständnis der Hydrolysemechanismen beitragen.

1.2 Monoklonale Antikörper gegen Haptene

Das Immunsystem von Säugetieren kann nur dann Antikörper gegen Haptene (kleine Moleküle; MW < 5 kDa) produzieren, wenn diese an große, immunogene Moleküle gekoppelt sind. Säugetiere, vor allem Inzuchtmäuse, werden mit diesen Konjugaten immunisiert. Die Antikörper-produzierenden Milzzellen werden mit Myelomzellen fusioniert. Von den erhaltenen Klonen werden diejenigen selektiert, deren Antikörper das Hapten spezifisch binden. Diese werden dann vereinzelt, um sicher zu stellen, dass sie Nachkömmlinge einer einzelnen Antikörper-produzierenden Zelle sind (monoklonale Antikörper) (Galfre et al., 1977). Durch die Kultivierung der entstandenen Zelllinien können theoretisch unbegrenzte Mengen Antikörper gewonnen werden.

Die Gewinnung von monoklonalen Antikörpern erfordert viele Optimierungsschritte, beginnend mit der Kopplung des Haptens an Trägerproteine, über die Immunisierungsschemata und die Screeningmethoden. Obwohl es oft Monate dauert, bis ein spezifischer monoklonaler Antikörper etabliert ist, ist diese Methode heute noch das am häufigsten eingesetzte Verfahren zur Gewinnung von spezifischen Antikörpern.

1.3 Katalytische Antikörper

Antikörper entstanden als Teil des Immunsystems, spezialisiert, verschiedene Fremdsubstanzen (Antigene) zu binden und mit Hilfe anderer Komponenten des Immunsystems zu neutralisieren. Die wichtigste Funktion eines Enzyms dagegen ist die Beschleunigung einer (oder mehrerer) chemischen Reaktion(en). Einige Tausend Enzyme reichen anscheinend völlig aus, um alle notwendigen Stoffwechselreaktionen durchzuführen. Das Immunsystem wird dagegen täglich mit unvorhersehbaren Herausforderungen konfrontiert und muss innerhalb kürzester Zeit eine Immunantwort gegen beliebige Antigene liefern können. Daher resultiert die extreme Anzahl und Vielfalt der Antikörper (mehr als 10^{10} verschiedene Antikörper pro Individuum gegen nahezu jede Fremdsubstanz). Diese enorme Vielfalt von Antikörpern wird durch Rekombination und somatische Mutation der Gensegmente, die die variablen Domänen der leichten und schweren Kette kodieren, gesichert (Tonegawa, 1983).

Antikörper und Enzyme üben ihre Funktion durch Bindung an die entsprechende Substanz (Antigen bzw. Substrat) aus. Beide besitzen spezifische Bindungsstellen. Die Bindung des Targetmoleküls ist sehr ähnlich und erfolgt überwiegend über nichtkovalente Wechselwirkungen mit den Aminosäuren-Seitenketten wie Wasserstoffbrücken, ionische und hydrophobe Wechselwirkungen und van-der-Waals-Kräfte. Bei den enzymatischen Reaktionen können auch kovalente Intermediate auftreten.

Die Enzyme binden das Substrat und senken die Aktivierungsenergie der chemischen Reaktion. Dadurch wird das gebundene Substrat verändert. Es wurde lange Zeit angenommen, dass Antikörper die gebundenen Antigene nicht verändern können. Bei Untersuchungen an Myohemerythrin stellten Lerner and Tramontano 1988 fest, dass der Antikörper nicht nur bindet, sondern sein Antigen so verändert, dass ursprünglich verborgene Aminosäuren des Myohemerythrins an der Bindung beteiligt und somit für diese unerlässlich werden. D.h. der Antikörper verwendet hier die Bindungsenergie, ähnlich wie ein Enzym, um das gebundene Molekül zu transformieren.

Aufgrund der Analogie im Bindungsverhalten und der Ähnlichkeit in der Struktur liegt die Vermutung nahe, dass einige der Antikörper katalytische Wirkung haben könnten und aufgrund der enormen Vielfalt der Antikörper auch solche chemischen Reaktionen beschleunigen könnten, für die keine natürlichen Enzyme bekannt sind.

1.3.1 Methoden zur Generierung katalytischer Antikörper

1.3.1.1 Immunisierung mit einem Übergangszustandsanalogon

Bei chemischen Reaktionen durchläuft das Substratmolekül einen kurzlebigen Übergangszustand, bevor es in das Produkt umgewandelt wird. Ein Prinzip der Enzymkatalyse ist die Bindung des Übergangszustandes einer chemischen Reaktion an ein Enzym (Pauling, 1948). Durch diese Bindung wird der Übergangszustand energetisch stabilisiert und die Reaktion kann mit einer hohen Beschleunigungsrate (bis zu 10^{17}) ablaufen. Das Enzym wirkt als Katalysator, weil das entstehende Produkt wegdiffundiert und das Enzym ein neues Molekül binden und transformieren kann. Der Übergangszustand ist kurzlebig und kann für praktische Zwecke nicht isoliert oder synthetisiert werden. Chemisch stabile Analoga des Übergangszustandes (in Größe, Form und Ladung) können jedoch hergestellt werden. Pauling postulierte weiterhin, dass Übergangszustandsanaloga (ÜZA) aufgrund ihrer Komplementarität stärker als das eigentliche Substrat im aktiven Zentrum des Enzyms binden und dadurch die Katalyse hemmen müssten. Jencks sagte 1969 voraus, dass Antikörper, generiert gegen ein solches chemisch stabiles Analogon des Übergangszustandes, die entsprechende Reaktion katalysieren müssten (Jencks, 1969).

Die selektierten katalytischen Antigenbindungsstellen sind in der räumlichen Ausdehnung sowie im elektrostatischen und hydrophoben Potenzial dem ÜZA komplementär. Somit ist das Design des „richtigen“ ÜZA vielleicht der wichtigste Schritt bei der Produktion katalytischer Antikörper.

Phosphorsäure- oder Phosphonsäurederivate wurden als Mimikry des Übergangszustandes der Hydrolyse von Estern, Carbonaten und Amiden in Größe, Form und Ladung identifiziert. Sie sind chemisch relativ stabil und werden verbreitet als Übergangszustandsanaloga zur Gewinnung von katalytischen Antikörpern eingesetzt.

Die meisten katalytischen Antikörper werden mit Hilfe der Hybridomtechnik generiert. Es werden zunächst Inzuchtmäuse mit dem Übergangszustandsanalogon, gekoppelt an Trägerproteine, immunisiert. Die Milzzellen der immunisierten Maus werden mit Myelomzellen fusioniert. Die von den Hybridomen produzierten Antikörper werden auf Bindung an das ÜZA selektiert. Die so selektierten Antikörper werden auf katalytische Aktivität getestet.

Auch in polyklonalen Antiseren ließ sich bereits katalytische Aktivität nachweisen. Gallacher et al. erzeugten polyklonale katalytische Antikörper mit Esterase- (1991) und

Amidaseaktivität (1992). Der Nachteil polyklonaler Antikörper besteht generell in der begrenzten Verfügbarkeit und Reproduzierbarkeit, sowie in der ausgeprägten Inhomogenität.

Neben der Hybridomtechnik bieten naive und halbsynthetische Antikörperbibliotheken die Möglichkeit, hochaffine Antikörperfragmente mit der gewünschten Spezifität und katalytischen Eigenschaften ohne Immunisierung zu selektieren. Auf diese Weise wurden schon einige katalytische Antikörper gewonnen (Smiley and Benkovic, 1994; Janda et al., 1994). Aus Bibliotheken gewonnene Antikörperfragmente können anschließend mittels Mutationen in ihrer Funktion optimiert werden.

Es zeigte sich, dass die Generierung eines katalytischen Antikörpers ein seltenes Ereignis ist und dass eine große Anzahl von Antikörpern, die das ÜZA binden, auf Katalyse getestet werden muss. Für diese Tests müssen in der Regel große Antikörpermengen bereitgestellt werden.

Neben dem Studium der Reaktions- und Katalysemechanismen in wässriger Lösung sowie dem Design möglicher ÜZA wird auch eine schnelle und zuverlässige Screeningmethode gebraucht, um eine große Anzahl von vermeintlich katalytischen Antikörpern zu testen. Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) kann zwar mit hoher Empfindlichkeit spezifisch kleine Moleküle (z.B. die Spaltprodukte einer Hydrolyse) nachweisen, erfordert jedoch gereinigte Antikörper im Ansatz. Mit dieser Methode kann bisher kein hoher Probendurchsatz erreicht werden. Eine weitere Screeningmethode ist die photometrische Bestimmung des entstandenen Produkts. Dabei werden Nitrogruppen am häufigsten zur Detektion verwendet. Auch hier werden gereinigte Antikörper eingesetzt. Eine Screeningmethode wie ein catELISA, bei der die Kulturüberstände kurz nach der Fusion direkt getestet werden können, reduziert erheblich den Arbeitsaufwand und führt zu Kosteneinsparung. Die Etablierung einer solchen Methode ist schwierig und gelang nur in Einzelfällen (Tawfik et al., 1993).

Die Mehrzahl der bisher generierten katalytischen Antikörper wurde über eine Immunisierung mit einem Konjugat des Übergangszustandsanalogons gewonnen. Aber auch alternative Methoden führten zur Generierung katalytischer Antikörper.

1.3.1.2 Antiidiotypischer Ansatz

Einige Autoren beschreiben antiidiotypische Antikörper mit katalytischen Eigenschaften. Voraussetzung ist, dass ein Enzym für die zu katalysierende Reaktion existiert.

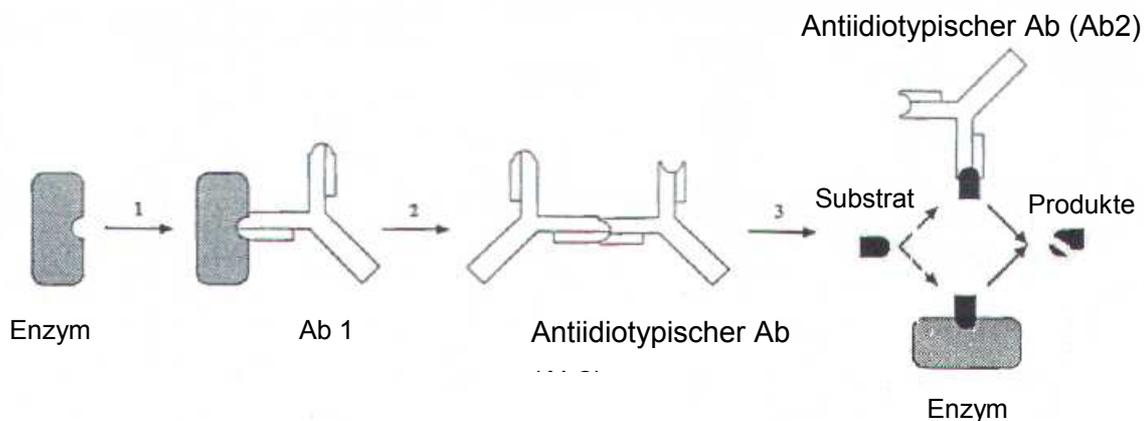


Abb. 1.1: Isolierung von katalytischen antiidiotypischen Antikörpern.
(nach Friboulet et al., 1994)

Zuerst wird ein Antikörper (Ab1) gegen das aktive Zentrum des Enzyms erzeugt (Abb. 1.1). Es wird angenommen, dass die Antigenbindungsstelle dieses Antikörpers komplementär zum aktiven Zentrum des Enzyms und ein genaues Abbild des Substratmoleküls ist. In einem zweiten Schritt werden antiidiotypische Antikörper (Ab2) gegen die Antigenbindungsstelle dieses Antikörpers (Ab1) erzeugt. Manche der erzeugten Antigenbindungsstellen sollen ein „positiver“ Abdruck des aktiven Zentrums des Enzyms sein und somit katalytisch wirksam sein. Friboulet et al. (1994) beschrieben den ersten auf diesem Wege generierten Antikörper mit esterolytischer Aktivität. 1998 berichtete eine zweite Arbeitsgruppe (Hu et al., 1998) über die erfolgreiche Generierung monoklonaler hydrolytisch aktiver Antikörper mit Carboxypeptidase A – Aktivität.

1.3.1.3 Weitere Methoden

Vielfältige Versuche wurden unternommen, um die Generierung von katalytischen Antikörpern zu optimieren. Eine Möglichkeit dabei ist die Optimierung des Haptendesigns. Bei der in der Arbeitsgruppe von Kim D. Janda entwickelten Methode „bait and switch“ wird ein Hapten zur Immunisierung benutzt, das kein Übergangszustandsanalogon ist. Mit seiner Hilfe können jedoch Antikörper, die spezifische komplementäre Aminosäuren-Seitenketten in der Antigenbindungsstelle besitzen, selektiert werden (Janda et al., 1991). Diese Methode wurde erfolgreich zur Generierung eines Paraoxon-spaltenden Abzyms eingesetzt (Lavey and Janda, 1996).

Bei der so genannten „reaktiven Immunisierung“ wird ebenfalls nicht mit einem ÜZA-Protein-Konjugat, sondern mit einer substratähnlichen reaktiven Substanz immunisiert, die während der Immunisierung eine kovalente Bindung in der Antigenbindungsstelle des Antikörpers eingeht (Wirsching et al., 1995). Beim traditionellen Immunisierungsprozess werden hingegen nicht kovalente Wechselwirkungen zwischen Antikörper und Antigen eingegangen. Bei der „reaktiven Immunisierung“ werden komplementäre Antigenbindungsstellen irreversibel modifiziert und direkt selektiert. Der Umweg über Selektion auf Bindung des ÜZA wird nicht besprochen. Der Einsatz dieser Methode führte zur Selektion von Abzymen, die enantioselektive Aldolreaktionen und Retro-Aldolreaktionen katalysieren (Barbas et al., 1997; Zhong et al., 1999).

Eine andere zur Gewinnung katalytischer Antikörper angewendete Strategie ist die von den Autoren „heterologe“ Immunisierung genannte Methode. Die zwei geladenen funktionellen Gruppen eines zwitterionischen Haptens wurden auf zwei strukturell ähnliche, aber unterschiedlich funktionalisierte Haptene aufgeteilt. Die Versuchstiere wurden zuerst zweifach mit dem positiv geladenen und anschließend mit dem negativ geladenen Hapten immunisiert. Die daraufhin selektierten Antikörper mit Amidase-Aktivität waren effektiver als diejenigen, die nach einer „homologen“ Immunisierung (nur mit einem der Haptene) gewonnen werden konnten (Ersoy et al., 1996).

1.3.2 Natürlich existierende Abzyme

In einigen Fällen wurden aus dem Serum von an Asthma erkrankten Patienten Antikörper mit Proteaseaktivität isoliert (Paul et al., 1989; Paul et al., 1990). Diese Autoantikörper hydrolysieren effektiv und spezifisch das Vasoaktive Intestinale Peptid (VIP).

Überraschenderweise führte die Immunisierung von Mäusen mit dem Grundzustand dieses Peptids ebenfalls zur Generierung VIP-hydrolysierender Antikörper. Untersuchungen des Hydrolysemechanismus ergaben, dass ein Serin und ein Histidin in der leichten Kette direkt an der Katalyse beteiligt sind und dass auch isolierte leichte Ketten hydrolytische Aktivität zeigten.

Ein Thyroglobulin-spaltender Autoantikörper wurde aus dem Serum eines an Hashimoto's Thyroiditis erkrankten Patienten isoliert (Li et al., 1995).

Die Bence Jones Proteine, die im Urin von ca. 60 % der Patienten mit Multiplem Myelom gefunden wurden, sind ihrer Natur nach monoklonale leichte Ketten. Einige davon besitzen Amidase- und Proteaseaktivität (Matsuura et al., 1994; Paul et al., 1995).

Aus dem Serum von Patienten mit *Lupus erythematosus* oder Rheumatischer Arthritis wurden DNS-hydrolysierende Autoantikörper isoliert (Shuster et al., 1992). Die DNS-hydrolysierende Aktivität korreliert mit der Konzentration von Antitopoisomerase I im Serum

(Bronstein et al., 1992). Die Autoren vermuten, dass diese katalytischen Antikörper infolge eines antiidiotypischen Mechanismus entstanden sind. Avalle et al. (2000) schlussfolgern, dass katalytische Antikörper eine Rolle im Metabolismus spielen könnten. Als Indiz dafür sehen sie auch die Ergebnisse von Tawfik et al. (1995), die bei Benutzung von Autoimmunmäusen (SJL und MLR/lpr) eine Erhöhung der Ausbeute an katalytischen Antikörpern erhielten.

1.3.3 Antikörper-katalysierte Reaktionen

1.3.3.1 Hydrolytische Reaktionen

Die ersten experimentellen Bestätigungen der von Jencks aufgestellten Theorie wurden 1986 mit der Beschreibung der esterolytisch aktiven Antikörper 6D4 (Tramontano et al., 1986) und MOPC167 (Pollack et al., 1986) erbracht. Die meisten bisher hergestellten katalytischen Antikörper besitzen hydrolytische Aktivität (MacBeath and Hilvert, 1996). Die Erfolge wurden vorrangig mit Abzymen erzielt, die in der Lage sind, labile Ester mit leicht hydrolysierbaren Abgangsgruppen wie *p*-Nitrophenyl- oder *p*-Nitrobenzyl-derivaten zu spalten (Abb. 1.2; Zemel et al., 1994; Guo et al., 1994; Lesley et al., 1993; Benkovic et al. 1990; Gigant et al., 1997).

Die Hydrolyse von Estern, Carbonaten und Amiden folgt sowohl im basischen als auch im sauren Medium überwiegend einem Additions-Eliminierungsmechanismus (AE-Mechanismus) unter Ausbildung eines tetraedrischen Zwischenprodukts (Abb. 1.2). Die Bildung des tetraedrischen Intermediats ist meist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieser Reaktion.

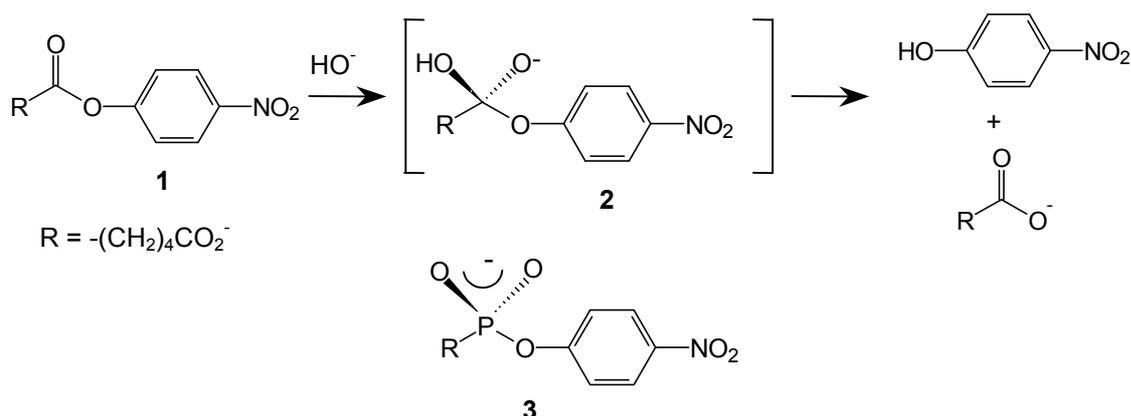


Abb. 1.2: Hydrolyse von aktivierten Arylestern **1** über einen tetraedrischen Übergangszustand **2**. Ein Phosphonsäureester **3** wurde als Übergangszustandsanalogon für die Generierung hydrolytischer Antikörper verwendet (nach Hilvert, 2000).

Der Ester ist im Grundzustand planar und ungeladen. In wässriger Lösung entsteht ein tetraedrischer Übergangszustand, bei dem sich das zentrale Kohlenstoffatom des Esters im Zentrum des Tetraeders, eingeschlossen von drei teils negativ geladenen Sauerstoffatomen und einem Kohlenstoffatom, befindet. Neben der Neuorientierung der Atome erfolgt auch eine Dehnung der Bindungen auf 120 % der normalen Länge (Lerner and Tramontano, 1988). Wenn das zentrale Kohlenstoffatom zur Stabilisierung der Struktur durch Phosphor ersetzt wird, bleiben tetraedrische Struktur und Verteilung der Ladung erhalten. Die Phosphor-Sauerstoff-Bindungen entsprechen in ihrer Länge etwa den Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindungen des Übergangszustandes. Diese gute Übereinstimmung dürfte der Grund dafür sein, dass die Verwendung von Phosphor- und Phosphonsäurederivaten als ÜZA für diese Reaktionen so erfolgreich war.

Die für die esterolytischen Abzyme gemessenen Beschleunigungsraten (Verhältnis von katalysierter zu Hintergrundreaktion) reichen von 10^3 wenn neutrale schwache Aminosäuren („Backbone“-NH, Histidin) und bis 10^5 wenn kationische Aminosäuren (Lysin, Arginin) in der Antigenbindungsstelle des Antikörpers für die Katalyse verantwortlich sind. Im Vergleich dazu erreichen hydrolytische Enzyme Werte bis 10^{12} (Hilvert, 2000). Als Ursache wird im Allgemeinen eine unzureichende Ähnlichkeit von ÜZA und Übergangszustand hinsichtlich Bindungslängen und -winkel sowie elektrostatischem Potenzial angesehen. Dies hat zur Folge, dass die selektierte Umgebung in der Antigenbindungsstelle für den „echten“ Übergangszustand nur bedingt stabilisierend wirkt. Außerdem katalysieren manche Enzyme unter Bildung mehrerer Intermediate und Übergangszustände. Abzyme dagegen können bisher nur gegen ein ÜZA generiert werden. In den Fällen von Ester- und Amidhydrolyse sind die schwächeren Beschleunigungsraten zudem noch im Bindungsmodus begründet (MacBeath and Hilvert, 1996). Die Phosphonsäure-Gruppierung wird in der Nähe des Ausgangs der Bindetasche des Antikörpers gebunden, wobei der Phosphonylsauerstoff seitlich positioniert wird. Die Abgangsgruppe ist tief in der Bindungstasche verborgen. Die natürlichen Proteasen wie Carboxypeptidase A (Kim and Lipscomb, 1991), Therolysin (Tronrud et al. 1987) und α -lytische Protease (Bone et al., 1991) binden Phosphonsäureinhibitoren mit dem Phosphonylsauerstoff am Boden und der Abgangsgruppe und der Phosphonsäure-Gruppierung seitlich in der Bindungstasche. Zur Nachbildung dieses Bindungsmodus sind neue Haptene erforderlich. Eine andere Lösung des Problems wären möglicherweise *in vitro* Selektionsmethoden wie Phagendisplay. Semisynthetische Antikörperbanken und Bibliotheken, erstellt aus völlig unterschiedlichen bindenden Domänen, die nicht wie Immunoglobuline gefaltet sind, könnten ebenfalls zur Selektion neuer Bindungsstellen führen.

Auch die stabileren Carbamate und Harnstoffe sollten sich durch Antikörper hydrolysieren lassen. Bisher wurden nur wenige Abzyme, die stabile Verbindungen wie Diphenylcarbamate hydrolysieren können, beschrieben (Dinaut et al. 2000, Wentworth et al., 1996, Wentworth et al., 1997). Antikörper, die in der Lage sind, Benzylphenylcarbamate oder Harnstoffe zu hydrolysieren, sind bisher nicht bekannt. Die Hydrolyse von Carbamaten und Harnstoffen könnte in Analogie zur Hydrolyse von Estern und Amiden nach einem Additions-Eliminierungs-Mechanismus (AE-Mechanismus) unter Ausbildung eines tetraedrischen Übergangszustandes oder nach einem Eliminierungs-Additions-Mechanismus (EA-Mechanismus) ablaufen (Armstrong et al., 1968, Farlow and Moodie, 1971, Satchell and Satchell, 1992). Die Erzeugung derartiger Abzyme ist aufgrund der wenig bekannten Hydrolysemechanismen und der Stabilität der Substanzen sehr aufwändig.

1.3.3.2 Weitere Reaktionen

Seit 1986 wurde über mehr als 100 verschiedene durch Antikörper katalysierte Reaktionen berichtet. Die Bandbreite und die Zahl der bereits beschriebenen Transformationen (C-C-Verknüpfungen (Toker et al., 2000) und –Spaltungen (Barbas et al. 1997), β -Eliminierungen, Porphyrin-katalysierte Metallierungen (Cochran and Schultz, 1990), Peroxidierungen, Redoxreaktionen (Janjic and Tramontano, 1989, Lerner et al., 1991), perizyklische Umlagerungen (Hilvert et al., 1988; Braisted and Schultz, 1994), Sulfidoxidationen (Hilvert et al., 1989), Phosphodiester-Spaltungen (Weiner et al., 1997)) zeugen vom großen Potenzial der Abzyme.

1.3.4 Potenzielle Anwendungen von katalytischen Antikörpern

Abzyme tragen in der Grundlagenforschung zum Verständnis der Evolution von Biokatalysatoren bei. Es können z.B. ganz verschiedene Antikörper gegen ein ÜZA katalytische Eigenschaften haben, wobei nicht nur unterschiedliche Aminosäureseitenketten an der Katalyse beteiligt sind, sondern auch verschiedene Katalysemechanismen ablaufen (Schultz, 1998).

Eine praktische Anwendung von katalytischen Antikörpern wäre der Einsatz in Biosensoren zum Nachweis verschiedener Analyte, wie z.B. beim Monitoring von umweltrelevanten Substanzen (z.B. Herbiziden). Katalytische Antikörper hätten gegenüber traditionellen Antikörpern den Vorteil, dass sie eine mehrmalige Anwendung des Sensors ohne Regeneration ermöglichen.

Große Bedeutung wird dem Einsatz von Abzymen für die Katalyse von Reaktionen, für die kein natürliches Enzym bekannt ist, beigemessen. Es wurde bereits über die erfolgreiche

Beschleunigung solcher nicht natürlichen Reaktionen wie „oxy-Cope“- und „ene“-Reaktionen berichtet (Mundorff et al., 2000).

Eine weitere Anwendung katalytischer Antikörper bestünde in der Therapie verschiedener Erkrankungen. Viele Therapeutika enthalten ein oder mehrere chirale Kohlenstoffatome, die unterschiedliche Enantiomere ergeben. Normalerweise reagiert nur ein Enantiomer mit dem Zellrezeptor, das andere ist entweder unwirksam oder schädlich. Abzyme könnten aufgrund ihrer Enantioselektivität selbst als Therapeutika oder in der chiralen Synthese von Therapeutika eingesetzt werden (List et. al., 1999; Zhong et al., 1999).

Viele *in vivo* Anwendungen werden aufgrund der Biokompatibilität und der langen Halbwertszeiten der Abzyme im Serum ermöglicht. Aldolase-Antikörper wurden z.B. *in vitro* eingesetzt, um Vorstufen von zytostatischen Medikamenten zu aktivieren und so Dickdarm- und Prostata-Krebszellen abzutöten (Shabat et al., 1999). Des Weiteren wurden esterolytische Antikörper beschrieben, die Kokain zu nicht-toxischen Produkten hydrolysieren und so in Tierexperimenten vor Abhängigkeit und plötzlichem Tod bewahrten (Mets et al., 1998). Eines der bisher beschriebenen Abzyme zur Spaltung von Carbamaten fand *in vitro* praktische Anwendung. In der ADEPT-Methode (Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy) wurde die Enzymkomponente durch ein humanisiertes murines Abzym ersetzt, um die Immunogenität des bakteriellen Enzyms zu reduzieren (ADAPT-Methode oder Antibody-Directed Abzyme Prodrug Therapy) (Wentworth et al., 1996).

Abzyme wurden auch für die Synthese verschiedener Substanzen eingesetzt. Katalytische Antikörper konnten *in vivo* Enzyme in der Aminosäure- und Pyrimidin-Biosynthese ersetzen, wenn sie in hohen Mengen exprimiert wurden (Tang et al., 1991; Smiley and Benkovic, 1994). Toker et al. beschrieben im Jahr 2000 den ersten Versuch einer Antikörper-katalysierten bimolekularen perizyklischen Reaktion (Toker et al., 2000).

1.4 Zielstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten hydrolytisch aktive Antikörper zur Spaltung von Arylcarbamaten und Arylharnstoffen entwickelt werden (Abb 1.3).

Die als Substrate vorgesehenen Arylcarbamate und Arylharnstoffe finden entweder als Herbizide Anwendung oder sind potenzielle Herbizide. Ein Teil dieser Substanzen wurde im Rahmen einer Kooperation des Instituts für organische Chemie der Universität Potsdam unter der Leitung von Prof. Dr. G. Kempter mit der Bayer AG entwickelt.

Zur Generierung katalytisch aktiver Antikörper sollten die von den Instituten der Chemie der Universität Potsdam synthetisierten anionischen und elektrisch neutralen Übergangszustandsanaloga an Trägerproteine gekoppelt und zur Immunisierung von Inzuchtmäusen eingesetzt werden. Die Kopplung sollte unter Verwendung verschiedener Kopplungsmethoden erfolgen. Die hergestellten Trägerprotein-Hapten-Konjugate sollten mit MALDI-TOF-MS und Festphasen-Immunoassays charakterisiert werden. Die mit Hilfe der Hybridomtechnik gewonnenen Antikörper sollten auf Bindung an das ÜZA selektiert und in großen Mengen produziert werden. Danach sollten diese monoklonalen Antikörper sowie durch Dritte selektierte rekombinante Antikörper auf Katalyse getestet werden.

Es sollten Methoden zum Nachweis der Katalyse und insbesondere zum Nachweis potenzieller Spaltprodukte entwickelt und angewendet werden. Die Anforderungen, die an diese Methoden gestellt wurden, sind eine niedrige Nachweisgrenze, schnelle und preiswerte Durchführbarkeit sowie hohe Reproduzierbarkeit. Es sollten unter anderem immunologische Nachweissysteme mit Hilfe von Anti-Substrat- und Anti-Produkt-Antikörpern aufgebaut werden. Hierfür sollten verschiedene Antikörper hergestellt werden.

Bei Erhalt von hydrolytisch aktiven Antikörpern sollten diese bezüglich ihrer Substratspezifität, pH-Abhängigkeit sowie ihrer kinetischen und thermodynamischen Eigenschaften charakterisiert werden. Aus den Ergebnissen sollten nach Möglichkeit Aussagen zu den Mechanismen der Arylcarbamat- und Arylharnstoff-Hydrolyse gemacht werden.

Unter den für eine Spaltung vorgesehenen Verbindungen befand sich das Herbizid Diuron. Voraussetzung für einen immunologischen Nachweis war die Gewinnung von spezifischen Antikörpern gegen Diuron. Diese Antikörper sollten umfassend bezüglich ihrer Spezifität und Affinität charakterisiert und auf eine mögliche praktische Anwendung geprüft werden.

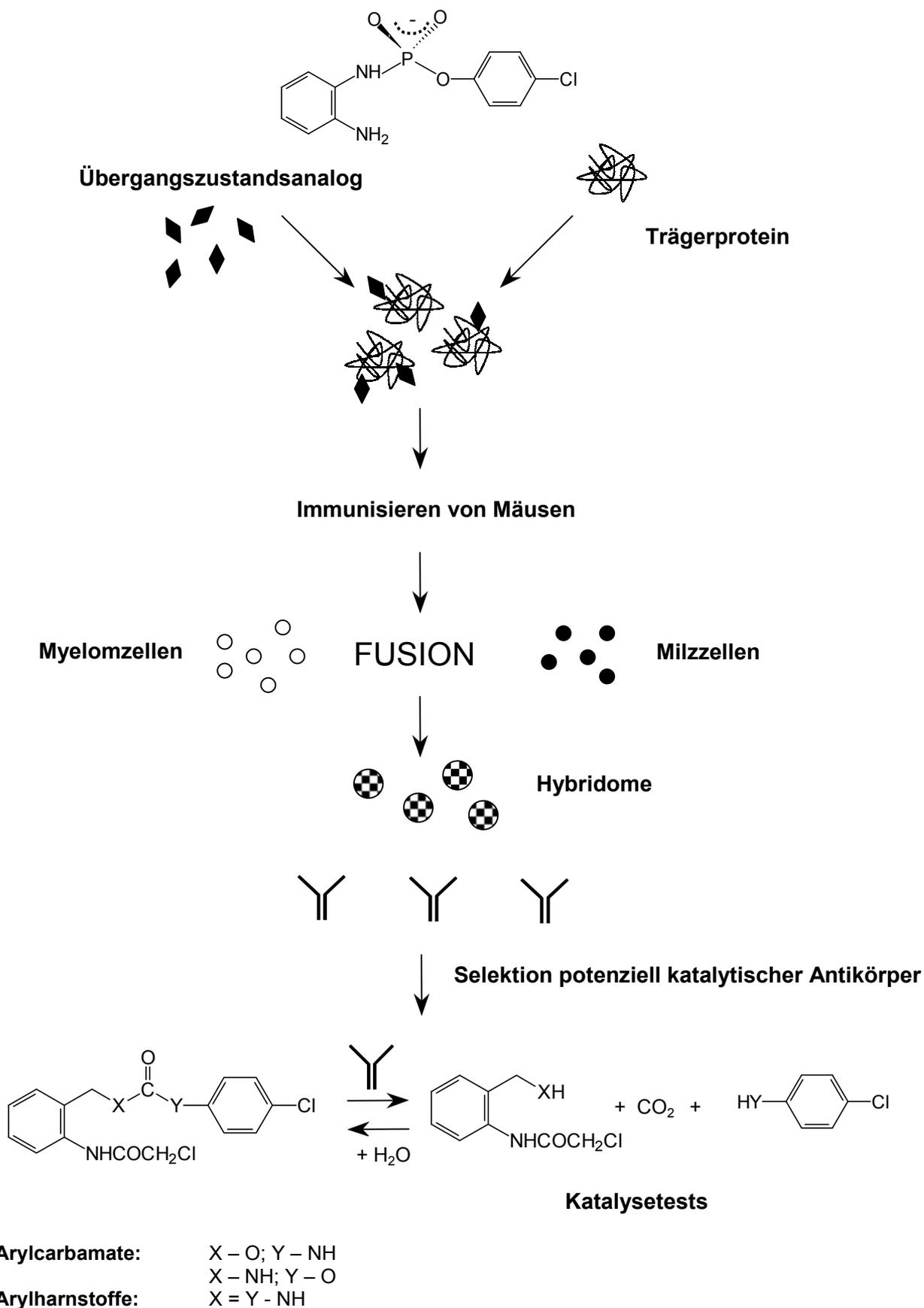


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Generierung katalytischer Antikörper zur Hydrolyse von Arylcarbamaten

2. Materialien und Methoden

2.1 Substanzen und Immunoreagenzien

Substanzen für die Zellkultur:

Fötales Kälberserum	Biochrom (Berlin)
RPMI 1640	Biochrom (Berlin)
Polyethylenglykol 8000	Sigma (Taufkirchen)

Immunoreagentien für die Festphasen-Immunoassays:

KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin)	Calbiochem (San Diego, USA)
Peroxidase-konjugierte Anti-Maus-Ig-Antikörper	Sigma (Taufkirchen)
Biotin-konjugierte subklassenspezifische Ziege-Anti-Maus-Ig-Antikörper	Southern Biotechn. Assoc. Inc., (Birmingham, USA)
Alkalische Phosphatase-konjugiertes Streptavidin	Roche (Basel, Schweiz)

Weitere wichtige Substanzen wurden bei Sigma (Taufkirchen) und Riedel-de-Haën (Seezle) gekauft.

Der überwiegende Teil der zum Immunisieren und Testen verwendeten Haptene wurde von den Mitarbeitern des Instituts für Organische Chemie der Universität Potsdam Dr. J. Woller, Dr. J. Spindler, Dr. D. Heilmann und Dr. J. Buchs synthetisiert. Die Substanzen 1 bis 27 wurden freundlicherweise von Dr. R. Laudien vom Institut für Physikalische Chemie der Universität Potsdam zur Verfügung gestellt. Die Zusammenarbeit und damit auch die Entstehung der verschiedenen Verbindungen erstreckten sich über mehrere Jahre. Obwohl nicht direkter Bestandteil dieser Promotionsarbeit, wurden die Namen und die Synthesen der Verbindungen aus Vollständigkeitsgründen als Anhang beigefügt. Die meisten Synthesen waren aus chemischer Sicht Neuland – sie waren in der einschlägigen Literatur nicht oder nur unzureichend beschrieben. Die Struktur der synthetisierten Substanzen wurde durch ^1H - and ^{13}C -NMR-Spektroskopie, Massenspektroskopie und Elementenanalyse bestätigt.

Ein wesentliches Charakteristikum der benötigten Substanzen war das Vorhandensein einer kopplungsfähigen Gruppe (Carboxyl-, Amino-, Chloracetyl- oder Hydroxylgruppe), die eine Konjugation an ein Trägerprotein erlaubt. In den käuflich erhältlichen Verbindungen fehlte diese kopplungsfähige Gruppe. Eine nachträgliche Einführung war oft nicht möglich, da der Syntheseweg zuerst über die Darstellung der kopplungsfähigen Gruppe führt und dann weiter zur kompletten Struktur.

Die ÜZA, die Substrate und die meisten potenziellen Produkte waren sehr schlecht löslich. Zur Herstellung wässriger Lösungen wurde immer mit einem Lösungsvermittler (DMF, DMSO oder Ethanol) gearbeitet. Bei den Kopplungen stellte dies kein Problem dar, weil die Trägerproteine auch bei hohen Konzentrationen von organischen Lösungsmitteln (z.B. 30 % (v/v) für BSA) stabil sind. Anders verhielten sich Enzyme, Zellen und Zellbestandteile. In diesen Fällen wurde die zulässige Lösungsmittelkonzentration austitriert.

2.1.1 Substrate

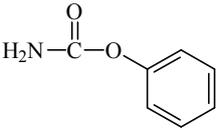
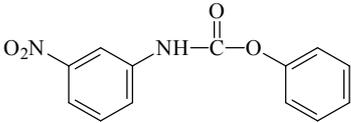
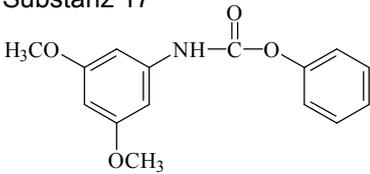
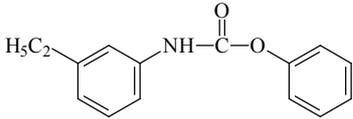
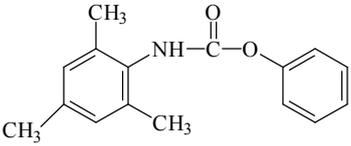
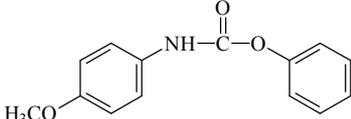
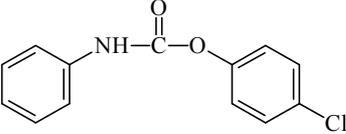
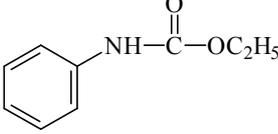
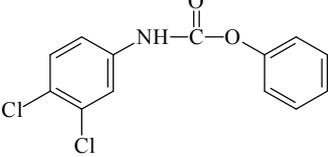
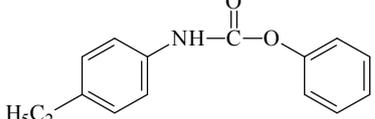
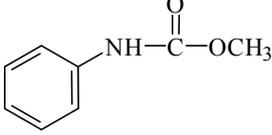
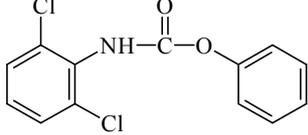
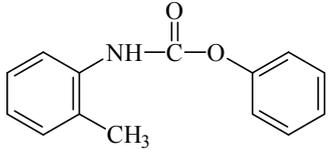
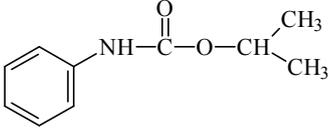
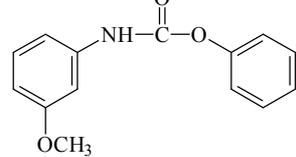
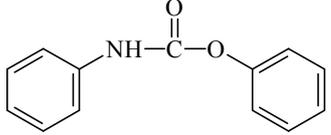
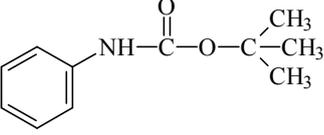
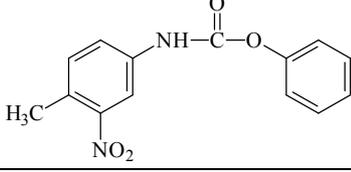
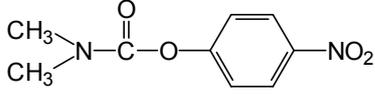
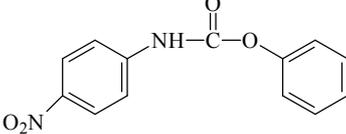
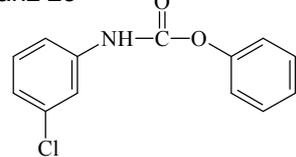
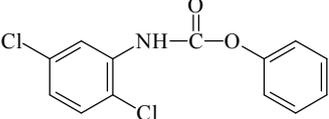
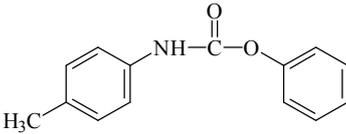
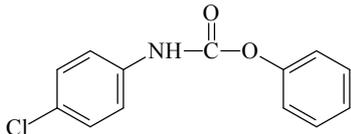
2.1.1.1 Arylcarbamate

Die Struktur aller verwendeten Arylcarbamate ist in Tab. 2.1A und 2.1B dargestellt.

Tabelle 2.1A: Strukturen der verwendeten Arylcarbamate

<p>POCc12</p>	<p>POCc21</p>	<p>POCc25</p>
<p>POCc18</p>	<p>POCc22</p>	<p>POCc26</p>
<p>POCc19</p>	<p>POCc23</p>	<p>POCc27</p>
<p>POCc20</p>	<p>POCc24</p>	<p>Substanz 27</p>

Tabelle 2.1B: Strukturen der verwendeten Arylcarbamate

Substanz 1 	Substanz 9 	Substanz 17 
Substanz 2 	Substanz 10 	Substanz 18 
Substanz 3 	Substanz 11 	Substanz 19 
Substanz 4 	Substanz 12 	Substanz 20 
Substanz 5 	Substanz 13 	Substanz 21 
Substanz 6 	Substanz 14 	Substanz 22 
Substanz 7 	Substanz 15 	Substanz 23 
Substanz 8 	Substanz 16 	Substanz 24 

2.1.1.2 Arylharnstoffe

Die Struktur aller verwendeten Arylharnstoffe ist in Tab. 2.2 dargestellt. Die Struktur der Phenylharnstoff–Herbizide ist in Tab. 2.3 dargestellt.

Tabelle 2.2: Strukturen aller verwendeten Arylharnstoffe

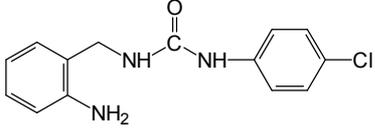
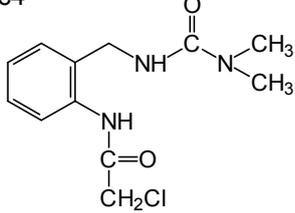
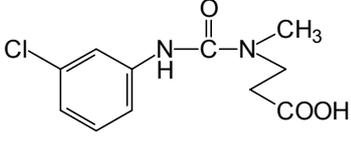
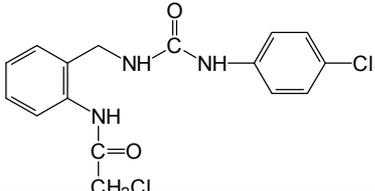
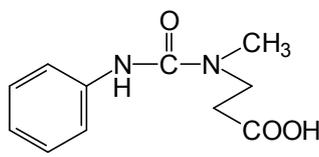
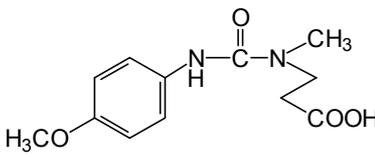
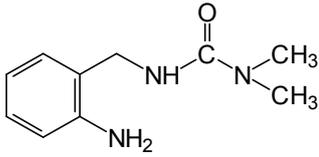
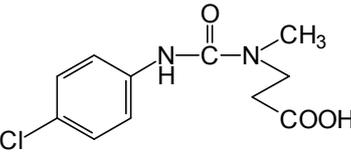
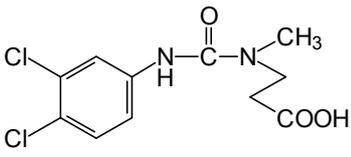
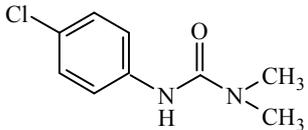
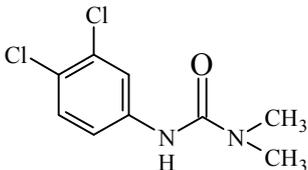
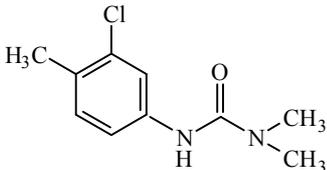
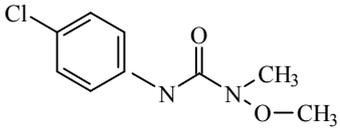
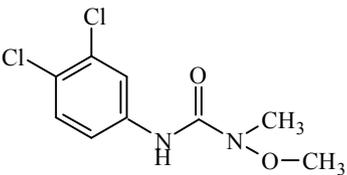
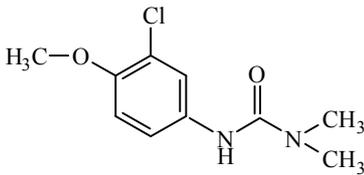
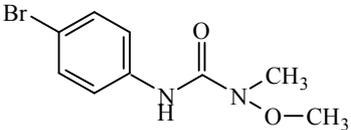
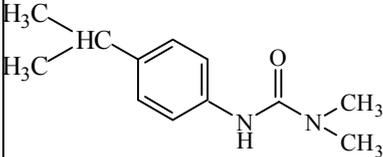
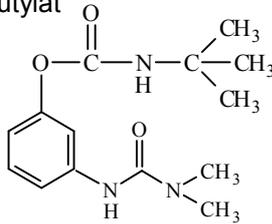
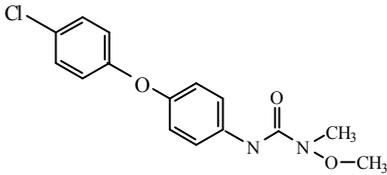
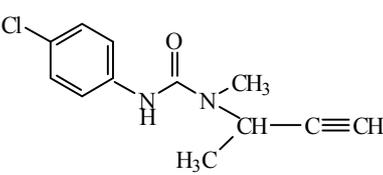
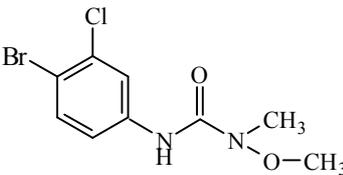
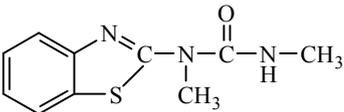
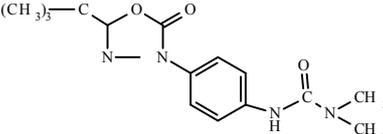
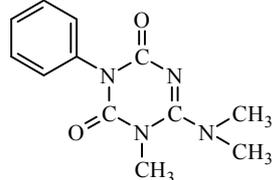
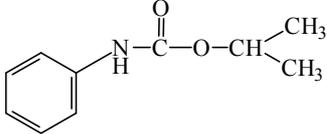
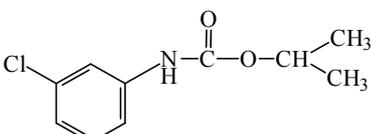
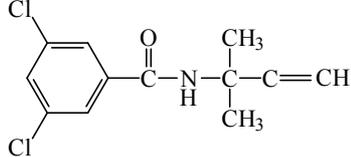
<p>OC1</p> 	<p>POCc4</p> 	<p>POCc7</p> 
<p>OC2</p> 	<p>POCc5</p> 	<p>POCc8</p> 
<p>POCc3</p> 	<p>POCc6</p> 	<p>POCc9</p> 

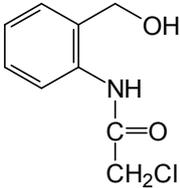
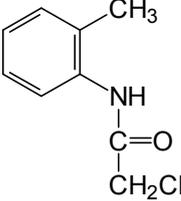
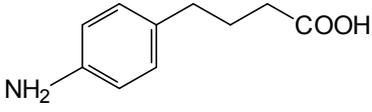
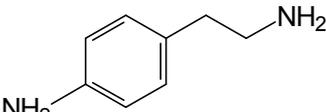
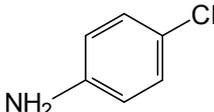
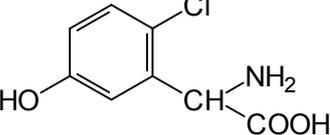
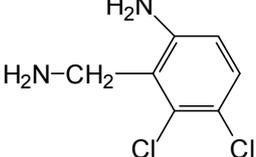
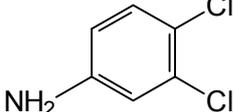
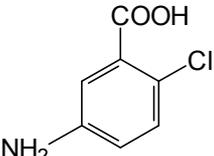
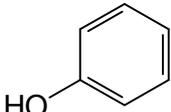
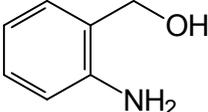
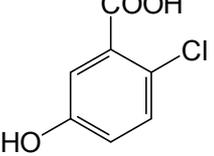
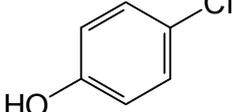
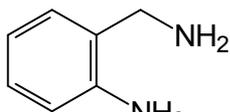
Tabelle 2.3: Struktur aller verwendeten Phenylharnstoff-Herbizide

Monuron 	Diuron 	Chlortoluron 
Monolinuron 	Linuron 	Metoxuron 
Metobromuron 	Isoproturon 	Karbutylat 
Chloroxuron 	Buturon 	Chlorbromuron 
Methabenzthiazuron 	Dimefuron 	Hexazinon 
Propham 	Chlorpropham 	Propyzamid 

2.1.2 Potenzielle Produkte der Hydrolysereaktionen

Die Struktur der potenziellen Produkte ist in Tab. 2.4 dargestellt.

Tabelle 2.4: Struktur der potenziellen Produkte und Produktanaloge

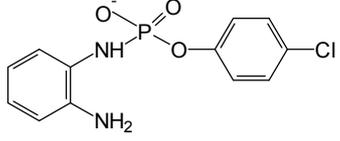
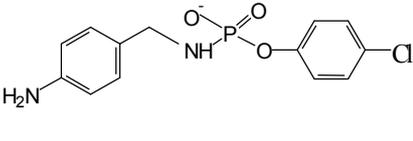
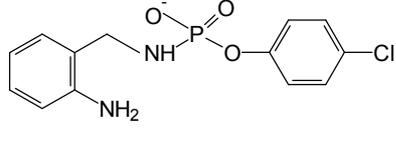
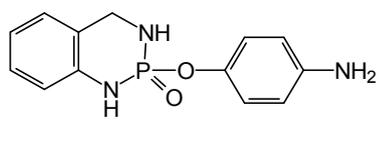
POCc10 	POCc11 	POCc17 
H1 	H5 	4-Chloranilin 
H2 	H6 	3,4-Dichloranilin 
H3 	Phenol 	2-Aminobenzylalkohol 
H4 	4-Chlorphenol 	2-Aminobenzylamin 

2.1.3 Übergangszustandsanaloga

2.1.3.1 Phosphorhaltige Übergangszustandsanaloga

Die Struktur der verwendeten Phosphorsäurederivate ist in Tab. 2.5 dargestellt.

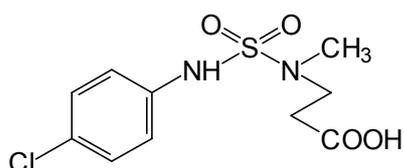
Tabelle 2.5: Struktur der Übergangszustandsanaloga auf Phosphorbasis

<p>Hei3</p> 	<p>OC5</p> 
<p>OC4</p> 	<p>OC7</p> 

Die Struktur von Hei3, OC4 und OC5 wurde empirisch in Zusammenarbeit mit den Instituten der Chemie, Universität Potsdam entwickelt. Das rationale Design von OC7 übernahm Dr. Bernd Kallies vom Institut für Physikalische Chemie der Universität Potsdam.

2.1.3.2 Schwefelhaltige Übergangszustandsanaloga

Das verwendete Sulfonsäurederivat POCs14 hat folgende Struktur:



POCs14

2.2 Kopplung von Haptene an Proteine

Um eine Immunantwort gegen Haptene (siehe Tabellen 2.1, 2.2, 2.4 und 2.5) auszulösen, wurden diese an Trägerproteine gekoppelt. Auch für die Immobilisierung an einer festen Phase ist die Kopplung der Haptene an ein Protein erforderlich. Als Trägerproteine wurden Hämocyanin (KLH), Rinderserumalbumin (BSA) und Transferrin eingesetzt.

Die KLH-Konjugate wurden zum Immunisieren, die BSA-Konjugate zum Testen eingesetzt. Die Transferrin-Konjugate der Produktanaloga H1, H2 und des ÜZA Hei3 wurden ausschließlich für die Versuche zur Selektion rekombinanter Antikörper durch Dr. Karl Krammer, TU München, verwendet.

Zur Quantifizierung der BSA- und Transferrin-Konjugate wurde MALDI-TOF-MS eingesetzt. Die Messungen wurden von Dr. Sophie Haebel, Zentrum für Biopolymere, Universität Potsdam, durchgeführt. Zunächst wurde das Molekulargewicht des Trägerproteins allein bestimmt. Bei erfolgreicher Kopplung erfolgt eine Zunahme des Molekulargewichtes. Aus der Differenz (Konjugat – Trägerprotein) und dem Molekulargewicht des Haptens und des Linkers wurde die Kopplungsdichte berechnet. Als zusätzliche Kontrolle wurde ein Konjugat ohne Hapten hergestellt. Es wurde verglichen, ob alle kopplungsfähigen Gruppen, die durch den Linker aktiviert wurden, das Hapten gebunden hatten. MALDI-TOF-MS kann aufgrund der Größe und Heterogenität von KLH nicht für KLH-Hapten-Konjugate eingesetzt werden.

Um eine Trennung von konjugierten und nicht konjugierten Haptenen zu erreichen, wurde eine schnelle Gelfiltration in der Zentrifuge (Zentrifugationsfiltration) durchgeführt. Dazu wurden 2 ml Eppendorf Gefäße an der Spitze mit einem kleinen Loch versehen und mit in einem geeigneten Puffer äquilibriertem Sephadex G25 gefüllt (1,8 ml). Es wurden maximal 250 µl Probe pro Säule aufgetragen. Die Zentrifugation erfolgte bei 1000 rpm für 5 min.

2.2.1 Kopplung von Haptenen mit freier Aminogruppe über Glutaraldehyd

Glutaraldehyd ist das am weitesten verbreitete Dialdehyd, das als homobifunktionelles Kopplungsreagenz Verwendung findet (Coligan et al., 1992-2002). Die Reaktion verläuft über die Bildung von Schiffsbasen wie in Abb. 2.1 dargestellt. Die nachfolgende Behandlung mit Glycin oder Natriumborhydrid führt zur Stabilisierung der sekundären Verbindung über die Aminogruppe. Die Kopplung ist leicht durchzuführen, allerdings schwer zu reproduzieren. Eine Charakterisierung mittels MALDI-TOF-MS ist aufgrund der Quervernetzung der Proteinmoleküle nicht möglich. Da Glutaraldehydlösung zur Polymerisation neigt, wurden immer frisch aufgetaute Aliquots für die Kopplungen verwendet.

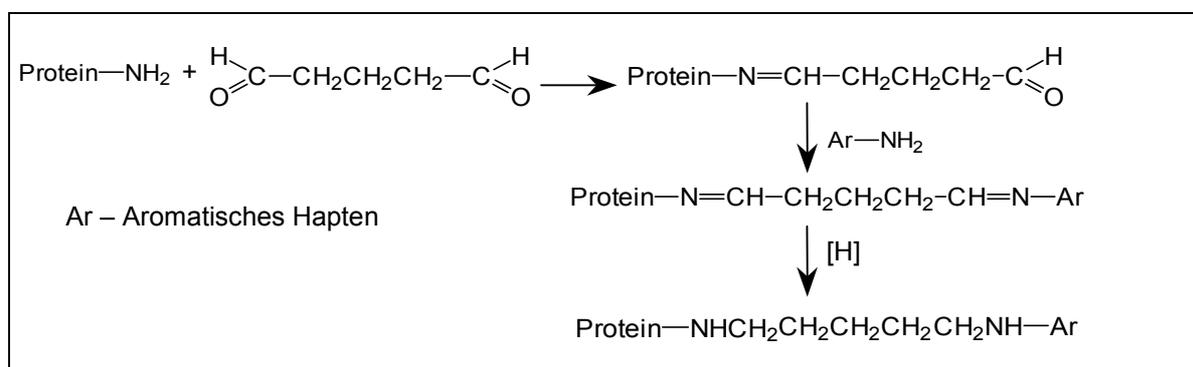


Abb. 2.1: Konjugation von Haptenen an Trägerproteine über Glutaraldehyd

Mit dieser Methode wurden folgende Konjugate hergestellt:

KLH-Hei3, KLH-OC4, BSA-OC1, BSA-OC7

Kopplungsprotokoll:

1. 4 mg Protein in 100 μ l 0,1M Boratpuffer, pH 10,0 aufgelöst,
2. 1 mg Hapten in 20 μ l DMF (bzw. DMSO) aufgelöst und zur Trägerproteinlösung gegeben,
3. 100 μ l frisch zubereitete 0,3 % Glutaraldehydlösung unter Rühren zugegeben,
4. 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt,
5. 25 μ l 1M Glycin oder festes NaBH_4 (Endkonzentration 10 mg/ml) zugegeben,
6. 30 min bei Raumtemperatur inkubiert,
7. Zentrifugationsfiltration über Sephadex G25, äquibriert in PBS,
8. Überprüfung des pH-Wertes, wenn nicht neutral, dann erneute Zentrifugationsfiltration.

2.2.2 Kopplung von Haptenen mit freier Aminogruppe über 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimid HCl (EDC)

EDC ist ein Kopplungsreagenz, das keinen Linker zwischen Hapten und Trägerprotein hinterlässt. EDC verbindet unter Ausbildung einer Amidbindung Amino- und Carboxylgruppen. Wie in Abb. 2.2 gezeigt, wird zuerst ein reaktives Zwischenprodukt gebildet. Diese Kopplungsmethode ist leicht und reproduzierbar durchzuführen. Nachteilig ist die relativ geringe Reaktionsfreudigkeit der aromatischen Aminogruppen ($\text{R}_1\text{-NH}_2$ in Abb. 2.2). Ebenfalls von Nachteil ist die relativ rasche Hydrolyse des Zwischenprodukts im wässrigen Medium.

Die Konjugation wurde sowohl in einem Morpholinethansulfonsäure- (MES-) Puffer (0,1 M MES-NaOH, 0,15 M NaCl, pH 4,7) als auch in Aqua bidest. durchgeführt. Die Kopplungseffizienz wurde getestet. Nachfolgend sind die Protokolle für die Kopplung in Aqua bidest. als 1-Schritt- und 2-Schritt-Methode aufgeführt.

Auflösung in organischen Lösungsmitteln eingesetzt werden. Die Methode ist schnell und zuverlässig. Problematisch sind die schwach reaktionsfreudigen aromatischen Aminogruppen.

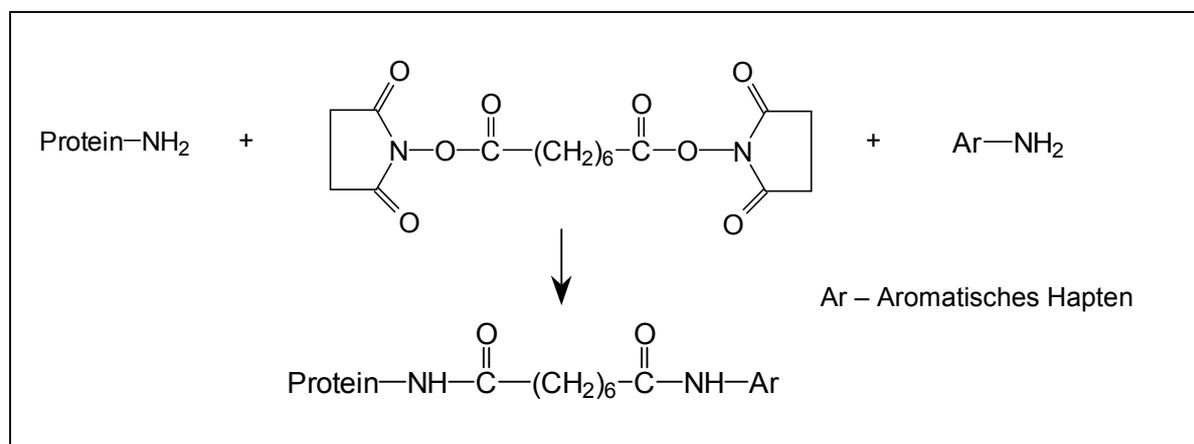


Abb. 2.3: Konjugation von Haptenen an Trägerproteine über DSS

Mit dieser Methode wurden folgende Konjugate hergestellt: KLH-OC7, BSA-Hei3, BSA-H5

Kopplungsprotokoll:

1. 10 mg BSA (resp. 4 mg KLH) in 950 µl PBS gelöst und zu
2. 1 mg Hapten, vorgelöst in 10 µl DMF (bzw. DMSO), zugegeben und intensiv gemischt,
3. 1,8 mg DSS, vorgelöst in 40 µl DMF, zugesetzt,
4. 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt,
5. bei Trübung abzentrifugiert (5000 rpm/2 min),
6. Zentrifugationsfiltration über Sephadex G25, äquilibriert in PBS.

2.2.4 Kopplung von Haptenen mit freier Carboxylgruppe über EDC/NHS

Die Konjugation von Haptenen mit freier Carboxylgruppe über EDC/NHS ist schematisch in Abb. 2.2 wiedergegeben, wobei das Hapten (R₂-COOH in Abb. 2.2) zuerst mit EDC/NHS aktiviert wird. EDC reagiert mit der Carboxylgruppe und bildet O-Acyllharnstoff als reaktives Zwischenprodukt. NHS verdrängt EDC aus seiner Bindung an der Carboxylgruppe. Der neu gebildete Komplex ist stabiler und kann dann eine Reaktion mit den Aminogruppen des Trägerproteins (R₁-NH₂ in Abb. 2.2) eingehen.

Mit dieser Methode wurden folgende Konjugate hergestellt:

KLH-POCc9, KLH-POCc6, KLH-POCs14,
BSA-POCc5, BSA-POCc6, BSA-POCc9, BSA-POCs14

Kopplungsprotokoll:

1. 1 mg Hapten in 10 μ l DMF (bzw. DMSO) vorgelöst und auf 950 μ l mit Aqua bidest. aufgefüllt,
2. 1,2 mg NHS in 50 μ l DMF aufgelöst und zum Hapten gegeben,
3. das Gemisch zu 0,8 mg EDC unter Rühren zugegeben,
4. 10 min bei Raumtemperatur inkubiert,
5. das voraktivierte Hapten zu 10 mg Protein gegeben und intensiv gemischt,
6. 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt,
7. Zentrifugationsfiltration über Sephadex G25, äquilibriert in PBS.

2.2.5 Kopplung von Haptenen mit freier Chloracetylgruppe über Traut's Reagenz

Traut's Reagenz (2-Iminothiolan-Hydrochlorid) reagiert mit frei zugänglichen Aminogruppen, wie den ϵ -Aminogruppen der Lysinreste von Proteinen (Lindner and Robey, 1987). Dabei entstehen Sulfhydrylgruppen, die spontan mit Chloracetylgruppen reagieren können (Abb. 2.4).

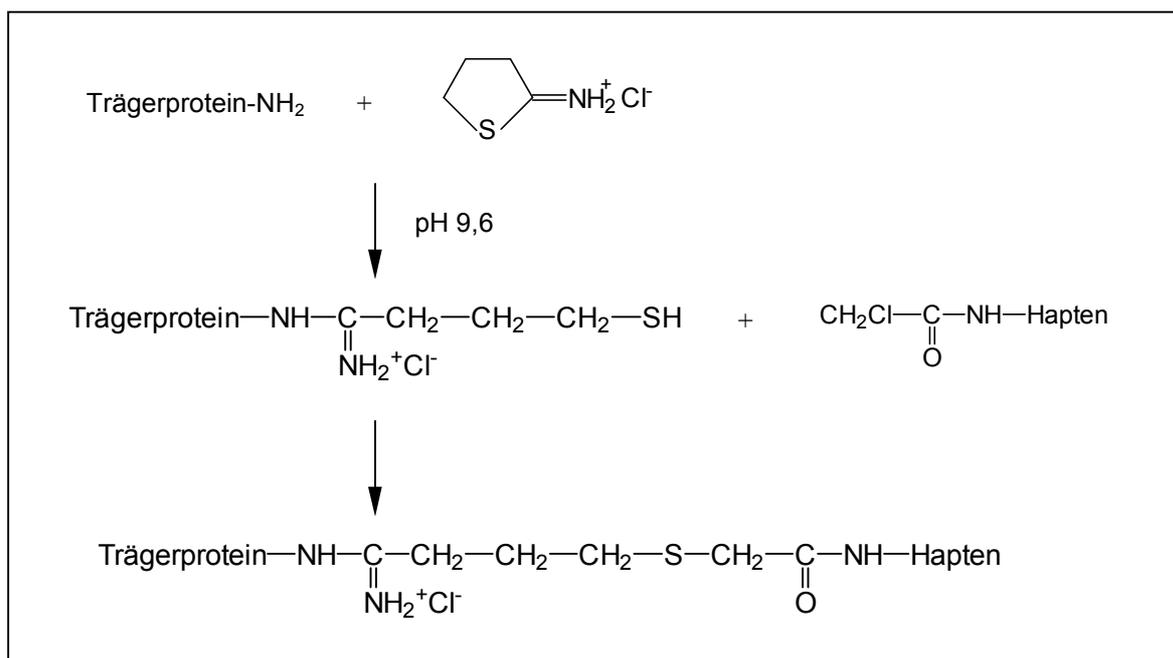


Abb. 2.4: Konjugation von chloracetylierten Haptenen an Trägerproteine über Traut's Reagenz

Mit dieser Methode wurden folgende Konjugate hergestellt:

KLH- und BSA-Konjugate aller chloracetylierten Haptene (OC2, POCC10, POCC12, POCC19-POCC26)

Kopplungsprotokoll:

1. 10 mg Protein in 1 ml 0,1 M Carbonatpuffer, pH 9,6 aufgelöst,
2. dazu 2,5 mg Traut's Reagenz gegeben,
3. 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt,
4. Zentrifugationsfiltration über Sephadex G25, in Carbonatpuffer, pH 9,6 äquibriert,
5. 1 mg Hapen, vorgelöst in 10 µl DMSO oder DMF, dazugegeben,
6. 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt,
7. Zentrifugationsfiltration über Sephadex G25, äquibriert in PBS.

2.3 Herstellung von monoklonalen Antikörpern

2.3.1 Immunisierungen

Alle Immunisierungen wurden mit den entsprechenden KLH-Hapten-Konjugaten vorgenommen. Bei der überwiegenden Anzahl der Immunisierungen erfolgte die erste Immunisierung intraperitoneal mit einer Emulsion aus 100 µl Immunogen (100 bis 150 µg KLH-Konjugat in 100 µl PBS) und 100 µl Kompletten Freundschens Adjuvants (CFA). Eine Auffrischung (Nachimmunisierung) mit 50 bis 200 µg Konjugat in maximal 200 µl PBS ohne Adjuvants erfolgte 4 Tage vor der Fusion. In bestimmten Fällen, wie bei der Gewinnung der Anti-OC7- und Anti-POCc10-Antikörper, wurden eine oder mehrere Nachimmunisierungen in Intervallen von 2 bis 4 Wochen vorgenommen. Die Periode zwischen der ersten und der letzten Immunisierung betrug mindestens 4 Wochen.

In einigen Fällen (z.B. zur Herstellung von Antikörpern gegen das Produkt H6) wurde ein Kurzzeit-Immunisierungsschema mit folgenden Schritten befolgt (Waldmann, 1999):

- Erstimmunisierung mit 50 µg Konjugat mit 100 µl CFA,
- nach einer Woche - 50 µg Konjugat mit 100 µl Inkomplettem Freundschens Adjuvants (IFA),
- nach weiteren 5 Tagen – an 4 aufeinander folgenden Tagen Injektion mit je 400 µg Konjugat in 100 µl PBS,
- 2 Tage nach der letzten Injektion – Fusion.

Zur Gewinnung von Hapten-spezifischen und hydrolytisch-aktiven Antikörpern wurden sowohl Balb/c- als auch C57Bl/6-Inzuchtmäuse immunisiert.

2.3.2 Hybridomtechnik und Zellkultivierung

Das Prinzip der von Köhler und Milstein (1975) entwickelten Hybridomtechnik besteht darin, die antikörperproduzierenden Zellen „unsterblich“ zu machen. Dazu wurden B-Lymphozyten

mit Myelomzellen fusioniert. Die B-Lymphozyten sind hematopoietische Zellen, die auf die Antikörperproduktion spezialisiert sind und *in vitro* nur begrenzt überlebens- und leistungsfähig sind. Bei den verwendeten murinen Myelomlinien handelt es sich um unbegrenzt wachsende Plasmocytommutanten, die keine Antikörper mehr produzieren und keine Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase exprimieren. Bei der auf die Fusion folgenden Selektion in HAT-Medium (siehe unten) können nur die Hybridome (fusionierte Milz- und Myelomzellen) überleben. Die Hybridome, die den gewünschten Antikörper produzieren, werden selektiert, erweitert, kloniert, subkloniert und kryokonserviert.

Die Zellkultivierung erfolgte in Vollmedium, das aus RPMI 1640, 50 μM β -Merkaptoethanol, 2 mM Glutamin und 10 % (v/v) fötalem Kälberserum bestand. Während der Fusion und der Reklonierung wurden 20 % (v/v) fötales Kälberserum eingesetzt. Das Antibiotikum Gentamicin wurde nur während der Fusion und bei der Gewinnung der Feeder-Zellen (siehe unten) in einer Endkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ benutzt.

Das Selektionsmedium HAT (H – Hypoxanthin; A – Aminopterin; T – Thymidin) ist ein Vollmedium, dem 100 μM Hypoxanthin, 16 μM 2-Deoxythymidin und 0,38 μM Aminopterin zugefügt wurden. In einigen Fällen wurde das Aminopterin durch 5,8 μM Azaserin ersetzt.

Fusionen

4 Tage nach der letzten Nachimmunisierung (Boosterung) wurde die Maus durch Zervikaldislokation getötet. Die unter sterilen Bedingungen entnommenen Milzzellen wurden mit einer Mausmyelomzelllinie fusioniert. Als Fusionspartner der Milzzellen wurden 2 murine Myelomzelllinien - X63-Ag8.653 (XN-Zellen) und Sp2/0 – Ag14 (Sp2/0-Zellen) benutzt. Zwei verschiedene Fusionstechniken fanden Anwendung – Fusion mit Polyethylenglykol (PEG, Galfre et al., 1977; Karsten and Rudolf, 1985) und eine Modifikation der Elektrofusion (Stoicheva and Hui, 1994).

Zur Gewinnung polyklonaler Antikörper wurde im Anschluss an die Präparation der Milzzellen durch Herzpunktion Blut entnommen. Das Blut wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß ca. 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Serum wurde vom Blutkuchen abpipettiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Fusion mit PEG 1550

Polyethylenglykol 1550 verursacht eine moderate Schädigung und starke Aggregation der Zellen. Die eigentliche Zellfusion findet nach dem Auswaschen des PEG 1550 bei der spontanen Reparatur der Zellmembranen statt.

Protokoll der Fusion mit PEG 1550

1. Gewinnung der Milzzellen,
2. Ernte der Myelomzellen aus mindestens 2 Zellkulturflaschen von 75 cm²,
3. 2 Mal Waschen in RPMI 1640 (10 min bei 1500 rpm),
4. Zählen der Milzzellen und der Myelomzellen in Neubauer-Zählkammer,
5. Vereinigung der Milzzellen und der Myelomzellen im Verhältnis 1:1 bis 3:1,
6. Pelletieren der Zellen (10 min bei 1500 rpm),
7. Tropfenweise Zugabe von 1 ml Polyethylenglykol 1550 (42 % (w/v) Lösung in RPMI 1640) innerhalb von 90 s,
8. Tropfenweise Zugabe von 1 ml Polyethylenglykol 1550 (25 % (w/v) Lösung in RPMI 1640) innerhalb von 90 s,
9. Tropfenweise Zugabe von 8 ml RPMI 1640 innerhalb von 60 s,
10. Vorsichtiges Pipettieren der Zellen zu mindestens 70 ml HAT-Medium,
11. 2 h Inkubation im Brutschrank.

Elektrofusion mit PEG 8000

Unter Vermittlung von Polyethylenglykol 8000 werden die Zellen geschädigt und aggregiert. Mit Hilfe eines kurzen elektrischen Impulses werden die Zellmembranen kurzzeitig reversibel poriert. Die Wiederherstellung der Zellmembranen erfolgt während der Inkubation im Brutschrank. Die erzielten Ausbeuten sind teilweise 10 Mal höher als bei der klassischen Fusion, weshalb diese Methode bevorzugt benutzt wurde.

Elektrofusionspuffer: BSS, pH 7,4, sterilfiltriert

- 125 mM NaCl
- 5 mM KCl
- 4 mM CaCl₂
- 2,5 mM MgCl₂
- 5 mM Tris-HCl

Protokoll der Elektrofusion mit PEG 8000

1. Gewinnung der Milzzellen,
2. Ernte der Myelomzellen,
3. 3 Mal Waschen in BSS (10 min bei 1500 rpm),
4. Zählen der Milzzellen und der Myelomzellen in Neubauer-Zählkammer,
5. Vereinigung der Milzzellen und der Myelomzellen im Verhältnis 1:1 bis 3:1,
6. Pelletieren der Zellen (10 min bei 1500 rpm),

7. Einstellung der Zelldichte auf 3×10^7 bis 4×10^7 pro ml, bezogen auf Sp2/0-Zellen,
8. Mischen von 100 μ l Zellsuspension und 100 μ l 20 % (w/v) Polyethylenglykol 8000-Lösung in BSS in einem Eppendorfgefäß,
9. Befüllen der Elektroporationsküvette (400 μ l Fassungsvermögen; 2 mm Elektrodenabstand; Biozym, Oldendorf) mit der Zellsuspension aus dem Eppendorfgefäß,
10. Pulsinduktion (Spannung zwischen 500 und 900 V; Impulslänge 20 μ s) mit Elektroporator (EPI 2500, Firma Fischer, Heidelberg),
11. Inkubation in der Küvette für 2 min,
12. Vorsichtiges Pipettieren der Zellsuspension zu mindestens 80 ml Vollmedium,
13. 2 h Inkubation im Brutschrank.
14. Zugabe von Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin.

Nach der Inkubation im Brutschrank wurde die Zellsuspension auf mindestens 8 Zellkulturplatten (100 μ l/Napf in 96 Napf-Platte; Greiner, Frickenhausen) verteilt, die bereits 100 μ l/Napf Feeder-Zellen im HAT-Medium enthielten.

Ein Teil der Milzzellen (15 – 25 %) wurde jeweils in Vollmedium als Milzzellkultur angelegt und ca. 10 Tage kultiviert. Der Überstand der Milzzellkultur wurde bei den Festphasen-Immunoassays neben dem Immuns serum als Positivkontrolle verwendet.

Zur Gewinnung von Feeder-Zellen wurde eine nicht immunisierte Maus (Auszucht, Stamm AB, Balb/c oder NMRI) durch Zervikaldislokation getötet. Die Bauchhöhle wurde mit 10 ml sterilem, eiskaltem RPMI 1640 ausgespült. Nachfolgend wurden die suspendierten Makrophagen in Vollmedium aufgenommen. Aus einer Maus wurden je nach Mausstamm 60 bis 120 ml Feeder-Zellsuspension bereitet.

Reklonierungen

Reklonierungen wurden zur Etablierung von Hybridomen (zweifach) und zur Sicherung der Monoklonalität bei Kulturen, die längere Zeit geführt wurden, durchgeführt. Zur Reklonierung der Hybridome wurde die Methode der limitierenden Verdünnung eingesetzt. Die Zellen wurden gezählt, anschließend wurden sie auf eine 96 Napf-Platte mit Feeder-Zellen in einer solchen Verdünnung ausgesät, dass durchschnittlich auf jeden Napf nur eine Zelle entfiel. Zeitweise war die Klonierungseffizienz sehr gering, so dass mit höherer Einsaat (2-4 Zellen/Napf) gearbeitet wurde. Die Kontrolle der Reklonierung erfolgte unter dem Mikroskop.

Zellkultivierung

Nach erfolgreicher Reklonierung wurden die Hybridomklone schrittweise erweitert - zunächst in eine 24 Napf-Platte mit Feeder-Zellen und anschließend in verschiedene Zellkulturflaschen. Für die Massenproduktion von Antikörpern wurden Zellkulturflaschen mit 300 cm² sowie in einigen Fällen CL 1000-Flaschen der Firma INTEGRA Bioscience (Fernwald; Inokulation mit ca. 25×10^6 Zellen) eingesetzt.

Die Kontrolle der Antikörperproduktion im Festphasen-Immunoassay erfolgte wöchentlich.

Gefrierkonservierung

Die Gefrierkonservierung erlaubt die Sicherung der gewonnenen Hybridome zu nahezu jedem Zeitpunkt. Die Zellen wurden aus 24- und 6-Napf Zellkulturplatten in 0,5 ml Vollmedium geerntet. Wenn aus 25 cm²-Kulturflaschen oder größeren Flaschen eingefroren wurde, wurden die Zellen durch Zentrifugieren (1000 rpm für 5 min) pelettiert und anschließend in 0,5 ml Vollmedium aufgenommen.

Die 0,5 ml Zellsuspension wurde in auf Eis stehende Einfrierröhrchen überführt und mit 0,5 ml kaltem Einfriermedium (RPMI 1640 mit 20 % (v/v) fötalem Kälberserum und 15 % (v/v) DMSO) versetzt. Die Röhrchen wurden in eine auf 4 °C vorgekühlte Styroporbox (Wanddicke 5 cm) gestellt und anschließend bei -80 °C langsam eingefroren. Durch die Isolation wurde die benötigte langsame Absenkung der Temperatur (ca. 1 °C/min) erreicht. Die Langzeitlagerung der Ampullen wurde in flüssigem Stickstoff durchgeführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37 °C. Danach wurde die Zellsuspension sofort auf 10 ml mit kaltem Vollmedium verdünnt, pelettiert (1000 rpm für 5 min), in Vollmedium aufgenommen und ausgesät.

2.3.3 Reinigung von Immunglobulinen

Die Antikörper wurden vor allem zum Nachweis der katalytischen Aktivität und zum Einsatz in Festphasen-Immunoassays gereinigt.

Die Wahl der Reinigungsmethode hängt vom Isotyp des Antikörpers ab. Antikörper der IgG-Klasse lassen sich in der Regel mit Hilfe von immobilisiertem Protein A und Protein G reinigen. IgM Antikörper binden in der Regel nicht an Protein A oder Protein G. Reinigung von IgM mit Hilfe einer Protein L-Säule ist nur möglich, wenn die leichte Kette an Protein L bindet und der Antikörper bei dem für die Elution erforderlichen niedrigen pH-Wert nicht denaturiert wird. IgM-Antikörper können außerdem mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie gereinigt werden.

2.3.3.1 Affinitätschromatographie an Protein A oder Protein L

Protein A

Protein A bindet an den konstanten Teil der schweren Kette der Immunglobuline der Klasse IgG verschiedener Spezies, inklusive Maus (Lindmark et al., 1983). Die Bindungsaffinität der verschiedenen murinen IgG Subklassen nimmt in der Reihenfolge IgG3, IgG2b, IgG2a, IgG1 ab. Da die Subklasse der zu reinigenden Antikörper vorher ermittelt wurde, konnte der Elutionspuffer in Abhängigkeit vom Isotyp ausgewählt werden.

Puffer:

Beladungspuffer: 4 M NaCl mit 2 M Glycin-NaOH, pH 8,9

Elutionspuffer I: 100 mM Natriumcitrat

IgG Subklasse	IgG2b	IgG2a	IgG1
Elutionspuffer I	pH 3,5	pH 4,5	pH 5,0

Elutionspuffer II: 100 mM Natriumcitrat, pH 2,0

Neutralisationspuffer: 3,5 M Tris-HCl, pH 9,0

Die Kulturüberstände wurden zentrifugiert (15 min bei 10.000 rpm) und anschließend filtriert (Porendurchmesser 0,45 µm). IgG1-Kulturüberstände wurden 1:2 mit Beladungspuffer versetzt, da IgG1 in schwach basischem Milieu bei hoher Ionenstärke besser an Protein A bindet. IgG2a- und IgG2b-Kulturüberstände wurden nur mit soviel Beladungspuffer versetzt, bis ein basischer pH-Wert erreicht war. Die Beladung der Protein A – Säulen (Biotex, Berlin, 4 ml Trägermaterial) erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 1 - 2 ml/min. Nicht affin gebundenes Material wurde mit 1:3 verdünntem Beladungspuffer von der Säule gewaschen. Die Elution mit beiden Elutionspuffern erfolgte mit 1 ml/min, beginnend mit Elutionspuffer I. Die optische Dichte wurde mit Hilfe eines 280 nm – Durchflussphotometers (UV-1, Pharmacia LKB, Lund, Schweden) detektiert und mit einem Schreiber registriert. Das Eluat wurde sofort mit dem Neutralisationspuffer (Verdünnung 1:10) gemischt, um eine Denaturierung des Antikörpers zu vermeiden. Der Elutionspuffer II wurde zur Regenerierung der Säule eingesetzt, da verschiedene Antikörper an einer Säule gereinigt wurden.

Protein L

Protein L sollte an leichte Ketten vom κ-Typ binden (Akerstrom and Bjorck, 1989; Nilson et al., 1993). Da bei weitem nicht alle murinen Antikörper von Protein L gebunden werden, wurden alle Antikörper vor der Reinigung auf Bindung getestet. Die Kopplung von 1,8 mg Protein L (Actigen, Grossbritannien) an eine NHS-aktivierte 1 ml-HiTrap-Säule (Pharmacia,

Lund, Schweden) nach Vorschrift des Herstellers wurde freundlicherweise von Dr. Olaf Behrsing durchgeführt.

Der zentrifugierte und filtrierte Kulturüberstand wurde mit Beladungspuffer (4 M NaCl mit 2 M Glycin, pH 8,9) im Verhältnis 4:1 gemischt und langsam über die Protein L-Säule gepumpt (Geschwindigkeit 1 ml/min oder kleiner). Nicht affin gebundenes Material wurde mit 1:3 verdünntem Beladungspuffer von der Säule gewaschen. Eluiert wurde mit 40 mM Natriumcitrat, pH 2,75. Neutralisiert wurde mit Neutralisationspuffer, wie oben beschrieben.

2.3.3.2 Ionenaustauschchromatographie an Bakerbond ABx

Bakerbond ABx (J. T. Baker Inc., Phillipsburg, USA) ist ein speziell für die Reinigung von Antikörpern entwickelter Ionenaustauscher. Bakerbond ABx Prepscale (Partikelgröße 40 µm) wurde mit 25 mM MES-Puffer, pH 5,5 äquilibriert und in 7 ml Eigenbausäulen gefüllt.

Die zentrifugierten und filtrierten Kulturüberstände wurden 1:1 mit MES-Puffer gemischt und mit einer Geschwindigkeit von ca. 2 ml/min über die Säule gepumpt. Nach Abschluss der Beladung wurde die Säule mit MES-Puffer gewaschen, um ungebundenes Material zu entfernen. Die Elution des Antikörpers mit 1 M Natriumacetat-Puffer, pH 7,0 wurde am Durchflussphotometer bei 280 nm verfolgt. Die Regenerierung der Säule erfolgte mit 2 M Natriumacetat-Puffer + 0,1 % NaN₃, pH 6,0. Bei erneuter Anwendung wurde die Säule vor Beladung mit mindestens 10 Säulenvolumen MES-Puffer äquilibriert.

2.3.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Reinheit der Antikörper-Präparate wurde eine SDS-PAGE nach Laemmli (1970) durchgeführt. Es wurde eine Elektrophoreseapparatur Minigel Twin (Biometra, Göttingen) verwendet und die Proben wurden unter reduzierenden Bedingungen getestet. Ein Gradientengel (7,5 - 15 % Acrylamid) von etwa 6 cm Länge wurde zur Trennung der Proteine eingesetzt. Die Anfärbung wurde mit Coomassie Brilliant Blue R-250 vorgenommen. Als Molekulargewichtsstandards dienen Lactalbumin (14,4 KDa), Trypsininhibitor (20,1 KDa), Carbonsäureanhydrase (30 KDa), Ovalbumin (45 KDa), BSA (66 KDa) und Phosphorylase b (97 KDa) aus dem Low Molecular Weight Electrophoresis Calibration Kit (Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden).

2.3.5 Umpuffern und Einengen der Antikörper

Für den Einsatz im Festphasen-Immunoassay wurden die aufgereinigten Antikörper im Elutionspuffer belassen. Die hohe Ionenstärke des Elutionspuffers wirkte stabilisierend und die Antikörper konnten über Monate bei 4 °C aufbewahrt werden.

Für das Screening auf katalytische Aktivität wurden die Antikörper mit Hilfe von Vivaspin 4 ml – Ultrafiltrationseinheiten (Vivascience, Gloucestershire, Grossbritannien) eingeeengt und in PBS mit 0,01 % NaN_3 umgepuffert. Die Antikörperlösungen wurden bei 5000 rpm/min bis auf ca. 200 μl eingeeengt und danach mehrfach mit 4 ml PBS gewaschen. Die Antikörperkonzentration wurde durch Absorptionsmessungen bei 280 nm bestimmt. Zugrunde gelegt wurden Extinktionen bei 280 nm von 1,43 für 1 mg/ml IgG und 1,18 für 1 mg/ml IgM (Coligan et al., 1992-2002). Die eingestellte Konzentration der Antikörper betrug ca. 10 mg/ml.

2. 4 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper

2.4.1 Bindungsassays

Bindungsassays wurden u.a. zur Charakterisierung der Hapten-Trägerprotein-Konjugate, zum Screenen von Fusionen und zur Überprüfung der Antikörperproduktion der Zellkulturen eingesetzt.

Die Bindungsassays wurden nach folgendem Schema durchgeführt (Abb. 2.5):

1. Adsorption des BSA-Hapten-Konjugates in 96-Napf Mikrotiterplatten aus Polystyrol, meist in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$, Inkubation von 80 $\mu\text{l/Napf}$ in PBS für 24 h bei 4 °C.
2. Abblocken mit Blockpuffer (PBS, 5 % (v/v) neonatales Kälberserum und 0,01 % (w/v) Phenolrot), Inkubation mit 100 $\mu\text{l/Napf}$ für 30 min bei Raumtemperatur.
3. Inkubation mit den antikörperhaltigen Präparaten, ggf. verdünnt in Blockpuffer, 50 $\mu\text{l/Napf}$ für 1 h bei Raumtemperatur.
4. Inkubation mit einem polyklonalen Peroxidase-markiertem Ziege-Anti-Maus-Ig-Antikörper (Verdünnung in Blockpuffer nach Empfehlung des Herstellers), 50 $\mu\text{l/Napf}$ für 1 h bei Raumtemperatur.
5. Inkubation mit Peroxidase-Substrat (1 mg/ml *o*-Phenylendiamin und 0,01 % (v/v) Wasserstoffperoxyd in 50 mM Natriumcitrat und 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat, pH 5,0), 50 $\mu\text{l/Napf}$ für variable Inkubationszeiten (3 bis 30 min) bei Raumtemperatur.
6. Stoppen der Enzymreaktion mit 1 M Schwefelsäure mit 50 mM Natriumsulfit, 100 $\mu\text{l/Napf}$.
7. Absorptionsmessung bei 490 nm im Mikrotiterplatten-Photometer (Dynex MRX, Chantilly, USA).

Die Platten wurden zwischen den einzelnen Inkubationen 3 Mal mit kaltem Leitungswasser gewaschen. Nur nach der Inkubation mit dem polyklonalen Peroxidase-konjugiertem Anti-Maus-Ig-Antikörper wurde 10 Mal gewaschen. Alle Inkubationen fanden in einer Feuchtkammer statt.

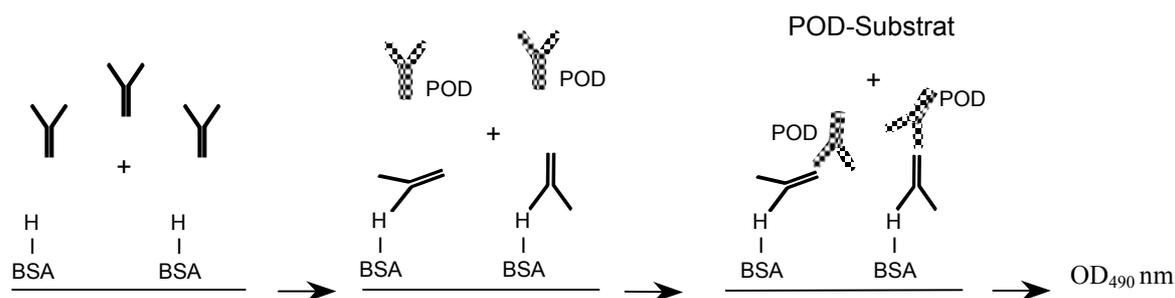


Abb. 2.5: Schematische Darstellung eines Bindungsassays

Die mit dem Antigen beschichtete und abgeblockte Mikrotiterplatte wurde mit dem antikörperhaltigen Präparat inkubiert. Im nachfolgenden Inkubationsschritt wurde der Peroxidase-markierte Ziege-Anti-Maus-Ig-Antikörper aufgetragen. Danach wurde das Enzymsubstrat zugegeben und das entstandene farbige Produkt bei 490 nm vermessen.

Klassen- und Subklassenbestimmung:

Zur Bestimmung des Isotypes wurde das BSA-Hapten-Konjugat immobilisiert und danach mit den zu untersuchenden antigenspezifischen Antikörpern inkubiert (50 μl /Napf, 1 h bei Raumtemperatur). Danach wurde mit den subklassenspezifischen Biotin-konjugierten Ziege-Anti-Maus-Ig-Antikörpern und anschließend mit Alkalischer Phosphatase-konjugiertem Streptavidin (alle Verdünnungen nach Empfehlung des Herstellers, 50 μl /Napf, 1 h bei Raumtemperatur) inkubiert. Als Substrat für die alkalische Phosphatase dienten 3,7 mg/ml *p*-Nitrophenylphosphat in 0,1 M Diethanolamin-HCl-Puffer, pH 10,0 (50 μl /Napf, Inkubation 30 min bei Raumtemperatur). Die Enzymreaktion wurde mit 100 μl /Napf 1 M NaOH gestoppt. Die Absorption wurde anschließend im Mikrotiterplatten-Photometer bei 405 nm gemessen.

2.4.2 Kompetitive Immunoassays

Kompetitive Immunoassays wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, um die Spezifität der monoklonalen Antikörper zu untersuchen (Kreuzreaktivität, mögliche Bindung an die Kopplungsgruppe) und die Nachweisgrenze für bestimmte gelöste Haptene zu ermitteln. Vor Durchführung eines Kompetitionsassays wurde der Antikörper austitriert, d.h. es wurde die Abhängigkeit des Signals von der Antikörperkonzentration aufgenommen. Für den eigentlichen Wettbewerbstest wurde eine Antikörperkonzentration aus dem mittleren linearen Bereich gewählt. Der Antikörper in der so bestimmten Konzentration wurde mit dem zu untersuchenden Hapten 30 bis 60 min unter Schütteln vorinkubiert und dann auf die bereits mit dem BSA-Hapten-Konjugat beschichtete und abgeblockte Mikrotiterplatte aufgetragen (Abb. 2.6). Die weiteren Inkubationsschritte (mit POD-konjugiertem Anti-Maus-Ig-Antikörper und Substrat) sind oben beschrieben (siehe 2.4.1 Bindungsassays).

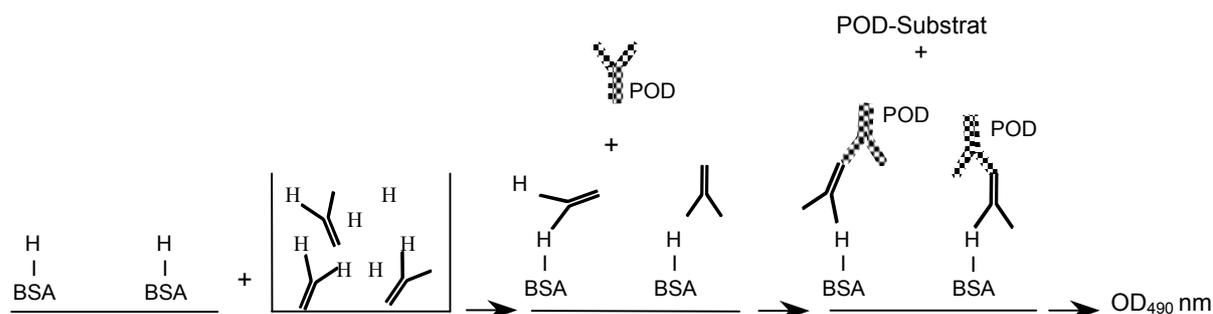


Abb. 2.6: Schematische Darstellung eines indirekten Wettbewerbsassays

Das antikörperhaltige Präparat wurde mit dem Hapten vorinkubiert und auf die mit dem Antigen beschichtete und abgeblockte Mikrotiterplatte aufgetragen. Es folgten Inkubationen mit dem Peroxidase-markierten Ziege-Anti-Maus-Ig-Antikörper und mit dem POD-Substrat. Die OD wurde bei 490 nm gemessen.

IC_{50} -Wert, Kreuzreaktivität und untere Nachweisgrenze wurden wie folgt bestimmt. Der IC_{50} -Wert ist die Konzentration des untersuchten Analyten [M], die zu einer 50 %igen Reduzierung des Signals führt. Die Analytkonzentration, die zu einer 10 %igen Reduzierung des Signals führt, wurde als untere Nachweisgrenze definiert.

Die Kreuzreaktivität für ähnliche Verbindungen wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Kreuzreaktivität [\%]} = IC_{50 \text{ für Analyt}} / IC_{50 \text{ für Testverbindung}} \times 100,$$

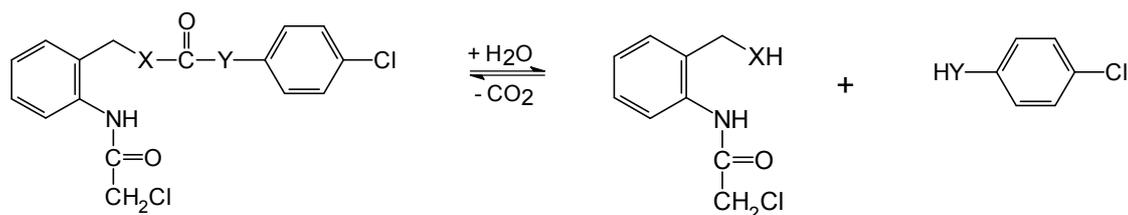
wobei $IC_{50 \text{ für Analyt}}$ der Wert für das Analyt, $IC_{50 \text{ für Testverbindung}}$ der Wert für die ähnliche Verbindung ist.

2.4.3 Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante mittels BIACORE®

Die Bindung eines monoklonalen Antikörpers an das entsprechende Antigen oder andere kreuzreagierende Substanzen kann mit Hilfe der thermodynamischen Gleichgewichtsdissoziationskonstante $K_D = [Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag\text{-Komplex}]$ und der kinetischen Assoziations- (k_{on}) und Dissoziations-Konstante (k_{off}) beschrieben werden. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten wurden freundlicherweise von Dr. Walter Stöcklein, Universität Potsdam, am BIACORE® 2000 (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden) in der homogenen Flüssigphase bestimmt.

2.5 Nachweis der hydrolytischen Aktivität der monoklonalen Antikörper

Die durch Antikörper zu katalysierende Spaltung von Arylcarbamaten und -harnstoffen ist hier vereinfacht am Beispiel der Substanzen OC2, POCc12 und POCc19 dargestellt (Abb. 2.7):



Substrat	X	Y
OC2	NH	NH
POCc12	O	NH
POCc19	NH	O

Abb. 2.7: Hydrolyse von Arylcarbamaten und Arylharnstoffen am Beispiel der Benzylphenylcarbamate POCc12 und POCc19 und des Benzylphenylharnstoffs OC2.

Die durch Antikörper vermittelte Spaltung kann durch Messung der Abnahme der Substratkonzentration oder durch Detektion der entstandenen Spaltprodukte nachgewiesen werden.

2.5.1 Nachweis der Substratabnahme mit Anti-Substrat-Antikörpern

Zum Nachweis der Hydrolyse des Arylcarbamates POCc12 wurde ein Bindungsassay (catELISA) mit dem Anti-Substrat-Antikörper B76-BF5 nach dem folgenden Schema aufgebaut (Abb. 2.8):

1. Adsorption des konjugierten Substrats (BSA-POCc12) 50 µg/ml, 80 µl/Napf für ca. 20 h bei 4 °C.
2. Auftrag der Kulturüberstände der potenziell katalytischen Anti-ÜZA-Antikörper und Inkubation für 24 h bei Raumtemperatur.
3. Auftrag des Biotin-konjugierten Anti-Substrat-Antikörpers B76-BF5 (1 µg/ml) für 1 h bei Raumtemperatur.
4. Auftrag von mit alkalischer Phosphatase konjugiertem Streptavidin, Substratauftrag und Substratentwicklung wie im Kapitel 2.4.1 beschrieben.

Die Biotinmarkierung des Anti-Substrat-Antikörpers B76-BF5 wurde freundlicherweise von Dr. Olaf Behrsing mit NHS-LC-Biotin (Pierce) in 100 mM NaHCO₃ nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

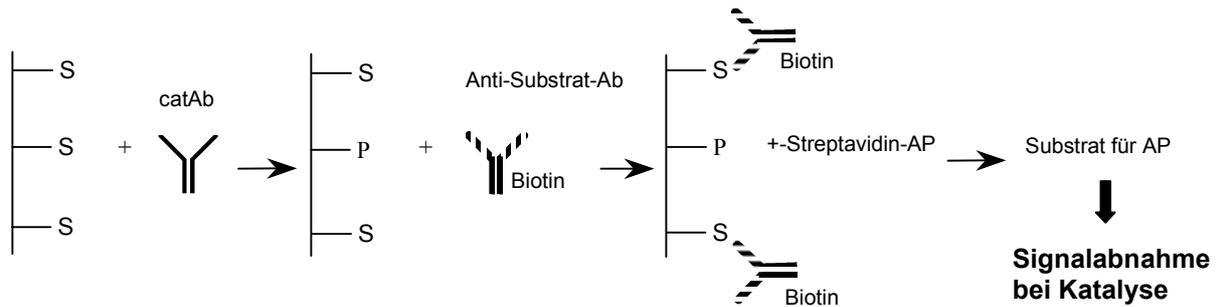


Abb. 2.8: Schematische Darstellung eines katalytischen Bindungsassays mit einem Anti-Substrat-Antikörper

Zuerst wurde der potenziell katalytische Antikörper mit dem immobilisierten Substrat inkubiert. Als Nachweisantikörper wurde der biotinmarkierte Anti-Substrat-Antikörper B76-BF5 eingesetzt. Danach wurde mit Streptavidin-AP und mit dem Enzymsubstrat inkubiert. Die Messung der OD erfolgte bei 405 nm.

Die Hydrolyse von POCc12 wurde außerdem mit einem Kompetitionsassay (Abb. 2.9) untersucht. Dazu wurde BSA-POCc12 (50 µg/ml) über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Die Kulturüberstände, die die Anti-ÜZA-Antikörper enthielten, wurden mit verschiedenen POCc12-Konzentrationen für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit dem biotinmarkierten Anti-Substrat-Antikörper B76-BF5 für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und auf die mit POCc12 beschichteten und abgeblockten Platten aufgetragen. Als Kontrolle zu jedem potenziell katalytischen Kulturüberstand diente PBS mit 5 % (v/v) neonatalem Kälberserum. Der Nachweis erfolgte über Alkalische Phosphatase-konjugiertes Streptavidin und Substratreaktion, wie im Kapitel 2.4.1 beschrieben.

Diese Tests können auch zum Nachweis der Hydrolyse des Arylharnstoffes OC2 eingesetzt werden.

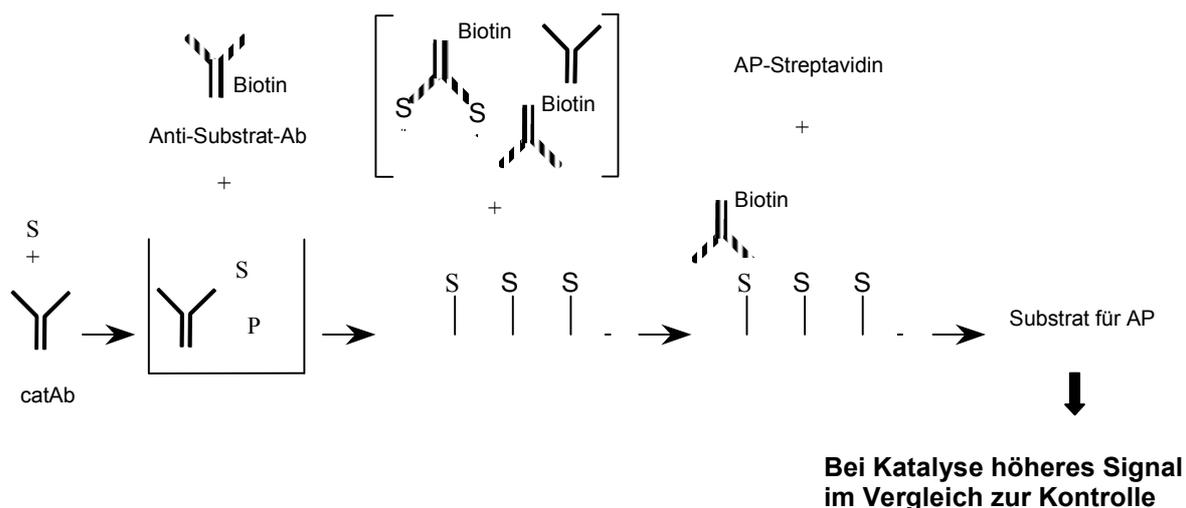


Abb. 2.9: Schematische Darstellung eines katalytischen Wettbewerbsassays mit einem Anti-Substrat-Antikörper

Das Substrat wurde zuerst mit dem potenziell katalytischen Antikörper und danach mit dem biotinmarkierten Anti-Substrat-Antikörper inkubiert. Dieses Gemisch wurde dann auf die mit dem Hapten beschichtete und abgeblockte Mikrotiterplatte aufgetragen. Die Detektion erfolgte nach Inkubation mit Streptavidin-AP und Enzymsubstrat durch Messung der OD bei 405 nm.

2.5.2 Nachweis der Produktentstehung

2.5.2.1 Detektion von Anilinen mit Dimethylaminozimtaldehyd

Zur Detektion von Anilin oder substituierten Anilinen (potenzielle Spaltprodukte der Hydrolyse von Arylcarbamaten und Arylharnstoffen) wurde eine photometrische Methode zum Nachweis primärer aromatischer Aminogruppen verwendet. Die Methode wurde in Kooperation mit Dr. Axel Warsinke, Universität Potsdam, für *p*-Chloranilin (pCA) entwickelt und optimiert.

Reaktionsmechanismus:

Das durch die Substrathydrolyse entstehende substituierte Anilin (Abb. 2.7) wurde mit Hilfe von Dimethylaminozimtaldehyd (DACA, gelbe Färbung) in ein rotes, photometrisch gut detektierbares Derivat überführt. Die Reaktionsfolge ist in Abb. 2.10 dargestellt.

Verwendete Puffer und Lösungen:

0,5 M Citronensäure-HCl-Puffer, pH 1,0

2 mM Stammlösung des jeweiligen Substrats in DMSO

gesättigte DACA-Lösung in Ethanol

50 mM Bicin-HCl-Puffer + 100 mM NaCl, pH 8,5

PBS

Antikörper-Lösung in PBS + 0,01 % (w/v) NaN_3 , ca. 10 mg/ml

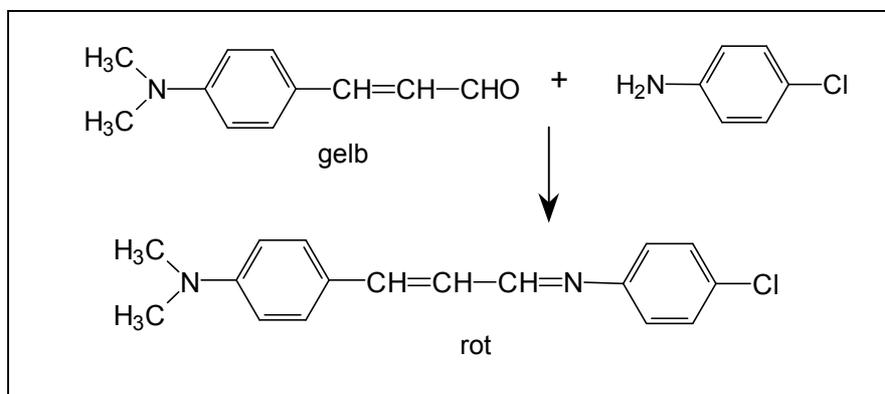


Abb. 2.10: Reaktionsschema von substituierten Anilinen (hier *p*-Chloranilin), die als potenzielle Produkte der hydrolytischen Aktivität der Antikörper entstehen, mit Dimethylaminozimtaldehyd. Der Nachweis des roten Reaktionsproduktes erfolgte photometrisch bei 538 nm.

Zuerst wurde die Spontanhydrolyse der Substanzen gemessen. Dazu wurden 25 μl einer 2 mM-Substratlösung in DMSO in 475 μl Bicin-Puffer, pH 8,5 zugegeben. Damit betrug die Endkonzentration DMSO 5 % (v/v). Die Inkubation für die weniger stabilen Verbindungen (Substanzen 2, 3, 4, 5, 6, 16, 17, 18, 20, 23 und 24) wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Proben wurden nach 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 und 320 min genommen. Die Inkubation der stabileren Substanzen (OC2, POCc12 und POCc17) erfolgte bei 40 °C im Brutschrank. Die Messungen wurden über 7 Tage täglich durchgeführt.

Für den Farbttest wurden 40 μl des Inkubationsansatzes mit 40 μl 0,5 M Citronensäure-HCl-Puffer gemischt und dann wurden 20 μl der gesättigten ethanolischen DACA-Lösung zugegeben. Die Farbentwicklung wurde nach 5 min visuell und im Photometer bei 538 nm beurteilt.

Für die Katalysmessungen wurden Reaktionsansätze von mindestens 50 μl mit 1 mM Substrat (5 % (v/v) Endkonzentration DMSO) mit und ohne Antikörper angefertigt. Die Antikörper wurden in einer Konzentration von ca. 1 mg/ml in Bicin-Puffer, pH 8,5 eingesetzt. In der Kontrolle wurde der Antikörper durch PBS mit 0,01 % NaN_3 ersetzt. Als Kontrolle für die Anti-ÜZA-Antikörper diente ein irrelevanter Antikörper in der selben Konzentration – der Anti-Diuron-Antikörper B91-KF5. Die Messungen erfolgten nach Inkubationszeiten, die den zuvor ermittelten ungefähren Halbwertszeiten entsprachen. Der Ansatz für die Farbreaktion erfolgte analog dem Ansatz zur Messung der Spontanhydrolyse.

2.5.2.2 Detektion von Phenolen

2.5.2.2.1 Amperometrische Detektion von Phenolen

Zur Messung von Phenol und *p*-Chlorphenol (pCP) als Produkte der Antikörper-vermittelten Hydrolyse von Arylcarbamaten (z.B. POCc19, Abb. 2.7) wurde ein Enzymsensor, basierend auf immobilisierter Tyrosinase verwendet. Alle Nachweise der Katalyse und die kinetischen Messungen wurde in Kooperation mit Dr. Axel Warsinke, Universität Potsdam, durchgeführt. Die mit Tyrosinase (isoliert aus Champignons; *Agaricus bisporus*; EC 1.14.18.1; Fluka; Taufkirchen) immobilisierten Dickschicht-Elektroden wurden freundlicherweise von der Firma Bio Sensor Technologie GmbH, Berlin, zur Verfügung gestellt. Die Messzelle wurde speziell für die Dickschicht-Elektrode in der Arbeitsgruppe von Prof. Scheller, Universität Potsdam, entwickelt und angefertigt. Die Messzelle (Fassungsvermögen 500 µl) wurde mit einem Magnetrührer versehen. Gemessen wurde mit einem 2-Elektrodensystem. Als Arbeitselektrode diente eine Platinelektrode, als Referenzelektrode eine Ag/AgCl-Elektrode Huang et al., 1998). Der benutzte Potenziostat war ein Biometra EP 30 (Biometra, Göttingen). Es wurden Strom-Zeit-Kurven aufgenommen.

Mechanismus der Tyrosinase-Reaktion

Die Tyrosinase katalysiert zwei verschiedene Reaktionen (Dawson and Magee, 1955). Im ersten Schritt addiert das Enzym eine Hydroxylgruppe zum Phenol oder zum substituierten Phenol (Monophenolase-Aktivität; Abb. 2.11). Im zweiten Schritt wird das entstandene Catechol (*o*-Diphenol) zu einem Chinon oxidiert (Diphenolase-Aktivität, Abb. 2.11), das elektrochemisch nachgewiesen werden kann. Für beide Schritte wird molekularer Sauerstoff benötigt. An der Ag/AgCl-Elektrode erfolgt bei anliegendem Potenzial von -50 mV die Reduzierung des Chinons zum Catechol.

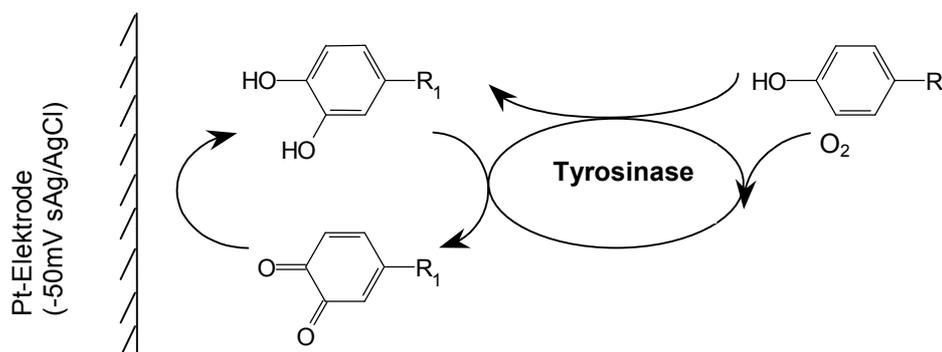


Abb. 2.11: Schematische Darstellung der im Enzymsensor ablaufenden Prozesse

Zur Bestimmung der optimalen Bedingungen für das Screening auf Katalyse wurden folgende Puffer eingesetzt:

- 100 mM MES-NaOH + 100 mM NaCl, pH 4,7
- 100 mM MES-NaOH + 100 mM NaCl, pH 6,5
- 100 mM Kaliumphosphatpuffer + 100 mM NaCl, pH 6,9
- 100 mM Bicin-HCl + 100 mM NaCl, pH 8,5

Der Inkubationsansatz enthielt 100 μ M Substrat (POCc18, POCc19 oder Substanz 27) und 5 % (v/v) DMSO in dem entsprechenden Puffer. Gemessen wurde nach verschiedenen Zeitintervallen.

Inkubationsansatz für die Messung der Spontanhydrolyse:

100 μ M Lösungen der Substrate POCc18, POCc19 und Substanz 27 mit 5 % (v/v) DMSO in 100 mM Bicin-HCl + 100 mM NaCl, pH 8,5 wurden über 36 h inkubiert. In den ersten 8 h erfolgten die Messungen in Intervallen von 10 min, danach wurde alle 8 h gemessen.

Inkubationsansatz für das Screening auf Katalyse: 50 μ l

- 1 mg/ml Antikörper oder PBS + 0,01 % NaN_3
- Substrat (1 mM oder 100 μ M) mit 5 % (v/v) DMSO als Lösungsvermittler
- 100 mM Bicin-HCl + 100 mM NaCl, pH 8,5

Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur außerhalb der Messzelle. Die Inkubationszeit hing von der zuvor ermittelten ungefähren Halbwertszeit des verwendeten Substrats ab. Die Antikörperstammlösungen enthielten ca. 10 mg/ml Antikörper in PBS + 0,01 % NaN_3 , pH 7,3.

Ansatz in der elektrochemischen Messzelle:

360 μ l Messpuffer (100 mM Kaliumphosphatpuffer + 100 mM NaCl, pH 6,5) wurden vorgelegt und nach Stabilisierung der Basislinie wurden 40 μ l des Inkubationsansatzes dazugegeben. Nach Ablesen der Stromstärke wurde die Messzelle dreifach mit Messpuffer gespült. Die Aufbewahrung der Dickschichtelektroden erfolgte bei 4 °C. Eine Stammlösung des Substrats (meistens 0,4 M) wurde in DMSO vorbereitet, aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

2.5.2.2 Detektion von Phenolen mit HPLC

Mit der HPLC wurde *p*-Chlorphenol nachgewiesen. Die dafür notwendigen Messungen wurden freundlicherweise von Kristian Lettau aus der Arbeitsgruppe von Dr. Axel Warsinke durchgeführt. Es wurde ein Rainin Instrument mit 2 Pumpen SD-300, UV-D II Detektor (I1 = 280 nm, I2 = 415 nm), L 7480 verwendet.

Methode:

Vorsäule:	LiChrospher® RP-18 (5 µm) in LiChroCart® 4-4 (Merck, Darmstadt)
Säule:	LiChrospher® RP-18 (5 µm) in LiChroCart® 250-4 (Merck, Darmstadt)
Eluent A:	Aqua bidest. oder 100 mM Bicin-HCl + 100 mM NaCl, pH 7,5
Eluent B:	Acetonitril, 35%
Detektion:	Merck Hitachi Fluoreszenz-Detektor (IEx = 280 nm, IEm = 330nm)
Fliessgeschwindigkeit:	0,55 ml/min
Injektionsvolumen:	20 µl

Für die Bestimmung von POCc19 und pCP wurde Aqua bidest., für die Ansätze mit Antikörper (1 mg/ml) und die Kontrollen wurde 100 mM Bicin-HCl + 100 mM NaCl, pH 7,5 benutzt. Die Konzentration der untersuchten Substanzen lag zwischen 200 µM und 50 µM. Die Stammlösungen des Substrats POCc19 wurden in Acetonitril vorbereitet und in einer Verdünnung von bis zu 1:10 eingesetzt. Die Messung der antikörperhaltigen Ansätze und der entsprechenden Kontrollen erfolgte sofort nach Zugabe des Substrats und nach einer Inkubationszeit von 30 min.

2.6 Kinetische Untersuchungen

Die kinetischen Messungen umfassten zeit- und substratabhängige Reaktionen der Abzyme und dienen dem Verständnis der Mechanismen der Katalyse. Sie wurden mit Hilfe des Tyrosinase-Sensors durchgeführt.

Zur Bestimmung der optimalen Bedingungen (pH, Puffersystem) für die kinetischen Messungen wurden folgende Puffer eingesetzt:

- 100 mM Bicin-HCl + 100 mM NaCl – pH 7,5; pH 8,0; pH 8,5 und pH 9,0
- 100 mM Kaliumphosphatpuffer + 100 mM NaCl – pH 6,9; pH 7,5 und pH 8,2
- 100 mM Natriumcarbonatpuffer + 100 mM NaCl – pH 8,5 und pH 9,0

Die Ansätze enthielten 1 mM des Substrats POCc19, 5 % (v/v) DMSO und 1 mg/ml Antikörper (bzw. Kontrolle) im jeweiligen Puffer. Die Inkubationszeit wurde variiert. Die Antikörper lagen in den Stammlösungen in einer Konzentration von ca. 10 mg/ml in PBS + 0,01 % NaN₃, pH 7,3 vor.

Für die kinetischen Messungen wurden folgende Puffer verwendet:

- 100 mM Bicin-HCl + 100 mM NaCl, pH 7,5
- 100 mM Bicin-HCl + 100 mM NaCl, pH 8,0
- 100 mM Kaliumphosphatpuffer + 100 mM NaCl, pH 6,9

Der Inkubationsansatz hatte ein Volumen von 250 μ l und bestand aus:

- 1 mg/ml Antikörper oder PBS + 0,01 % NaN_3
- POCc19 in einer Endkonzentration von 0 μ g/ml, 10 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 75 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 500 μ g/ml und 1000 μ g/ml mit 5 % (v/v) DMSO
- Puffer (s.o.)

In bestimmten Zeitintervallen wurde ein Aliquot aus dem Inkubationsansatz entnommen und in die Messzelle gegeben.

Aus den gemessenen Daten wurden mit Hilfe des Computerprogramms Origin 5.0 die kinetischen Konstanten (v_{\max} und k_m) ermittelt. Die errechnete Wechselzahl k_{cat} ist ein Maß für die Aktivität eines Enzyms. Als Wechselzahl eines Enzyms bezeichnet man die Anzahl von Substratmolekülen, die bei vollständiger Sättigung des Enzyms mit Substrat pro Zeiteinheit von einem aktiven Zentrum in Produkt umgewandelt werden.

Inkubationsansatz für Inhibitionsmessungen: 50 μ l

- 1 mg/ml Antikörper oder PBS + 0,01 % NaN_3
- variable Konzentrationen des Inhibitors Hei3 oder OC4 in DMSO
- verschiedene Konzentrationen des Substrats POCc19
- 100 mM Bicin-HCl + 100 mM NaCl, pH 7,5 oder 100 mM Bicin-HCl + 100 mM NaCl, pH 8,0; 5 % (v/v) DMSO.

Die Inhibitionsmessungen wurden mit drei verschiedenen Konzentrationen des Substrates POCc19 (100 μ M, 250 μ M und 500 μ M) und mindestens 5 verschiedenen Konzentrationen des ÜZA Hei3 in Bicin-Puffer, pH 7,5 und pH 8,0 durchgeführt.

Vom ÜZA OC4 wurden 10 μ M und 100 μ M mit 100 μ M POCc19 eingesetzt. Das ÜZA OC4 löste sich schwerer in DMSO als Hei3. Die Stammlösung von 40 mM OC4 enthielt deshalb 1 % Twin 20. Die Endkonzentration von Twin 20 in der Messzelle betrug 0,0025 % (v/v) und hatte keine messbare Auswirkung auf die dort ablaufenden Prozesse.

2.7 *In vitro* und *in vivo* Tests mit Antikörpern gegen Diuron

Mit diesen Versuchen wurde der Einfluss der im Laufe des Gesamtprojekts „Katalytische Antikörper“ generierten Anti-Diuron-Antikörper auf Diuron-inhibierte komplexe biologische

Systeme getestet. Die Untersuchungen wurden an isolierten Thylakoiden (*in vitro*) und intakten Algenzellen (*in vivo*) durchgeführt.

Die Versuche wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Martin Steup, Universität Potsdam, durchgeführt.

2.7.1 *In vitro* Tests an isolierten Thylakoiden

Prinzip der Messung

Alle Prozesse, die an isolierten Thylakoiden unter Belichtung ablaufen, bei denen ein zugesetzter Elektronenakzeptor bei Sauerstoffentwicklung reduziert wird, werden Hill-Reaktionen genannt. Als Elektronenakzeptor wurde der Redoxfarbstoff 2,6-Dichlorphenol-indophenol (DCPIP) eingesetzt. Die oxidierte Form von DCPIP ist intensiv blau; die reduzierte Form ist farblos und wird nur langsam durch Luftsauerstoff reoxidiert. Die Reduktion von DCPIP durch den photosynthetischen Elektronentransport lässt sich daher anhand der Abnahme der Absorption bei 578 nm leicht verfolgen.

Durch Zugabe von Diuron (3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-Dimethylharnstoff (DCMU)) wurde der photosynthetische Elektronentransport an der Thylakoidmembran inhibiert. Der Einfluss der Anti-Diuron-Antikörper auf den so inhibierten Elektronentransport wurde untersucht.

Puffer und Lösungen:

Aufschlusspuffer:

- 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 8,0
- 10 mM NaCl
- 5 mM MgCl_2
- 0,4 M Saccharose

Messpuffer:

- 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 7,0
- 10 mM NaCl

1,5 mM DCPIP-Lösung in Aqua bidest.

Diuron-Lösungen in Ethanol, verschiedene Konzentrationen

Antikörper-Lösungen in PBS, pH 7,3

Chloroplasten-Isolierung (Yocum, 1980)

Für die Chloroplasten-Isolierung aus Spinatblättern (*Spinacia oleracea* L. cv. *Matador*) wurde die Methode von Yocum modifiziert (Yocum, 1980). Die Spinatpflanzen wuchsen auf Erde unter kontrollierten Bedingungen (10 h Belichtung (Weisslicht), ca. $200 \mu\text{mol Quanten m}^{-2}\text{s}^{-1}$)

[17 °C], 14 h Dunkelheit [14 °C]). Von ca. 3 g gewaschenen Spinatblättern wurden die Mittelrippen entfernt. Die Blätter wurden in 1 cm breite Streifen geschnitten und mit 25 ml kaltem Aufschlusspuffer homogenisiert (Ultraturrax XX, 2 Mal 3 s, max. Geschwindigkeit). Der Gewebebrei wurde durch 4 Lagen Mull und 1 Lage Miracloth in einen eisgekühlten Plastikbecher gepresst. Das Filtrat wurde zentrifugiert (5 min, 2000 g, 4 °C). Das Pellet, welches die intakten Chloroplasten enthielt, wurde mit 2 ml Aufschlusspuffer versetzt und zu einer homogenen Suspension verrührt. Die Suspension wurde mit Aufschlusspuffer auf 10 ml aufgefüllt, mit Alufolie abgedunkelt und auf Eis aufbewahrt. Nach Bestimmung des Chlorophyllgehalts wurde diese Ausgangssuspension mit Aufschlusspuffer auf 50 – 60 µg Chlorophyll/ml eingestellt.

Die Chlorophyll-Bestimmung erfolgte nach Arnon (Arnon, 1949). Der Chlorophyll-Gehalt wurde nach der Formel berechnet:

$$c \text{ [µg Chlorophyll/ml]} = (E_{652 \text{ nm}}/34,5) \times 100 \times \text{Verdünnung},$$

wobei $E_{652 \text{ nm}}$ die Extinktion der methanolischen Chlorophylllösung, $34,5 \text{ cm}^2/\text{mg}$ der Extinktionskoeffizient von Chlorophyll a und Chlorophyll b bei 652 nm ist.

Messansatz für die Hill-Reaktion

Gemessen wurde am Spektrophotometer (Pharmacia Ultrospec III) bei 578 nm. Als Leerwert diente Messpuffer. Das Küvettenvolumen betrug 2 ml. Die Küvette enthielt 1510 µl Messpuffer, 200 µl Chloroplasten, 20 µl ethanolische Diuronlösung oder Ethanol, 200 µl Antikörperlösung oder PBS und 70 µl DCPIP (1,5 mM Stammlösung). Da der Messpuffer kein Osmotikum enthält, brechen die Chloroplasten auf, wodurch die Thylakoidmembranen für DCPIP zugänglich werden. Die Einweg-Plastikküvette wurde befüllt, mit einem Plastikspatel durchmischt und in konstantem Abstand vor die Lichtquelle gestellt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von DCPIP gestartet. Nach Zugabe von DCPIP wurde wieder gemischt und die erste Messung vorgenommen. Die weiteren Messungen erfolgten in Intervallen von 30 s.

Unterschiedlich konzentrierte Diuron-Stammlösungen in Ethanol wurden hergestellt. In der Küvette erfolgte eine 1:100 Verdünnung, so dass die Endkonzentration des Ethanols 1 % (v/v) betrug.

2.7.2 In vivo Tests an intakten Algen

Messung der O₂-Entwicklung während der Photosynthese

Die Photosynthese intakter Zellen wurde an der weitgehend zellwandfreien Mutante cw + 15 der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard gemessen. Mit Hilfe einer Sauerstoff-Elektrode (Clark-Elektrode) wurde die photosynthetische O₂-Entwicklung verfolgt.

Die Photosynthese (dadurch auch die O₂-Entwicklung) wurde durch Diuron gehemmt und der Einfluss der Anti-Diuron-Antikörper wurde untersucht.

Die Probenkammer der Clark-Elektrode wurde mit 1 ml Flüssigkeit gefüllt und im Wasserbad auf 30 °C temperiert. Die Eichung der Clark-Elektrode erfolgte mit O₂-gesättigtem und O₂-freiem Aqua bidest. Zuerst wurde das Signal von luftgesättigtem Wasser aufgezeichnet. Dann wurde der gelöste Sauerstoff durch Zugabe einer Spatelspitze Natriumdithionit entfernt und der Abfall des Signals registriert. Die Spannungsdifferenz entspricht der Sättigungskonzentration von O₂. Bei 30 °C beträgt sie 0,23 µmol/ml.

Vorbereitung der Algen

Die Algen wurden in modifiziertem Minimalmedium mit 0,2 % (w/v) Protease-Pepton No. 3 und 0,2 % (w/v) Hefeextrakt (Difco, Becton Dickinson, Sparks USA) bei einer 12 h Photoperiode (150 µmol Quanten m⁻²s⁻¹) kultiviert. Die Temperatur betrug in Licht- und Dunkelphase 30 °C. Die Zellsuspension wurde mit Luft mit 2 % (v/v) CO₂ begast. Ca. 40 ml Zellsuspension wurden für 10 min bei 800 g und 4 °C zentrifugiert. Die pelletierten Algenzellen wurden in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 aufgenommen und so verdünnt, dass die optische Dichte bei 800 nm zwischen 0,6 und 0,8 lag. Die Algen wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt und vor dem Einsatz gut resuspendiert.

Die Chlorophyll-Bestimmung erfolgte nach Böger (Böger. 1964). Die Berechnung des Chlorophyll-Gehalts erfolgte nach der Formel:

$$\text{Chl}_{a+b} \text{ (mg/ml)} = 0,0255 \times E_{650} + 0,004 \times E_{665},$$

wobei E₆₅₀ und E₆₆₅ für die Extinktion bei der entsprechenden Wellenlänge steht.

Puffer und Lösungen:

50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5

250 mM NaHCO₃-Lösung in Aqua bidest.

95 % (v/v) Methanol

Diuron-Stammlösungen in Ethanol

Antikörper-Lösungen in PBS, pH 7,3

Ansatz in der Probenkammer der Clark-Elektrode

Ein Probenansatz enthielt 800 µl Algensuspension, 20 µl 250 mM NaHCO₃-Lösung und 200 µl Diuron-Ansatz mit oder ohne Antikörper. Die Diuron-Stammlösungen wurden zur Inkubation der Antikörperlösung zugesetzt. Die Stammlösung wurde dabei 1:200 verdünnt, so dass der Ansatz 0,5 % Ethanol enthielt. Anstelle der ethanolischen Diuron-Lösung wurde

in der Kontrolle Ethanol eingesetzt. Die Ethanol-Endkonzentration in der Probenkammer betrug 0,1 % (v/v).

Die Probenkammer der zuvor geeichten Elektrode wurde befüllt. Die Algen wurden für ca. 10 min in der Dunkelheit adaptiert und dann mit Weißlicht ($100 \mu\text{mol Lichtquanten m}^{-2} \text{s}^{-1}$) beleuchtet. Mittels eines Schreibers wurden Änderungen im O_2 -Gehalt aufgezeichnet. Zur Bestimmung des Einflusses von Diuron auf die Atmung der Zellen wurde eine erneute Messung in der Dunkelheit durchgeführt. Zwischen den Messungen wurde die Probenkammer mit einer Pasteurpipette geleert und 3 Mal mit Aqua bidest. gespült.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Hapten-Protein-Konjugate

3.1.1 Kopplung von Haptenen mit freier Aminogruppe an Proteine

Um die optimalen Kopplungsbedingungen für die Haptene mit freier Aminogruppe zu bestimmen, wurden Konjugationen über EDC als 1-Schritt-Verfahren in 0,1 M MES-NaOH + 0,15 M NaCl, pH 4,7 und in Aqua bidest. durchgeführt. Für die Optimierung wurde das ÜZA Hei3 ausgewählt. Die MALDI-TOF-MS-Messungen ergaben nach Kopplung im neutralen Milieu (Aqua bidest.) 3 bis 4 Moleküle Hei3 pro Molekül BSA. Im Gegensatz dazu konnten bei Verwendung des MES-Puffers, pH 4,7 nur 2 Moleküle Hei3 pro Molekül BSA gebunden werden. Die Anwendung der 2-Schritt-Methode mit Voraktivierung des Trägerproteins in Aqua bidest. erbrachte eine leichte Verbesserung der Kopplungseffizienz – 5 Moleküle Hei3 pro Molekül BSA. Die Kopplungsmethode über Disuccinimidylsuberat (DSS) führte zu keiner Verbesserung der Kopplungsrate (2 Moleküle Hei3 pro Molekül BSA), erweiterte jedoch das Spektrum der zur Verfügung stehenden Kopplungsmethoden. Das ÜZA OC7, das ebenfalls über die aromatische Aminogruppe gekoppelt wurde, verhielt sich bei verschiedenen Kopplungsversuchen ähnlich wie Hei3. Im Durchschnitt konnten 3 Moleküle OC7 pro BSA-Molekül gekoppelt werden.

Wurde BSA als Trägerprotein durch Transferrin ersetzt, blieb die Kopplungsdichte von Hei3 und OC7 gleich – 3 bis 5 Moleküle Hapten pro Molekül Trägerprotein.

KLH-Hapten-Konjugate können aufgrund des hohen Molekulargewichts von KLH und der daraus resultierenden Streuungen generell nicht mit MALDI-TOF-MS quantifiziert werden. Wenn darüber hinaus mittels Bindungsassay auch keine qualitative Aussage zum Erfolg der Kopplung möglich war, wurde ein entsprechendes BSA-Hapten-Konjugat hergestellt und mit MALDI-TOF-MS untersucht. War das BSA-Konjugat mit einer ausreichenden Haptendichte versehen, wurden diese Bedingungen für die Kopplung an KLH übernommen und das hergestellte KLH-Konjugat zum Immunisieren benutzt.

In einigen Fällen wurden die Immunogene mit Hilfe einer Glutaraldehyd-Kopplung hergestellt. Aufgrund der hier auftretenden Quervernetzung und den daraus resultierenden Schwankungen im Molekulargewicht war eine Charakterisierung von Glutaraldehyd-Konjugaten mit MALDI-TOF-MS grundsätzlich nicht möglich. Diese Konjugate wurden für die ersten Immunisierungen bzw. Festphasen-Immunoassays nach in der Arbeitsgruppe vorhandenen Erfahrungen ohne direkte Untersuchung eingesetzt. Nach der Generierung spezifischer Anti-Hapten-Antikörper wurde der Erfolg dieser Kopplungen mit Hilfe von

Bindungsassays überprüft. Diese Bindungsassays lieferten zuverlässige, allerdings nur qualitative Aussagen bezüglich des Kopplungserfolges.

3.1.2 Kopplung von Haptenen mit freier Carboxylgruppe an Proteine

Die Bedingungen für die Kopplung von Haptenen mit freier Carboxylgruppe wurden mit dem Substrat POCc9 optimiert. Bei Verwendung der 2-Schritt-Methode mit vorangehender Aktivierung des Haptens wurden bis zu 9 Moleküle POCc9 pro Molekül BSA mit MALDI-TOF-MS nachgewiesen. Die Kopplungsrate des schwefelhaltigen ÜZA POCs14 mit derselben Methode betrug hingegen nur 2 Moleküle pro Molekül BSA.

Auf die gleiche Weise wurde das Hapten H1, das als Analogon für potenzielle Spaltprodukte fungiert, gekoppelt. H1 verfügt über zwei kopplungsfähige Gruppen (Amino- und Carboxylgruppe). Die Carboxylgruppe des Haptens wurde zuerst aktiviert, um eine möglichst eindeutige Kopplungsrichtung zu erhalten. Die MALDI-Daten wiesen eine Haptendichte von 9 Molekülen H1 pro Molekül BSA nach. Nach der Kopplung konnten mit Hilfe der DACA-Färbung freie primäre aromatische Aminogruppen im Konjugat nachgewiesen werden (siehe Kapitel 2.5.2.1).

3.1.3 Kopplung von Haptenen mit freier Chloracetylgruppe an Proteine

Die Konjugation von Haptenen wie dem potenziellen Spaltprodukt POCc10, dem Substrat POCc12 und weiteren chloracetylierten Verbindungen erfolgte in 0,1 M Carbonatpuffer bei pH 8,5 und pH 9,6. Beim höheren pH-Wert wurde eine bessere Konjugation erzielt – im Durchschnitt mehr als 11 Moleküle POCc10 bzw. POCc12 pro Molekül BSA. Beim niedrigeren pH-Wert wurden im Durchschnitt 8 Moleküle Hapten pro Molekül BSA gekoppelt. Der Bindungsassay unter Verwendung des Anti-Substrat Antikörpers B76-BF5 bestätigte die bessere Effizienz der Kopplung bei pH 9,6.

3.2 Gewinnung, Charakterisierung und Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen Substrate

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen monoklonalen Antikörper gegen Substrate sind in der nachfolgenden Tabelle 3.1 aufgelistet.

Tabelle 3.1: Monoklonale Antikörper gegen Substrate

Gruppierung	Hapten	Anzahl Antikörper / Anzahl Fusionen	Verwendung
Anti-Substrat-Antikörper	OC2	11 / 2	Aufbau von Testsystemen
	POCc9	2 / 1	Aufbau von Testsystemen Nachweis von Diuron Wirkung in biol. Systemen

3.2.1 Antikörper gegen OC2

Gewinnung

Zu Beginn dieser Arbeit lagen bereits mehrere Anti-Substrat-Antikörper vor, die von Gudrun Scharte und Manuela Heiner (geb. Rohde) aus unserer Arbeitsgruppe hergestellt wurden. Diese Antikörper, darunter auch der Antikörper B76-BF5 waren spezifisch für den Benzylphenylharnstoff OC2.

Charakterisierung

B76-BF5 und 4 weitere Antikörper binden sowohl das Protein-konjugierte Hapten, als auch das freie Hapten OC2. Die am BIACORE[®] ermittelte Gleichgewichtsdissoziationskonstante für B76-BF5 und OC2 in Lösung betrug 1,1 nM (Rohde et al., 1998). Eine Kreuzreaktivität mit dem Benzylphenylharnstoff OC1, dem Benzylphenylcarbamat POCc12 und anderen käuflich erworbenen Substanzen wie Phenyl-N-(4-Chlorphenyl)-Harnstoff und 4-Chlorphenylharnstoff für B76-BF5 wurde nachgewiesen. Ein weiterer Antikörper, B76-BB3, reagiert ausschließlich mit dem Benzylphenylharnstoff OC2. Nachdem unterschiedlich substituierte Benzylphenylcarbamate wie POCc19 und POCc20 - POCc26 verfügbar waren, konnten die vorliegenden Antikörper im Kompetitionsassay mit immobilisiertem BSA-POCc12 (10 µg/ml) auf Kreuzreaktivität untersucht werden. Es wurde festgestellt, dass der Austausch des Cl-Atoms (Substrat POCc12) gegen ein Br-Atom (Substrat POCc24) die Bindungsaffinität von B76-BF5 nicht beeinflusst. Außerdem bindet dieser Antikörper POCc20 bis POCc26. Die Ergebnisse des Kompetitionsassays wurden mit den von Dr. Walter Stöcklein, Universität Potsdam, am BIACORE[®] durchgeführten Messungen verglichen. Übereinstimmend wurde folgende Reihenfolge der Kreuzreaktivität gefunden:
OC1 >> POCc12 = POCc24 > Phenyl-N-(4-Chlorphenyl)-Harnstoff > POCc19 > 4-Chlorphenylharnstoff

Verwendung (Siehe Kapitel 3.5.1)

3.2.2 Antikörper gegen Diuron

Gewinnung

Die Fusion zur Herstellung von Anti-Diuron-Antikörpern wurde in Zusammenarbeit mit Gudrun Scharte aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. C57Bl/6-Inzuchtmäuse wurden mit KLH-POCc9 nach dem klassischen Immunisierungsschema immunisiert. 40×10^6 Milzzellen wurden mit $13,3 \times 10^6$ X63-Ag8.653-Zellen mit Polyethylenglykol (PEG) 1550 fusioniert. Nach dem ersten Screening wurden 74 BSA-POCc9-bindenden Antikörper nachgewiesen. Ein Kompetitionsassay mit dem Herbizid Diuron (20 $\mu\text{g/ml}$) ergab, dass 26 dieser Antikörper mindestens zu 50 % gehemmt werden. Die Klone wurden erweitert, verloren größtenteils jedoch schnell ihre Aktivität. Nach mehrmaligen Reklonierungen konnten 2 dieser Klone – B91-KF5 und B91-CG5 gesichert und etabliert werden.

Charakterisierung

Mittels eines Klassen- und Subklassen-spezifischen Bindungsassays wurde festgestellt, dass die beiden gewonnenen Anti-Diuron-Antikörper (B91-KF5 und B91-CG5) der Subklasse IgG1 angehören. Bei der Reinigung an Protein A zeigte sich, dass eine Elution bei pH 3,5 zur Inaktivierung beider Antikörper führt. Eine Erhöhung des pH-Wertes des Elutionspuffers auf 4,5 führte zu einer 50 %igen Erhöhung der Ausbeute an intakten Antikörpern.

Der indirekte Kompetitionsassay (siehe Abb. 2.4.2) zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes und der unteren Nachweisgrenze für Diuron wurde mit 10 $\mu\text{g/ml}$ adsorbiertem BSA-POCc9 oder BSA-POCc6 durchgeführt. Die Antikörper (1,3 nM) wurden 30 min mit verschiedenen Diuron-Konzentrationen (Verdünnungsreihe von 8 pM bis 2 mM) vorinkubiert und zur Verfolgung der Bindung auf die bereits mit BSA-Konjugaten modifizierten und abgeblockten Mikrotiterplatten aufgetragen. Die errechneten Werte sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2: IC_{50} und untere Nachweisgrenze für Diuron

Antikörper	IC_{50} für Diuron (nM)		untere Nachweisgrenze für Diuron (nM)	
	BSA-POCc9	BSA-POCc6	BSA-POCc9	BSA-POCc6
B91- KF5	2,1	1,1	0,31	0,31
B91- CG5	0,8	1,1	0,15	0,23

Die höchste Sensitivität wurde in einem Testsystem erreicht, bei dem BSA-POCc9 an der festen Phase immobilisiert war und B91-CG5 als Nachweisantikörper verwendet wurde. Die Bindung des Antikörpers B91-KF5 war besser, wenn BSA-POCc6 statt BSA-POCc9 an der

festen Phase immobilisiert wurde. Diese Untersuchungen erlaubten die Entwicklung eines sensitiven Labortests zum Nachweis von Diuron sowie eines Testsystems zum Nachweis der Katalyse.

Dr. Axel Warsinke, Universität Potsdam, entwickelte einen direkten Kompetitionsassay mit immobilisiertem Anti-Diuron-Antikörper und POD-markiertem POCc6 (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Nachweisgrenze für Diuron konnte jedoch nicht gesenkt werden.

Die Nachweisgrenze liess sich allerdings durch Vorinkubation der Antikörper mit Diuron für 30 bis 60 min sowohl im direkten als auch im indirekten Kompetitionsassay bedeutend verbessern.

Zur Bestimmung der Antikörper-Spezifität wurden Kompetitionsassays mit verschiedenen Diuronderivaten durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3 dargestellt. Für die Strukturformeln von Diuron und Diuronderivaten siehe Tabellen 2.2 und 2.3. Die Kreuzreaktivitäten wurden wie im Kapitel 2.4.2 beschrieben berechnet.

Tabelle 3.3: Kreuzreaktivitäten der Anti-Diuron-Antikörper mit verschiedenen Herbiziden, ermittelt im Kompetitionsassay

Herbizide	Kreuzreaktivität in %			
	Antikörper B91-KF5		Antikörper B91-CG5	
	BSA-POCc9*	BSA-POCc6*	BSA-POCc9*	BSA-POCc6*
Diuron	100	100	100	100
Linuron	100	100	0,2	0,2
Chlorbromuron	100	100	0,2	0,2
Chlortoluron	6,2	5,1	12,3	25,0
Metoxuron	1,7	2,6	0,2	0,2
Monolinuron	0,2	0,3	0,0	0,0
Monuron	0,2	0,2	3,1	6,2
Metobromuron	0,2	0,3	0,0	0,0
Propyzamid	25	0,0	0,0	0,0

* - adsorbiert an der festen Phase

Wenn BSA-POCc9 an der festen Phase adsorbiert wurde, lag die Kreuzreaktivität von B91-KF5 mit Chlorbromuron und Linuron bei 100 %, mit Propyzamid bei 25 %, mit Chlortoluron bei 6,2 % und mit Metoxuron bei 1,7 %. Die Kreuzreaktivität mit Monolinuron,

Monuron und Metobromuron lag unter 1% (je 0,2%). Die Kreuzreaktivität des Antikörpers B91-CG5 mit Chlortoluron betrug 12,3 % und mit Monuron 3,1 %. Die errechnete Kreuzreaktivität mit Chlorbromuron, Linuron und Metoxuron betrug jeweils 0,2 %.

Bei keinem der Antikörpern wurde eine Kreuzreaktivität mit dem Harnstoff-Herbizid Fenuron (nicht Halogen-substituiert) und mit den Carbamat-Herbiziden Propham und Chlorpropham gefunden.

Weiterhin wurde festgestellt, dass keiner der Antikörper eine Kreuzreaktivität mit den Herbizidmetaboliten 3,4-Dichloranilin; 3-Chlor-4-Methylanilin; 3-Chlor-4-Methoxyanilin; 2-(4-Aminophenyl)-Ethylamin; 2-(Aminomethyl)-3,4-Dichloranilin; 3-Chloroanilin; 4-Chloracetanilid und pCA aufweist (Ergebnisse nicht dargestellt). Ebenfalls keine Kreuzreaktivität wurde mit einer Palette von Harnstoff-Herbiziden mit einem Phenylring wie Isoproturon, Karbutylat, Dimefuron, Methabenzthiazuron, Buturon und Chloroxuron festgestellt. Weitere Arylharnstoffe und Arylcarbamate wie 1-(4-Chlorphenyl)-3-Phenylharnstoff, OC1, OC2, Phenylene-N-(4-Chlorphenyl)-Carbamat, 4-Chlorphenylencarbanilat, POCc12 und POCc19 wurden ebenfalls nicht gebunden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Wenn BSA-POCc6 an der festen Phase adsorbiert wurde, so stieg die Kreuzreaktivität des Antikörpers B91-KF5 zu Metoxuron, Metobromuron und Monolinuron um 35 %. Dagegen fiel die Kreuzreaktivität bezüglich Propyzamid und Chlortoluron um 18 %. Die Kreuzreaktivität des Antikörpers B91-CG5 zu Monuron und Chlortoluron stieg um 50% auf Werte von 6,2 % und 25 % entsprechend. Konstant blieb hingegen die Kreuzreaktivität von 0,2 % bezüglich Chlorbromuron, Metoxuron und Linuron.

B91-CG5 (1,6 nM) bindet an das BSA-konjugierte Fenuronderivat POCc5 (10 µg/ml; adsorbiert an der festen Phase). B91-KF5 bindet unter diesen Bedingungen nicht. Ein Kompetitionsassay mit dem immobilisierten Fenuronderivat konnte nicht aufgebaut werden.

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (K_D) für B91-CG5 und B91-KF5, gemessen am BIACORE[®], betragen $2,2 \times 10^{-11}$ mol/l und $2,3 \times 10^{-11}$ mol/l.

Verwendung der Antikörper in *in vitro*-Tests mit isolierten Thylakoiden

An aus Spinatblättern isolierten Thylakoiden wurde der Einfluss der Anti-Diuron-Antikörper auf den durch Diuron gehemmten Elektronentransport der Photosynthese untersucht. Als Indikator wurde der blaue Farbstoff DCPIP eingesetzt.

Wurde der Elektronentransport durch Zugabe von Diuron unterbrochen, so blieb DCPIP blau. Bei störungsfreier Photosynthese wurden Elektronen auf DCPIP übertragen. DCPIP verlor

dabei seine blaue Färbung. Dies wurde anhand der Absorptionsabnahme bei 578 nm registriert.

Die Experimente wurden sowohl mit dem Antikörper B91-CG5 als auch mit dem Antikörper B91-KF5 durchgeführt. Beide Antikörper unterschieden sich in ihrem Effekt auf den Elektronentransport kaum. Nachfolgend werden darum nur die mit B91-KF5 durchgeführten Experimente genauer beschrieben.

Zunächst wurde der Einfluss verschiedener Diuronkonzentrationen auf den Elektronentransport untersucht. Aus Abb. 3.1 ist ersichtlich, dass schon 0,5 μM Diuron zur fast vollständigen Inhibierung des Elektronentransports und damit der DCPIP-Reduktion führen.

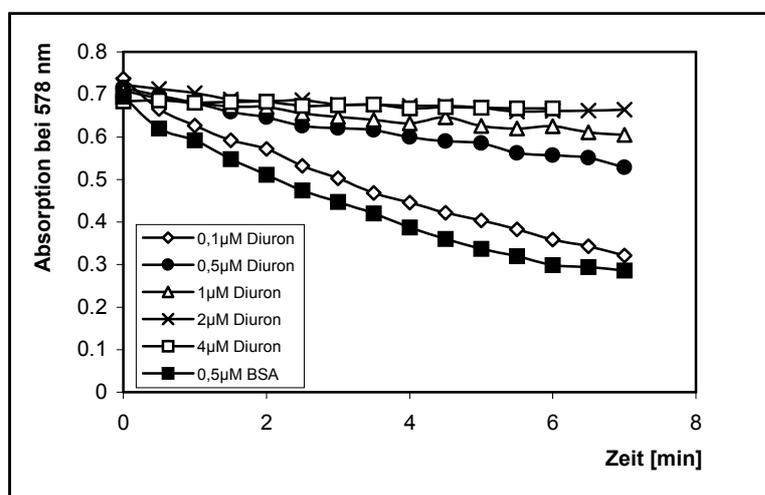


Abb. 3.1: Einfluss verschiedener Diuron-Konzentrationen auf die DCPIP-Reduktion in isolierten Thylakoiden

Wurde Diuron mit dem Antikörper B91-KF5 vorinkubiert, so erfolgte in der Hill-Reaktion keine Hemmung des Elektronentransports (0,5 μM Diuron und 0,5 μM B91-KF5, Abb. 3.2). Wurde der Anti-Diuron-Antikörpers durch ein anderes Protein (z.B. BSA) ersetzt, konnte Diuron, wie erwartet, seine hemmende Wirkung entfalten. Der Schutzeffekt ist daher auf den Anti-Diuron-Antikörper zurückzuführen.

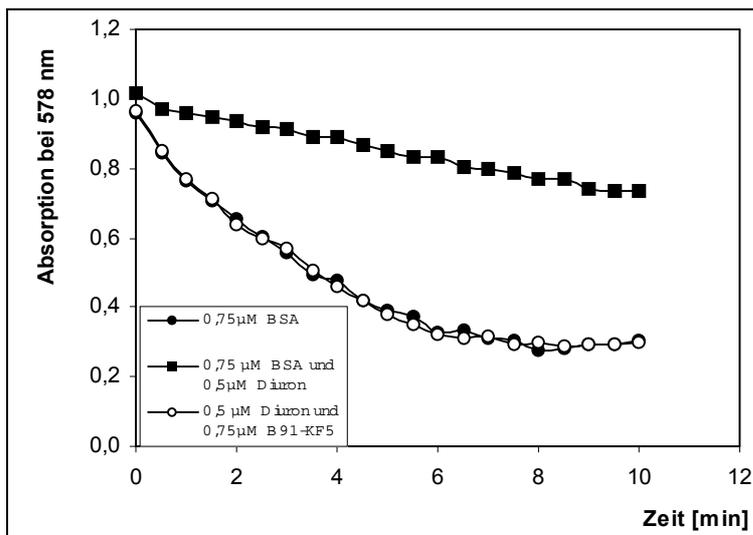


Abb. 3.2: Einfluss von Diuron auf den Elektronentransport in isolierten Thylakoiden nach Vorinkubation mit B91-KF5 und BSA

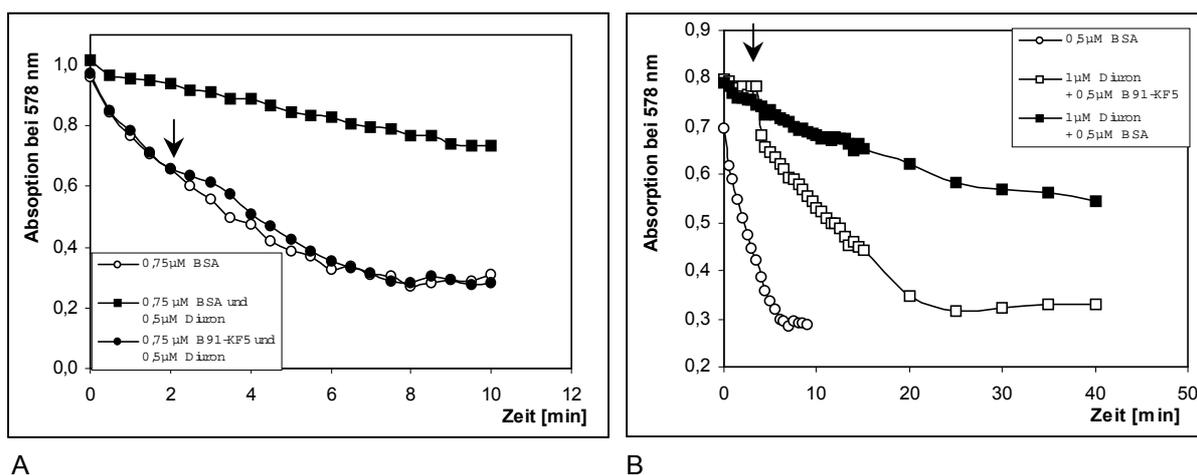


Abb. 3.3: Verlauf der Hill-Reaktion in Anwesenheit des Antikörpers B91-KF5 bei verzögerter Zugabe von Diuron (markiert durch einen Pfeil, A) und in Anwesenheit von Diuron bei verzögerter Zugabe des Antikörpers B91-KF5 (markiert durch einen Pfeil, B)

Die sehr schnelle Wirkung des Anti-Diuron-Antikörpers konnte in zwei weiteren Experimenten nachgewiesen werden. Im ersten enthielt der Ansatz für die Hill-Reaktion zunächst nur Antikörper (B91-KF5 respektive BSA, Endkonzentration $0,5 \mu\text{M}$). Zwei Minuten nach Beginn der Aufzeichnung wurde Diuron (Endkonzentration $0,5 \mu\text{M}$) zugesetzt (Abb. 3.3A). Der Einfluss von Diuron ist unter diesen Bedingungen sehr gering. In der zweiten Versuchsserie enthielt der Ansatz der Hill-Reaktion zunächst $1 \mu\text{M}$ Diuron aber keinen Antikörper (Abb. 3.3B). Innerhalb der ersten 3 min konnte nur eine schwache DCPIP-Reduktion gemessen werden. Unmittelbar nach Zugabe des Antikörpers (Endkonzentration $0,5 \mu\text{M}$) erfolgte eine deutliche Erhöhung der DCPIP-Reduktion. Nach ca. 20 min war der Elektronentransport vollständig reaktiviert. Dies zeigt, dass der Antikörper

erfolgreich mit dem D1-Protein um die Diuron-Bindung kompetitiert. Wenn statt des Antikörpers das Kontrollprotein BSA zugegen wurde, konnte keine Aufhebung der Inhibition des Elektronentransportes gemessen werden.

Im Kompetitionsassay wurde gezeigt, dass keiner der beiden Antikörper den physiologischen Liganden des D1-Proteins, Decyl-Plastochinon, bindet.

Verwendung der Antikörper in *in vivo*-Tests mit intakten Algen

Anschließend wurde untersucht, ob die Anti-Diuron-Antikörper auch intakte Zellen vor der Wirkung von Diuron schützen können.

Die Experimente wurden mit beiden monoklonalen Antikörpern durchgeführt, aufgrund der nahezu identischen Ergebnisse werden nachfolgend vor allem die Experimente mit B91-KF5 dargestellt.

Die Photosynthese der Zellwand-freien Mutante *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard cw 15 wurde durch submikromolare Diuron-Konzentrationen deutlich inhibiert (Tabelle 3.4). In Anwesenheit von 0,2 μM Diuron sank die photosynthetische O_2 -Produktion auf 53 % des Ausgangswertes (ohne Diuron); bei einer Diuronkonzentration von 2 μM war die Photosynthese komplett inhibiert. Die getesteten mikromolaren Diuron-Konzentrationen hatten keinen Effekt auf die Atmung der Zellen. Der gemessene geringe O_2 -Verbrauch (ca. 60 $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chlorophyll x h}$) vor und nach der Belichtung blieb nahezu unverändert.

Tabelle 3.4: Photosyntheseraten von *Chlamydomonas reinhardtii* (cw 15) unter Einfluss von Diuron mit und ohne Antikörper B91-KF5 oder B76-BF5.

	Reaktionsgemisch				
Diuron [μM]	0	0,2	0	0,2	0,2
Ab B91-KF5 [μM]	0	0	0	0	0,2*
Ab B76-BF5 [μM]	0	0	1*	1*	0
Photosyntheserate [$\mu\text{mol O}_2/\text{mg}$ Chlorophyll x h]	232	123	306	125	300

*- vorinkubiert

Zur Überprüfung des Schutzeffektes wurde der Anti-Diuron-Antikörper B91-KF5 (1 μM und 5 μM) mit 1 μM Diuron für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Aliquot von 200 μl wurde in die Probenkammer der Clark-Elektrode gegeben, um eine Endkonzentration von 0,2 μM Diuron zu erreichen. Unter diesen Bedingungen fand keine Photosyntheseinhibition statt (Tabelle 3.4). Die alleinige Zugabe des Antikörpers zur Algensuspension ohne Diuron hatte keine Auswirkung auf die Photosynthese.

Als Kontrolle diente der monoklonale Antikörper B76-BF5 (siehe auch Kapitel 3.2.1). Es wurde vorab ermittelt, dass der Anti-OC2-Antikörper B76-BF5 keine Kreuzreaktivität mit Diuron oder Diuronderivaten zeigt und ebenfalls der Subklasse IgG1 angehört. Er wurde analog zu B91-KF5 in einer Konzentration von 5 μM mit Diuron vorinkubiert und der Algensuspension zugefügt. Dieser Antikörper hatte keinen spezifischen Einfluss auf die Photosynthese. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

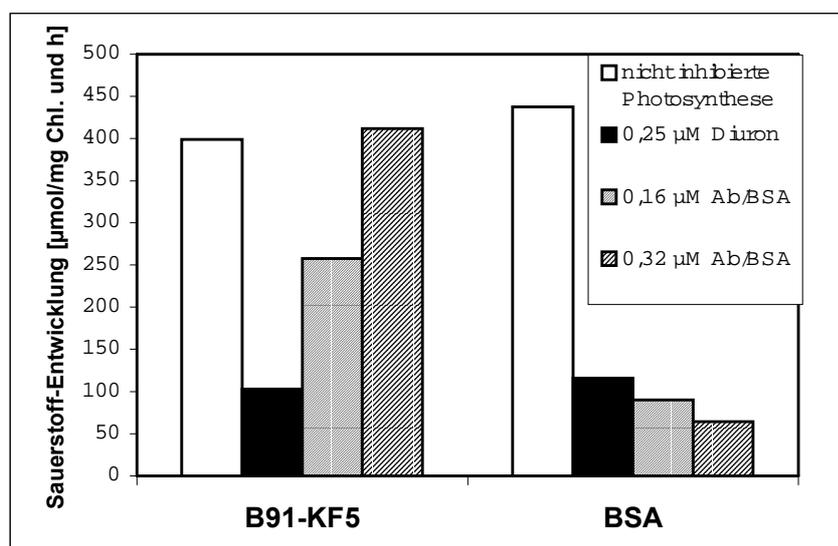


Abb. 3.4: Reaktivierung der durch Diuron inhibierten Photosynthese von *Chlamydomonas reinhardtii* cw 15 mit Hilfe von Anti-Diuron-Antikörpern.

Die Photosynthese wurde zuerst mit 0,25 μM Diuron inhibiert. Sukzessive wurden 0,16 μM B91-KF5 oder BSA zugegeben und deren Einfluss mit der Clark-Elektrode online gemessen.

Danach wurde untersucht, ob die Zugabe von monoklonalen Antikörpern zur Wiederherstellung der Photosynthese in einem bereits durch Diuron inhibierten System führt. Die Photosyntheserate der Algen wurde in Abwesenheit von Diuron über einen Zeitraum von 5 min gemessen. Die Zugabe von 0,25 μM Diuron führte zu einer Inhibition der Photosynthese auf 25 %. Nach weiteren 5 min wurde B91-KF5 (Endkonzentration 0,16 μM) direkt in die Probenkammer der Clark-Elektrode injiziert. Dies führte zur Erhöhung der Photosyntheserate auf 60 % des Ausgangswertes. Eine Verdoppelung der

Antikörperkonzentration auf 0,32 μM nach weiteren 5 min führte zur vollständigen Reaktivierung der Photosynthese (Abb. 3.4). Eine Reaktivierung der Photosynthese wurde nicht erzielt, wenn BSA anstatt B91-KF5 zugegeben wurde.

Auch andere Harnstoff-Herbizide hemmen die photosynthetische O_2 -Entwicklung. Es wurde daher untersucht, ob die Anti-Diuron-Antikörper auch die Hemmung der Photosynthese durch Monolinuron oder Methabenzthiazuron aufheben können. Ein Gemisch aus Antikörper B91-KF5 und Monolinuron oder Methabenzthiazuron wurde vorinkubiert und in der Probenkammer der Clark-Elektrode vermessen. Der Antikörper B91-KF5 inaktivierte Monolinuron, nicht aber Methabenzthiazuron (Tabelle 3.5). Diese Ergebnisse korrespondieren mit der ermittelten Kreuzreaktivität. Wie bereits beschrieben, reagiert der Antikörper B91-KF5 auch mit Monolinuron (Kreuzreaktivität 0,2 %). Hingegen war mit Methabenzthiazuron keine Kreuzreaktivität messbar. Aufgrund der hohen Spezifität für Diuron ist der Antikörper B91-CG5 nicht in der Lage, die Photosynthese-Hemmung durch diese Herbizide aufzuheben. Eine geringe Kreuzreaktivität ist für die Reaktivierung der Photosynthese *in vivo* offensichtlich schon ausreichend.

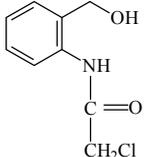
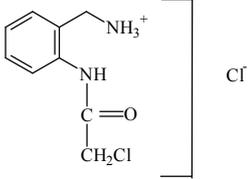
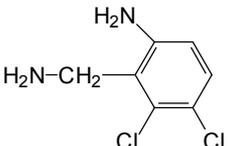
Tabelle 3.5: Einfluss des Anti-Diuron Antikörpers B91-KF5 auf die Inhibition der Photosynthese von *Chlamydomonas reinhardtii* cw 15 durch Monolinuron und Methabenzthiazuron

Protein [μM]	Herbizide [μM]					
	Methabenzthiazuron			Monolinuron		
	0	2		0	1,6	
Antikörper B91-KF5	0	0	0,5	0	0	0,5
BSA	0,5	0,5	0	0,5	0,5	0
Photosynthese [$\mu\text{mol O}_2 / \text{mg}$ Chlorophyll x h]	266	77	54	266	153	250

3.3 Gewinnung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen potenzielle Produkte der hydrolytischen Reaktion

Zum Aufbau von immunologischen Nachweisverfahren für eine Katalyse wurde versucht, verschiedene monoklonale Antikörper gegen folgende potenzielle Produkte herzustellen (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Potenzielle Spaltprodukte der Hydrolyse von verschiedenen Substraten

potenzielles Spaltprodukt	Formel	Substrat
POCc10		POCc12, POCC20-POCc26
POCc17		OC2 und POCC19
H1		OC1, OC2, POCC12, POCC20-POCc26, Monuron, andere kommerzielle Herbizide und Arylcarbamate
H6		OC1, OC2, POCC12, POCC20-POCc25, Diuron, andere kommerzielle Herbizide und Arylcarbamate

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen monoklonalen Antikörper gegen potenzielle Produkte sind in der nachfolgenden Tabelle 3.7 aufgelistet.

Tabelle 3.7: Monoklonale Antikörper gegen potenzielle Produkte

Gruppierung	Hapten	Anzahl spezifischer Antikörper / Anzahl Fusionen	Verwendung
Anti-Produkt-Antikörper	POCc10	11 / 6	Aufbau von Testsystemen
	POCc17	0 / 1	
	H1	0 / 2	
	H6	26 / 1	

3.3.1 Antikörper gegen POCC10

Gewinnung

Ein monoklonaler Antikörper gegen POCC10, generiert von Manuela Heiner aus unserer Arbeitsgruppe, reagierte nur mit dem gekoppelten Hapten. Dies machte die Generierung neuer Anti-POCC10-Antikörper erforderlich.

Vier Elektrofusionen führten nicht zum gewünschten Antikörper. Um die Erfolgchance zu steigern, wurde das Immunisierungsschema geändert. Es wurde mit einer Emulsion aus KLH-Konjugat und IFA ca. 3 Wochen nach der Erstimmunisierung nachimmunisiert. Die letzte Nachimmunisierung wurde wie gewöhnlich nur mit KLH-Hapten-Konjugat (ohne Adjuvants) durchgeführt.

Das erste Fusionscreening ergab 135 Klone, die BSA-POCc10 banden. Da POCc10 über die Chloracetylgruppe an Proteine gekoppelt werden muss und nur eine einzige Kopplungsmethode zur Verfügung stand, wurde mit den positiv getesteten Kulturüberständen ein Kompetitionsassay durchgeführt, um die Spezifität zu verifizieren. 28 Antikörper reagierten mit POCc10 in Lösung. 10 Hybridomklone konnten nach zweifacher Reklonierung etabliert werden.

Charakterisierung

Diese Antikörper wurden im Kompetitionsassay auf Kreuzreaktivität mit anderen potenziellen Spaltprodukten und verschiedenen Substraten getestet.

Neben den wichtigsten Substraten OC2, POCc12 und POCc19 wurde eine Palette von möglichen Spaltprodukten untersucht. Die wichtigsten Ergebnisse sind in Tabelle 3.8 zusammengefasst:

Tabelle 3.8: Kreuzreaktivität der Anti-POCc10-Antikörper

Antikörper	Substrate			potenzielle Spaltprodukte			
	OC2	POCc12	POCc19	POCc11	POCc17	<i>p</i> -Aminophenol	<i>p</i> -Chloranilin
N19-DH12	-	-	-	-	+	-	-
N19-EB3	-	-	-	-	-	-	-
N19-FE7	-	-	-	-	-	-	-
N19-FE12	-	-	-	-	-	-	-
N19-GE12	-	-	-	-	-	-	-
N19-GF7	+	++	n.b.	++	-	-	n.b.
N19-GH3	-	-	-	-	-	-	-
N19-ID2	+++	+++	+++	+++	-	+	+
N19-IH1	+/-	+	-	+	-	-	+/-
N19-KB2	-	+	-	-	-	-	-

n.b. – nicht bestimmt

In der Tabelle nicht dargestellt sind die Ergebnisse mit *o*-Aminobenzylalkohol, *m*-Aminobenzylalkohol, *o*-Aminobenzylamin, *m*-Aminophenol, *p*-Chlorphenol und 3,4-Dichloranilin. Keiner der getesteten Antikörper band diese potenziellen Spaltprodukte.

Die Antikörper N19-GF7, N19-ID2, N19-IH1 und N19-KB2 reagierten mit dem Substrat POCc12, die ersten beiden auch mit dem Substrat OC2.

3.3.2 Antikörper gegen POCc17

Es wurde eine Elektrofusion ($1,8 \times 10^8$ Milzzellen und 4×10^7 Sp2/0-Zellen) zur Gewinnung von Antikörpern gegen POCc17 durchgeführt. Diese Fusion führte nicht zur Etablierung monoklonaler Antikörper.

3.3.3 Antikörper gegen H1

Von besonderem Interesse war das Hapten H1 (Tab. 3.6), das als Analogon für alle potenziellen Spaltprodukte mit primärer aromatischer Aminogruppe (Anilin und substituierte Aniline) angesehen werden kann. Solche potenziellen Spaltprodukte entstehen nach der Hydrolyse von OC1, OC2, POCc12, POCc20 - POCc26 sowie einer Reihe käuflich erworbener Phenylcarbamate und Phenylharnstoffe.

Die zum Immunisieren verwendeten KLH-H1-Konjugate wurden mit Hilfe der DACA-Methode getestet. Die intensive rote Färbung deutete auf eine erfolgreiche Kopplung über die Carboxylgruppe hin. Zwei Fusionen ergaben keine monoklonalen Antikörper. Einige wenige Antikörper banden ursprünglich BSA-H1, die Klone verloren aber schnell ihre Aktivität.

Aufgrund der großen Bedeutung des Haptens H1 als Produktanalogon wurde versucht, aus Antikörperbibliotheken rekombinante Anti-H1-Antikörper zu gewinnen. Mit Hilfe der humanen halbsynthetischen Bibliothek der Morphosys AG (Martinsried) hat Dr. Karl Kramer (TU München) versucht, Binder gegen die potenziellen Produkte H1 und H2 zu selektieren. Diese Versuche blieben jedoch ohne Erfolg.

H1 ist der Aminosäure Tyrosin sehr ähnlich. Dies könnte die Ursache dafür sein, dass die Versuche, Antikörper zu erhalten, missglückten.

3.3.4 Antikörper gegen H6

Gewinnung

Das Hapten H6 ist dem Tyrosin weit weniger ähnlich als H1; es wurde durch Bisubstitution mit Chlor für den Mausorganismus „verfremdet“ (Tab. 3.6).

Mit dem KLH-Konjugat dieses Haptens (Kopplung über DSS) wurde unter Anwendung des Kurzzeit-Immunisierungsschemas eine heftige Immunantwort ausgelöst. Die Fusion wurde in Zusammenarbeit mit Manuela Heiner durchgeführt. Nach dem ersten Screening wurden 187

positive Klone nachgewiesen. Getestet wurde im Bindungsassay mit adsorbiertem über EDC/NHS gekoppeltem BSA-H6-Konjugat. So wurde ausgeschlossen, dass Antikörper selektiert wurden, die den DSS-Linker erkennen. In einem Wettbewerbsassay mit gelöstem H6 wurde dann untersucht, welche von den 96 ausgewählten Antikörpern H6 spezifisch binden. H6 führte in einer Konzentration von 10 µg/ml zur völligen Inhibition bei 60 der getesteten Antikörper. Die Klone mit dem stabilsten und schnellsten Wachstum (26) wurden ausgewählt, rekloniert und etabliert.

Charakterisierung

Die monoklonalen Antikörper gegen H6 wurden auf Kreuzreaktivität mit potenziellen Spaltprodukten und verschiedenen Substraten getestet. Es stellte sich heraus, dass die Dichloranilin-Funktion von H6 sehr gut von allen Antikörpern erkannt wird. Eine Kreuzreaktivität mit 3,4-Dichloranilin konnte bei allen Antikörpern festgestellt werden. Mit einfach chloresubstituierten Substanzen wie pCA oder pCP reagierten die Antikörper kaum. Diuron mit seiner Dichloresubstitution wurde ebenfalls von den Antikörpern erkannt.

3.4 Gewinnung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen ÜZA

Einige der monoklonalen Antikörper, die gegen Übergangszustandsanaloga generiert wurden, sollten hydrolytisch aktiv sein. Die Substanzen Hei3, OC4, OC7 und POCs14 wurden als mögliche ÜZA für die Hydrolyse von Arylcarbamaten und Arylharnstoffen ausgewählt und für Immunisierungen benutzt. Die gewonnenen monoklonalen Antikörper sind in der Tabelle 3.9 dargestellt.

Tabelle 3.9: Monoklonale Antikörper gegen Übergangszustandsanaloga

Hapten	Anzahl spezifischer Antikörper / Anzahl Fusionen
Hei3	11 / 4
OC4	6 / 1
OC7	15 / 1
POCs14	0 / 3

Die Tab. 3.10 fasst alle generierten potenziell hydrolytisch aktiven Antikörper zusammen. Darin enthalten sind die Anti-ÜZA-Antikörper gegen Hei3 (Antikörper mit der Fusionsnummer N1 und R3), gegen OC4 (Antikörper mit der Fusionsnummer N2) und gegen OC7 (Antikörper mit der Fusionsnummer N21).

Alle spezifischen Anti-ÜZA-Klone bzw. Antikörper wurden rekloniert, kultiviert, bezüglich ihrer Klasse und Subklasse charakterisiert, gereinigt, konzentriert und in den Katalysetests eingesetzt.

Tabelle 3.10: Antikörper gegen ÜZA, deren katalytische Aktivität untersucht wurde

Nr.	Antikörper	Isotyp	Nr.	Antikörper	Isotyp
1	N2-CB11-G3	IgG2b	17	R3-GA12-E11	IgG1
2	N2-BA3-G10	IgM	18	N21-AE4-F10	IgG1
3	N2-ED5-B8-E2	IgG1/IgM	19	N21-AE6-B3	IgG1
4	N2-BB9-D7	IgM	20	N21-AG10-B8	IgG1
5	N2-EE3-C11	IgM	21	N21-CF3-G10	IgG1
6	N2-EE2-F3	IgG2b	22	N21-EA6-G5	IgG2a
7	N1-BC1-D11-B9	IgG2a	23	N21-EB8-F3	IgG1
8	N1-FA7-D12-E3	IgG2a	24	N21-GE3-D1	IgG1
9	N1-FA7-C4-H7	IgG2b	25	N21-GE11-C10	IgG1
10	R3-BH4-G2-C10	IgG2b	26	N21-HE10-H4	IgG1
11	R3-EB1-F5-G5	IgG1	27	N21-HF5-D3	IgG2a
12	R3-EA5-C3-H3	IgG1	28	N21-HF10-D8	IgG1
13	R3-EA5-D2	IgG1	29	N21-IF2-C11	IgG2a
14	R3-FC6-E1-B10	IgM	30	N21-KD5-C4	IgG1
15	R3-LG2-F9	IgG1	31	N21-KD9-D9	IgG1
16	R3-EF8-C11	IgG1	32	N21-KH12-H4-B2	IgG1

Dr. Karl Krammer selektierte aus der Morphosys-Antikörperbibliothek einen rekombinanten Antikörper gegen Hei3. Dieser band jedoch Hei3 unspezifisch und ließ sich nicht von freiem Hei3 verdrängen. Weitere Versuche, rekombinante Anti-ÜZA-Antikörper aus der Antikörperbibliothek von Greg Winter zu gewinnen, wurden von Jörg Schenk aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Es wurden zahlreiche unspezifische Binder isoliert, keiner davon zeigte jedoch im Bindungsassay mit dem BSA-konjugiertem ÜZA ein brauchbares Signal.

3.4.1 Antikörper gegen Hei3

Gewinnung

Zur Beginn dieser Arbeit waren bereits 16 monoklonale Antikörper gegen das ÜZA Hei3 (MW 298; Abb. 3.5), hergestellt von Manuela Heiner aus unserer Arbeitsgruppe, vorhanden.

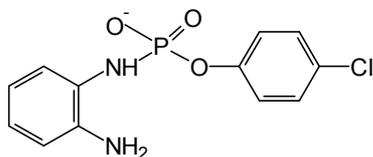


Abb. 3.5: Chemische Formel des ÜZA Hei3

Diese Klone wurden erneut charakterisiert. Einige von ihnen reagierten mit Glutaraldehyd (Immunisierung mit KLH-Hei3, gekoppelt über Glutaraldehyd). 8 monoklonale Antikörper reagierten spezifisch mit Hei3.

Eine weitere klassische Fusion (N1) mit 118×10^6 Milzzellen mit 60×10^6 X63-Ag8.653-Zellen, ergab zunächst 208 anscheinend positive Klone. Die weitere Charakterisierung zeigte, dass die überwiegende Anzahl dieser Antikörper (147) gegen Glutaraldehyd gerichtet war. Ein Teil der Antikörper (19) adsorbierte unspezifisch an Polystyrol, ein weiterer Teil (40 Klone) verlor seine Antikörperproduktivität. 3 spezifische Antikörper konnten etabliert werden. Weitere Fusionen führten nicht zur Gewinnung zusätzlicher neuer Anti-Hei3-Antikörper.

Charakterisierung

Die somit vorhandenen 11 spezifischen Anti-Hei3-Antikörper wurden im Bindungsassay auf Bindung der Konjugate anderer ÜZA (OC4, OC5 und OC7), verschiedener Substrate (OC1, OC2, POCc12 und POCc18) und potenzieller Spaltprodukte (POCc10 und H1) getestet. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.11 dargestellt.

Alle Anti-Hei3-Antikörper banden auch die ÜZA OC4 und OC5. Keine Bindung erfolgte hingegen an das ÜZA OC7.

Keiner der Anti-Hei3-Antikörper band die potenziellen Produkte POCc10 und H1.

Die meisten Antikörper erkannten die Substrate OC2 und POCc12. Eine Ausnahme bildeten der Antikörper R3-EA5-D2 und zum Teil auch der Antikörper R3-LG2-F9, welche keine Substrate erkannten. Keiner der Antikörper erkannte die Substrate OC1 und POCc18.

Die Antikörper B76-BF5 und B76-BB3 mit ihrer bekannten Spezifität dienten in diesem Bindungsassay als Kontrollen.

Tabelle 3.11: Bindungsspezifität der Anti-Hei3-Antikörper

Antikörper	Hei3	OC4	OC5	OC7	POCc10	H1	OC1	OC2	POCc12	POCc18
N1-BC1-D11-B9	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
N1-FA7-D12-E3	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
N1-FA7-C4-H7	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
R3-GA12-E11	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
R3-EF8-C11	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
R3-LG2-F9	+	+	+	-	-	-	-	+/-	+/-	-
R3-EA5-C3	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
R3-EA5-D2	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-
R3-EB1-F5	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
R3-BH4-E4	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-
R3-FC6-E1-B10	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
B76-BF5	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
B76-BB3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

3.4.2 Antikörper gegen OC4

Gewinnung

Zur Gewinnung von Anti-OC4-Antikörpern (MW 312; Abb. 3.6) wurden 40×10^6 Milzzellen und 37×10^6 X63-Ag8.653-Zellen mit PEG 1550 fusioniert.

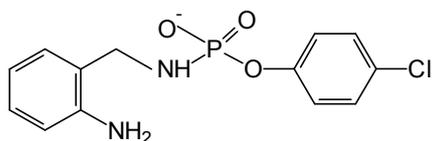


Abb. 3.6: Chemische Formel des ÜZA OC4

Von 128 im Bindungsassay mit immobilisiertem BSA-OC4 positiv getesteten Klonen konnten 6 etabliert werden. Keiner der etablierten 6 Antikörper erkannte Glutaraldehyd. Die restlichen Antikörper reagierten unspezifisch mit Glutaraldehyd, adsorbierten an Polystyrol oder verloren ihre Aktivität.

Charakterisierung

Die Spezifität der ausgewählten Antikörper wurde in einem Bindungstest mit Hapten-Konjugaten getestet. Die Ergebnisse dieses Bindungstests sind in Tab. 3.12 dargestellt.

Tabelle 3.12: Bindungsspezifität der Anti-OC4-Antikörper

Antikörper	Hei3	OC4	OC5	OC7	POCc10	H1	OC1	OC2	POCc12	POCc18
N2-CB11-G3	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
N2-ED5-B8-E2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
N2-EE2-F3	-	+	-	-	-	-	-	+/-	-	-
N2-BB9-D7	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
N2-EE3-C11	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
N2-BA3-G10	+	+	-	-	+/-	-	-	+	+	-

Im Unterschied zu den Anti-Hei3-Antikörpern erkannten nur 2 monoklonale Antikörper andere ÜZA. N2-CB11-G3 band als einziger an OC5; N2-BA3-G10 erkannte Hei3. Erneut band keiner der Antikörper das ungeladene ÜZA OC7 und die potenziellen Produkte POCc10 und H1.

Es erfolgte auch eine schwächere Erkennung der Substrate. Der monoklonale Antikörper N2-ED5-B8-E2 hatte bei diesen Testbedingungen die höchste Spezifität - er band nur OC4. Zwei weitere monoklonale Antikörper, N2-CB11-G3 und N2-EE2-F3, banden das Substrat OC2 aber nicht POCc12.

3.4.3 Antikörper gegen OC7

Das ÜZA OC7 (MW 275; Abb. 3.7) ist ein ungeladenes Hapten.

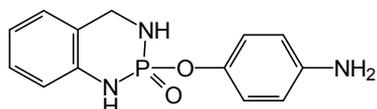


Abb. 3.7: Chemische Formel des ÜZA OC7

Gewinnung

OC7 wurde zum Immunisieren über DSS an KLH gekoppelt. Die Immunisierung erfolgte mit 400 µg Konjugat, emulgiert mit CFA. Die Nachimmunisierungen mit 100 µg Konjugat erfolgten 4, 6 und 9 Wochen später, die abschließende Boosterung (4 Tage vor der Fusion) nach 11 Wochen. Mittels Elektrofusion wurden 70×10^6 Milzzellen mit 23×10^6 Sp2/0-Zellen fusioniert. Das Screening erfolgte mit einem BSA-OC7-Konjugat, konjugiert über EDC (d.h. ohne Linker). So konnten alle Antikörper, die den DSS-Linker erkannt hätten, ausgeschlossen werden. 34 Antikörper banden im Bindungstest BSA-OC7. Ein Kompetitionstest mit 20 µg/ml OC7 ergab für 24 Antikörper eine vollständige Hemmung. 15 Klone konnten etabliert werden.

3.4.4 Antikörper gegen POCs14

POCs14 (MW 292; Abb. 3.8) ist ein ungeladenes potenzielles schwefelhaltiges ÜZA.

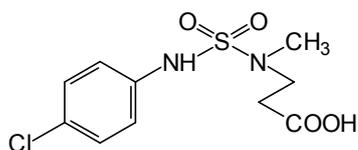


Abb. 3.8: Chemische Formel des ÜZA POCs14

Die Kopplung an Trägerproteine erfolgte an der Carboxylgruppe mit Hilfe der 2-Schritt-Methode über EDC/NHS. Zunächst wurde eine PEG 1550 – Fusion ($200,4 \times 10^6$ Milzzellen und 52×10^6 X63-Ag8.653-Zellen) und dann eine Elektrofusion (10×10^6 Milzzellen und 20×10^6 X63-Ag8.653-Zellen) durchgeführt. Bei beiden Fusionen wurden die Milzzellen einer immunisierten C57Bl/6-Maus verwendet. Aus beiden Fusionen konnten keine monoklonalen Antikörper gewonnen werden. Eine weitere Elektrofusion ($54,4 \times 10^6$ Milzzellen und 18×10^6 Sp2/0-Zellen) mit Milzzellen einer mit neu hergestellten Konjugaten immunisierten Balb/c-Maus brachte ebenfalls keinen monoklonalen Antikörper. Die Immunantwort war bei allen Fusionen kaum messbar.

3.5 Nachweis der hydrolytischen Aktivität der monoklonalen Antikörper gegen ÜZA

Zum Nachweis wurden sowohl immunologische, als auch photometrische und amperometrische Verfahren entwickelt und eingesetzt. Im Folgenden sind die Ergebnisse dargestellt.

3.5.1 Nachweis der Substratabnahme mit dem Anti-Substrat-Antikörper B76-BF5

Die mögliche Hydrolyse des Arylcarbamat POCc12 wurde in einem Kompetitionsassay mit dem Anti-Substrat-Antikörper B76-BF5 wie im Kapitel 2.5.1 beschrieben, überprüft. In keinem der durchgeführten Tests konnte eine Änderung des Signals gefunden werden.

Ein direkter katalytischer Bindungsassay mit immobilisiertem konjugiertem Substrat (BSA-POCc12, Kapitel 2.5.1) wurde ebenfalls durchgeführt. Wieder diente der Anti-Substrat-Antikörper B76-BF5 als Nachweisantikörper. Dieser Test ergab ebenfalls keine Signalunterschiede, die auf Antikörpereinfluss schließen lassen.

3.5.2 Nachweis der Entstehung potenzieller Spaltprodukte

3.5.2.1 Detektion von POCc10 mit Anti-Produkt-Antikörpern

Um die Eignung der generierten 6 Anti-POCc10-Antikörper zum Nachweis der Katalyse (Kapitel 3.3.1) zu ermitteln, wurden im Competitionstest die IC_{50} -Werte und die untere Nachweisgrenze bestimmt. Die optimale Antikörperkonzentration wurde in einem Vortest

bestimmt. POCc10 wurde in einer Verdünnungsreihe (1:2 verdünnt) beginnend mit 1 mg/ ml bis 0,95 ng/ml (5 mM – 4,8 nM) eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.13 dargestellt.

Tabelle 3.13: IC₅₀-Werte und untere Nachweisgrenze für Anti-POCc10-Antikörper

Antikörper	IC ₅₀ , μM	untere Nachweisgrenze, μM
N19-DH12	> 5 000	1250
N19-EB3	240	20
N19-FE7	2500	78
N19-FE12	160	20
N19-GE12	2500	235
N19-GH3	160	10

Den niedrigsten IC₅₀-Wert (160 μM) und die niedrigste untere Nachweisgrenze (10 μM) für POCc10 hatte der Antikörper N19-GH3. Mit den zwei Antikörpern N19-FE12 und N19-EB3 wurde eine untere Nachweisgrenze für POCc10 von 20 μM erreicht. Alle anderen Antikörper hatten noch höhere IC₅₀-Werte und untere Nachweisgrenzen, so dass eine Anwendung im gewünschten Konzentrationsbereich für POCc10 nicht angebracht erschien.

3.5.2.2 Detektion von Anilinen mit Dimethylaminozimtaldehyd

Die möglichen Spaltprodukte der Hydrolyse von Arylharnstoffen oder Arylcarbamaten aus der POCc12-Gruppe sind einerseits substituierte Aniline (speziell *p*-Chloranilin (pCA)) und andererseits Derivate des Benzylalkohols bzw. des Benzylamins. Zur Nachweis der substituierten Aniline wurde Dimethylaminozimtaldehyd (DACA) verwendet (Kapitel 2.5.2.1).

Die bei 538 nm gemessene Absorption war der pCA-Konzentration direkt proportional. Die erreichte untere Nachweisgrenze für pCA lag bei 10 μM. Das pH-Optimum der DACA-Reaktion lag zwischen 1,5 und 2,0.

Die Optimierung der DACA-Methode hatte vor allem eine geringe Verdünnung des Analyten im Ansatz zum Ziel. Eine Erhöhung der DACA-Konzentration von 0,2 % (w/v) auf 0,4 % (w/v) verbesserte die Nachweisgrenze um 20 %, mit gesättigter DACA-Lösung wurde die Nachweisgrenze nochmals um 20 % verbessert. Um das Ausfallen von DACA zu verhindern, wurde die gesättigte DACA-Lösung zuerst leicht erwärmt und dann bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Wahl des Lösungsmittels (Ethanol oder DMSO) für die DACA-Lösung beeinflusste die Testempfindlichkeit nicht. Die Verwendung von 4N H₂SO₄ anstelle des

Citrat-Puffers führte zur Ausfällung des im Analyten enthaltenen Proteins und zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen.

Hohe Substratkonzentrationen konnten aufgrund der geringen Löslichkeit nicht eingesetzt werden. Einige Substanzen fielen bereits bei einer Konzentration von 100 μM im DACA-Test aus, so dass eine zuverlässige Absorptionsmessung wegen der Trübung nicht möglich war. In diesen Fällen wurden die Ergebnisse visuell erfasst.

Durch die Messung der Spontanhydrolyse wurden die ungefähren Halbwertszeiten der Substrate ermittelt. Sie sind in der Tabelle 3.14 dargestellt. Die Substrate OC2, POCc12, POCc17, Diuron, Propham und Chlorpropham zeigten nach 2 Wochen keine messbare Spontanhydrolyse.

In Abhängigkeit von den ermittelten ungefähren Halbwertszeiten wurden die Inkubationszeiten für die Katalysetests gewählt. Bei keinem der untersuchten Substrate (Substanzen 3 und 6, OC2, POCc12 und POCc17) konnte ein Effekt gemessen werden, der sich auf eine durch Antikörper beschleunigte Hydrolyse zurückführen ließ. Die besonders stabilen Substrate OC2, POCc12 und POCc17 wurden dazu 2 Tage und 7 Tage mit den Anti-ÜZA-Antikörpern inkubiert.

Tab. 3.14: Ungefähre Halbwertszeiten der getesteten Substanzen

getestete Subst. [100 μM]	ungefähre Halbwertszeit, min	getestete Subst. [100 μM]	ungefähre Halbwertszeit, min
Substanz 2	40	Substanz 17	40
Substanz 3	3	Substanz 18	30
Substanz 4	40	Substanz 20	30
Substanz 5	20	Substanz 23	20
Substanz 6	40	Substanz 24	20
Substanz 16	40		

3.5.2.3 Detektion von Phenolen

3.5.2.3.1 Amperometrische Detektion von Phenolen

Die infolge der hydrolytischen Aktivität der monoklonalen Antikörper erwarteten Spaltprodukte sind einerseits Phenol (aus Substanz 27) und *p*-Chlorphenol (pCP; aus POCc18, POCc19 und Substanz 3) (siehe Tab. 2.1A und 2.1B) und andererseits unterschiedlich *ortho*-substituierte Benzylamine. Die amperometrische Methode wurde für alle Carbamate, bei denen durch die Hydrolyse phenolische Verbindungen entstehen könnten, etabliert; sie basiert auf einem Tyrosinase-Sensor (siehe Abb. 2.11).

Das pCP ergab bei einer Konzentration von 1 μM in der Messzelle ein messbares Signal (1 bis 3 nA). Die Empfindlichkeit des Sensors bezüglich Phenol war geringer – 0,3 – 1 nA/ μM . Die Ursache für diesen Unterschied sehen wir in der Substratspezifität der Tyrosinase oder in der unterschiedlichen Diffusion beider Substrate in die Enzymschicht.

Die Substrate POCc18, POCc19, Substanz 3 und Substanz 27 wurden nicht von der Tyrosinase umgesetzt und inhibierten sie auch nicht. Bei gleichzeitiger Zugabe von pCP beeinflussten sie das Messergebnis nicht. Eine Produktinhibierung der Tyrosinase durch POCc17, das andere mögliche Spaltprodukt der POCc19-Spaltung, konnte bei Zugabe zusammen mit pCP nicht festgestellt werden. Diese Versuche bestätigten, dass die gewählte Messmethode für diese Substrate geeignet ist.

Aufgrund der ungenügenden Löslichkeit der Substrate in Puffern wurde DMSO als Lösungsvermittler verwendet. Alle Inkubationsansätze enthielten deshalb 0,5 % (v/v) DMSO. Diese geringe DMSO-Konzentration beeinflusste die Enzymaktivität nur schwach. Die auf ca. 10 mg/ml aufkonzentrierten Antikörper wurden in PBS mit 0,01 % (w/v) NaN_3 bei 4°C aufbewahrt. NaN_3 ist ein Tyrosinase-Inhibitor (Dawson and Magee, 1955). Nach starker Verdünnung (ca. 100fach) war der Einfluss des NaN_3 auf das immobilisierte Enzym jedoch nicht mehr messbar. Die Sensitivität des Sensors wurde nach jeder 10ten Messung durch Kalibration mit einer pCP-Standardlösung überprüft.

Im sauren Bereich ($\text{pH} < 6.5$) waren die untersuchten Arylcarbamate so instabil, dass eine Messung bei diesem pH nicht möglich war. Die Spontanhydrolyse der Substrate in 100 mM Bicin-HCl + 100 mM NaCl, pH 8,5 war etwas höher als in PBS, pH 7,3, deshalb wurde der Bicin-Puffer für das bevorstehende Screening ausgewählt.

Unter diesen Bedingungen betrug die Halbwertszeit für POCc18 und POCc19 ungefähr 30 min, für Substanz 27 etwa 24 h und für Substanz 3 nur 2 min.

Beim Screening wurde immer die höchstmögliche Substratkonzentration (1 mM) eingesetzt. Der Inkubationsansatz wurde vor der Sensormessung 1:10 verdünnt.

Mit Hilfe des Tyrosinase-Sensors wurde dann getestet, welche der 32 Anti-ÜZA-Antikörper eines der Substrate hydrolysieren können. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt. Die Stromstärke ist bereits über eine pCP-Kalibrationsgerade in Konzentration pCP umgerechnet worden. Die Bezeichnungen der Antikörper sind Tabelle 3.10 zu entnehmen.

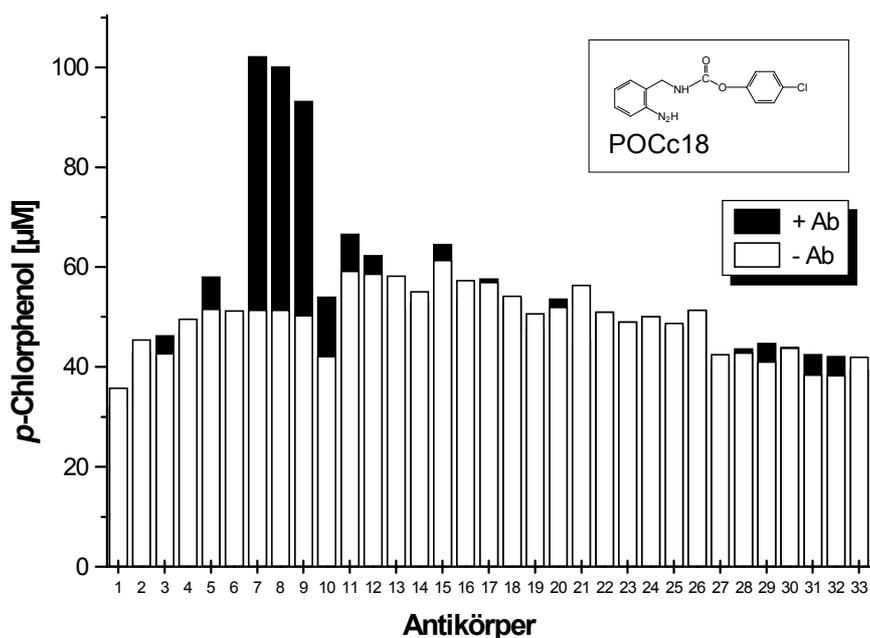


Abb. 3.9: Screening der Anti-ÜZA-Antikörper mit dem Substrat POCc18

Der Ansatz enthielt 6,7 µM Antikörper und 1 mM POCc18 in Bicin-Puffer, pH 8,5 und wurde vor der Messung am Tyrosinase-Sensor 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz ohne Antikörper (-Ab) entspricht der Spontanhydrolyse.

Drei Antikörper verursachten eine deutliche Beschleunigung der Hydrolyse von POCc18 – Ab 7 (N1-BC1-D11), Ab 8 (N1-FA7-D12) und Ab 9 (N1-FA7-C4).

Dieselben Antikörper (N1-BC1-D11, N1-FA7-D12 und N1-FA7-C4) verursachten eine Zunahme der Hydrolyse des Substrats POCc19 (Abb. 3.10).

Die Inkubation der potenziell katalytischen Antikörper mit zwei verschiedenen Konzentrationen der Substanz 27 ergab erneut ein höheres Hydrolyse-Signal bei den Antikörpern N1-BC1-D11, N1-FA7-D12 und N1-FA7-C4. Außerdem zeigte der Antikörper 15 (R3-LG2-F9) ein vergleichbar hohes Signal (Abb. 3.11A und 3.11B).

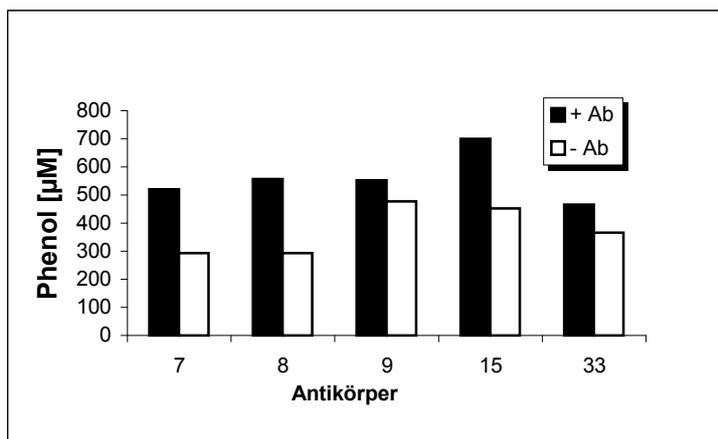


Abb. 3.11B: Screening der katalytischen Antikörper mit Substanz 27

Der Ansatz enthielt 6,7 µM Antikörper und 1 mM Substanz 27 in Bicin-Puffer, pH 8,5 und wurde vor der Messung am Tyrosinase-Sensor 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz ohne Antikörper (-Ab) entspricht der Spontanhydrolyse

Das Screening aller Anti-ÜZA-Antikörper mit verschiedenen Substraten zeigte, dass die Antikörper N1-BC1-D11, N1-FA7-D12 und N1-FA7-C4 und teilweise auch R3-LG2-F9 reproduzierbar eine Zunahme der Hydrolyse im Vergleich zur unkatalysierten Reaktion hervorrufen können. Das zusätzlich gebildete Produkt ist demnach auf die Vermittlung einer Hydrolyse durch diese Antikörper zurückzuführen.

Im Weiteren wurde auch untersucht, ob diese Antikörper die Hydrolyserate von Substanz 3 beeinflussen können (Abb.3.12). Keiner der Antikörper katalysierte jedoch die Spaltung von Substanz 3.

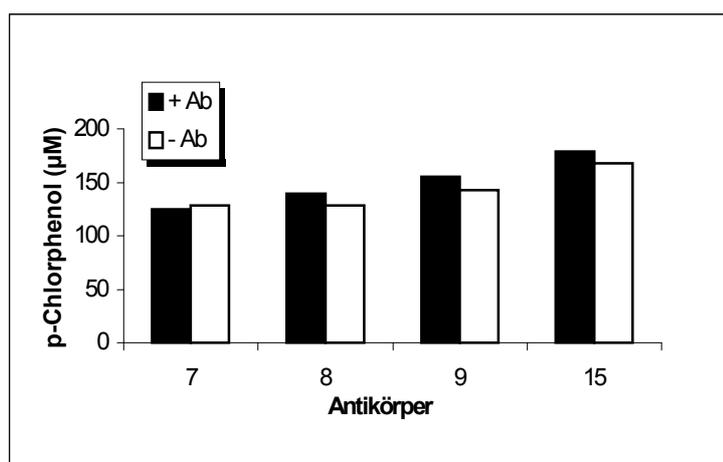


Abb.3.12: Einfluss der katalytischen Antikörper auf die Hydrolyse von Substanz 3

Der Ansatz enthielt 6,7 µM Antikörper und 1 mM Substrat in Bicin-Puffer, pH 8,5 und wurde vor der Messung am Tyrosinase-Sensor 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz ohne Antikörper (-Ab) entspricht der Spontanhydrolyse

Außerdem wurde überprüft, ob die katalytische Aktivität der Antikörper bereits in Kulturüberständen nachweisbar ist. Beim Einsatz von Kulturüberständen der katalytischen Antikörper (geschätzte Konzentration 20 µg/ml) konnte ein signifikant höheres Signal gegenüber der Eigenhydrolyse gemessen werden (Abb. 3.13). Kulturüberstände irrelevanter monoklonaler Antikörper (nicht gezeigt) hatten keinen Einfluss auf die Hydrolysegeschwindigkeit.

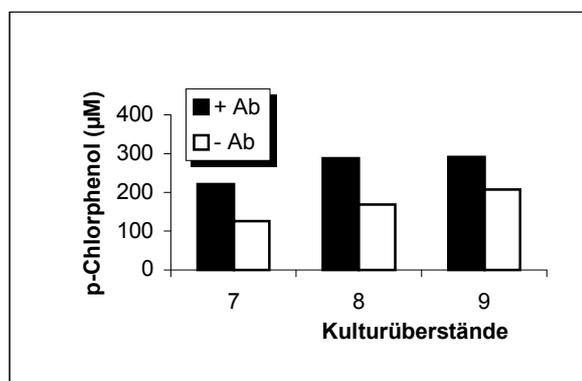


Abb. 3.13: Nachweis der Hydrolyse durch nicht aufgereinigte katalytische Antikörper.

Der Inkubationsansatz enthielt 50 µl Kulturüberstand und 1 mM POCc19 und wurde 60 - 100 min bei Raumtemperatur inkubiert. Gemessen wurde mit dem Tyrosinase-Sensor. Der Ansatz ohne Antikörper (-Ab) entspricht der Spontanhydrolyse.

Bedingt durch die Spülvorgänge in der elektrochemischen Messzelle variierten die Inkubationszeiten bei den Messungen der verschiedenen Kulturüberstände. Daraus resultieren die unterschiedlichen Werte der Spontanhydrolyse in Abb. 3.13. Die Inkubationszeiten bei Probe und Kontrolle des selben Kulturüberstandes waren jedoch gleich.

Die Homogenität der gereinigten Antikörper wurde durch SDS-PAGE mit Coomassieblau-Färbung bestätigt (Abb. 3.14).

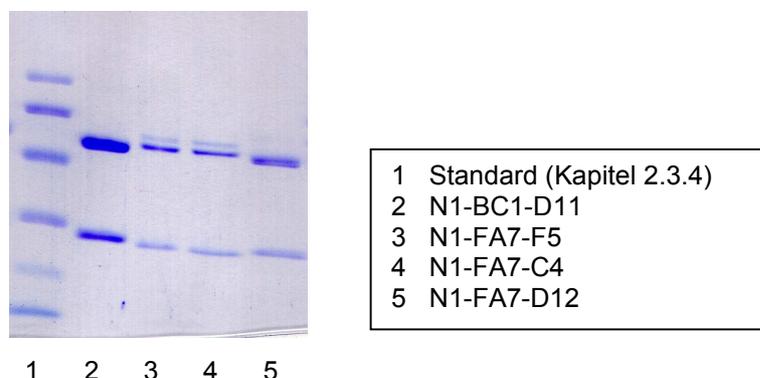
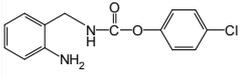
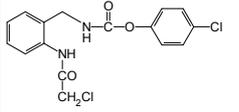
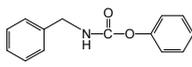
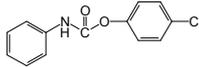


Abb. 3.14: SDS-PAGE von Anti-Hei3-Antikörpern.

Die Antikörper N1-FA7-F5 und N1-FA7-C4 gehören der IgG2b-Subklasse an und zeigen eine typische Doppelbande für die schwere Kette.

Alle 4 Abzyme waren Anti-Hei3-Antikörper und spalteten verschiedene Benzylphenylcarbamate. Die Ergebnisse des Katalyscreensings mit unterschiedlichen Substraten sind in Tabelle 3.15 zusammengefasst:

Tabelle 3.15: Substratspezifität der hydrolytischen Antikörper

Antikörper	Substrate			
	POCc18 	POCc19 	Substanz 27 	Substanz 3 
Ab7 (N1-BC1-D11)	+	+	+	-
Ab8 (N1-FA7-D12)	+	+	+	-
Ab9 (N1-FA7-C4)	+	+	+	-
Ab15 (R3-LG2-F9)	-	-	+	-
Ab33 (B91-KF5) Kontrolle	-	-	-	-

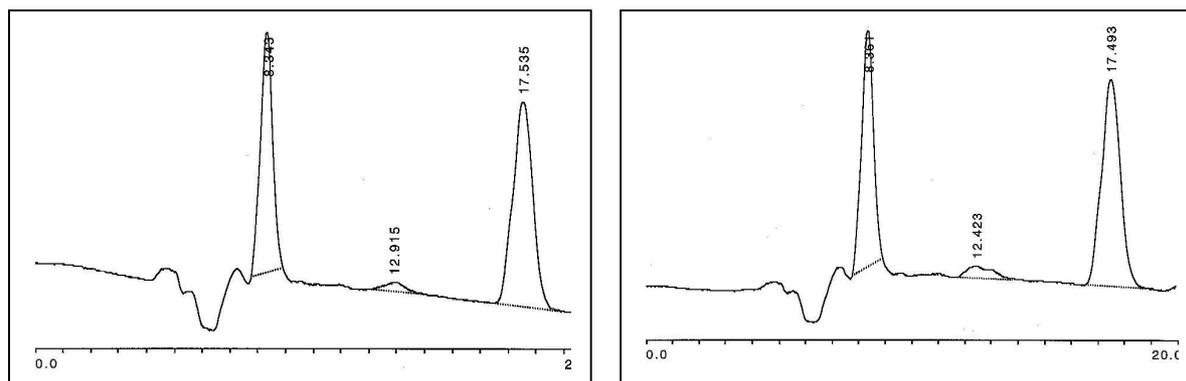
Bei der Spaltung von POCc19 mit dem Antikörper N1-BC1-D11 wurde das höchste Signal gemessen. Deshalb wurde dieser Antikörper und dieses Substrat für kinetische Untersuchungen ausgewählt.

3.5.2.3.2 Detektion von Phenolen mit HPLC

Voraussetzung für den Nachweis einer Hydrolyse mit der HPLC ist die Trennung von Substrat und Spaltprodukten. Mit dem gewählten Eluenten (65 % Wasser / 35 % Acetonitril) ergaben sich folgende Retentionszeiten:

POCc17:	7,9 min
<i>p</i> -Chlorphenol:	12,0 min
POCc19:	17,2 min

Demnach ist der Nachweis der Hydrolyse von POCc19 durch Antikörper N1-BC1-D11 mit der HPLC möglich. Wird der Ansatz sofort nach Zugabe von POCc19 analysiert, ist eine Spontanhydrolyse kaum feststellbar. Nach einer Inkubation von 30 min und anschließender Injektion vergrößert sich der Peak für *p*CP unwesentlich (Abb. 3.15A und 3.15B).

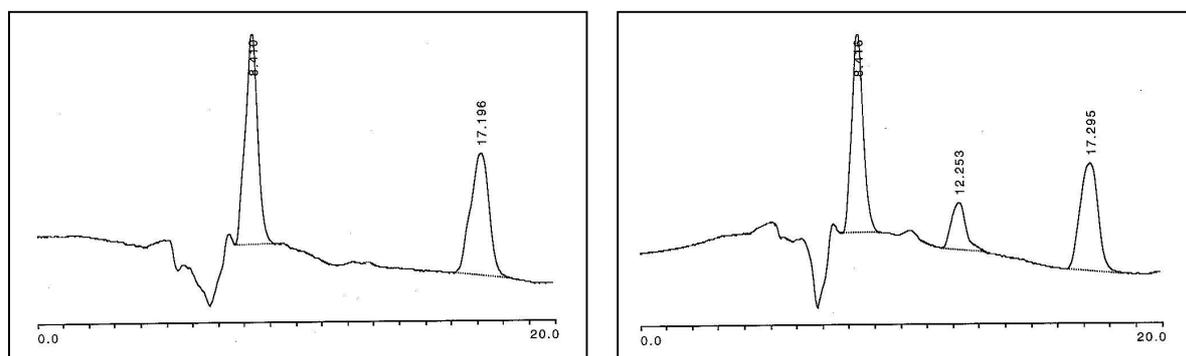


A

B

Abb. 3.15: Spontanhydrolyse von 100 µM POCc19 ohne Vorinkubation (A) und nach 30 min Vorinkubation (B), gemessen mit HPLC.

Eine 30minütige Inkubation von 200 µM POCc19 mit 1 mg/ml N1-BC1-D11 führte zu einem prominenten Peak bei 12 min (pCP, Abb. 3.16A und 3.16B), der die Katalysewirkung des Antikörpers anzeigt. Damit wurde die Katalyse mit einer zweiten unabhängigen Methode bestätigt.



A

B

Abb. 3.16: Hydrolyse von 200 µM POCc19 mit N1-BC1-D11 (6,7 µM) ohne Vorinkubation (A) und nach 30 min Vorinkubation (B)

3.6 Kinetische und thermodynamische Charakterisierung des hydrolytischen Antikörpers N1-BC1-D11

Zunächst wurde ein für die Messungen geeigneter Puffer gesucht. Die Spontanhydrolyse des Substrats POCc19 wurde dazu in drei verschiedenen Puffern im pH-Bereich zwischen 6,9 und 9,0 untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.17 dargestellt.

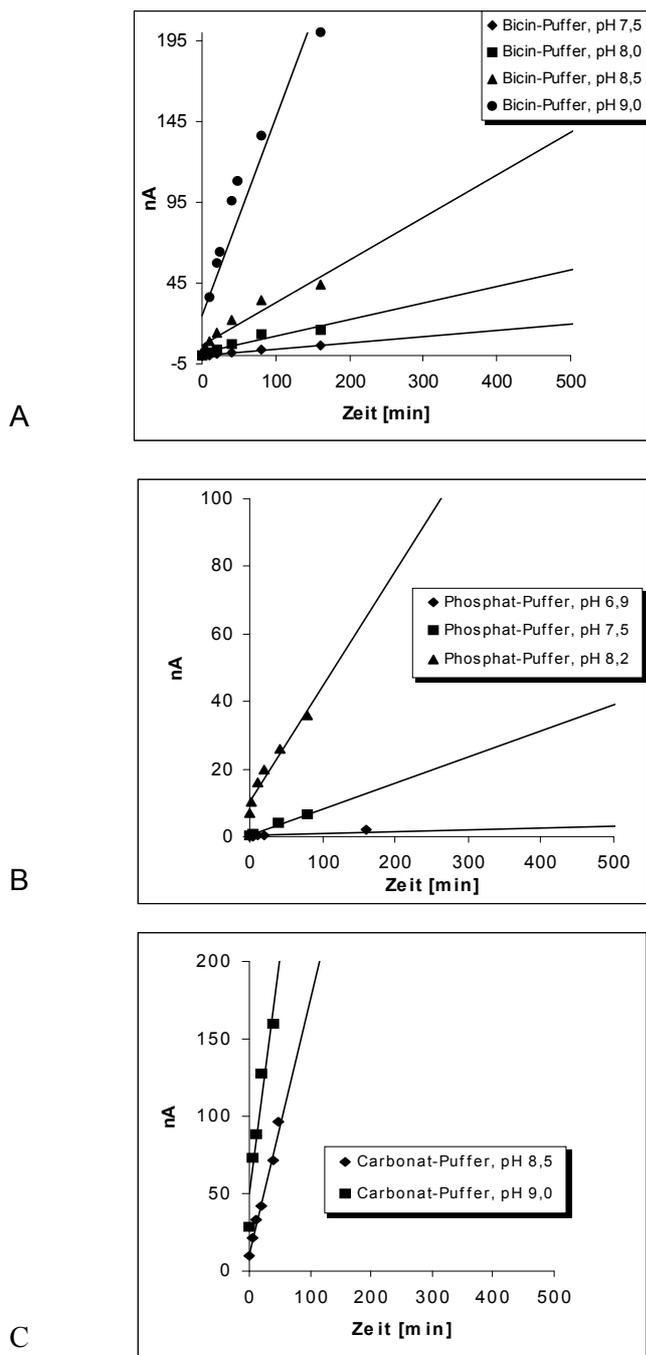


Abb. 3.17: Einfluss verschiedener Puffer auf die Spontanhydrolyse von POCc19.

Die Konzentration des entstandenen pCP wurde mit dem Tyrosinase-Sensor gemessen.

Im Carbonat-Puffer war die Eigenhydrolyserate von POCc19 sehr hoch (Abb. 3.17C). Ein ähnlicher Effekt wurde im Bicin-Puffer, pH 9,0 beobachtet (Abb. 3.17A). Schon nach 5 min wurden Stromstärken von mehr als 20 nA erreicht, d.h. dass bereits mehr als 10 % des Substrates zerfallen waren. Diese Puffer schieden für die weiteren Untersuchungen aus. In Abb. 3.18 sind die Werte der katalysierten Hydrolyse und der Spontanhydrolyse nach verschiedenen Inkubationsintervallen dargestellt. Die größten Differenzen zwischen katalysierter Hydrolyse und Spontanhydrolyse waren in den Bicin-Puffern pH 7,5 und pH 8,0

(Abb. 3.17A) sowie im Phosphat-Puffer, pH 6,9 zu verzeichnen (Abb. 3.18). Diese Puffer wurden für die weiteren kinetischen Untersuchungen gewählt.

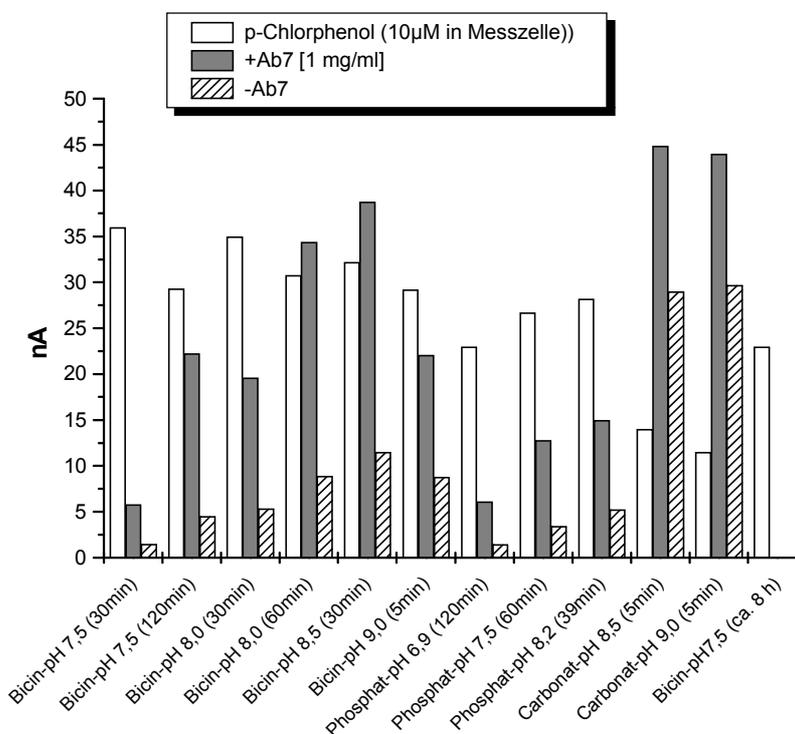


Abb. 3.18: Abhängigkeit der hydrolytischen Aktivität des Antikörpers N1-BC1-D11 von der Wahl des Puffersystems.

Die Inkubationszeit wurde zwischen 5 und 120 min variiert. Der Tyrosinase-Sensor wurde vor jeder Messung mit 10 µM pCP geeicht. Als Substrat diente 1 mM POCc19. Der Ansatz ohne Antikörper (-Ab) entspricht der Spontanhydrolyse.

Aufgrund seiner schlechten Löslichkeit konnte nur 1 mM des Substrats POCc19 eingesetzt werden. In diesem Bereich (500 µM bis 1 mM) wird jedoch eine Sättigung des Katalysators mit dem Substrat erreicht.

Abzyme katalysieren, ähnlich wie Enzyme, mit maximaler Geschwindigkeit bei Substratsättigung. Für die Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstanten musste die Substratkonzentration herabgesetzt werden. Mit abnehmender Substratkonzentration verkürzte sich der lineare Bereich (Abb. 3.19A, B, C). Die kinetischen Konstanten für die Hydrolyse des Substrats POCc19 durch den Antikörper N1-BC1-D11 wurden durch eine nichtlineare Anpassung mit einer Hyperbel mit Hilfe des Computerprogramms Origin 5.0 errechnet. In der Tabelle 3.16 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

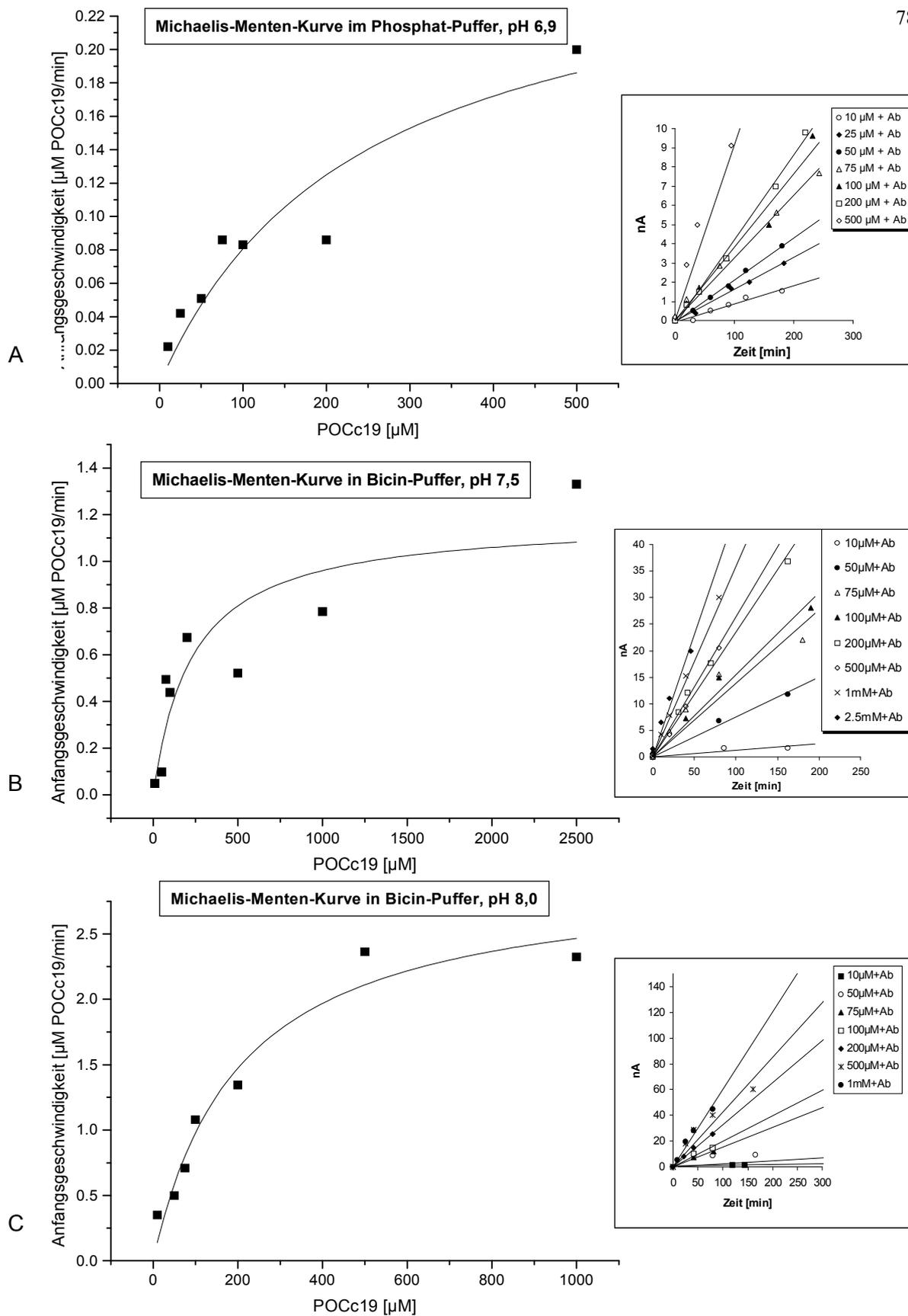


Abb. 3. 19: Michaelis-Menten-Kurven für die Hydrolyse vom POCC19 durch das Abzym N1-BC1-D11 in verschiedenen Puffern.

Rechts ist die Abhängigkeit des Signals der Antikörper-katalysierten Hydrolyse von der Zeit im jeweiligen Puffer dargestellt.

Tab. 3.16: Kinetische Parameter (Michaelis-Menten-Konstante (K_m), Umsatzgeschwindigkeit (v_{max}) und die Wechselzahl (k_{cat})); gemessen wurde mit dem Tyrosinase-Sensor in verschiedenen Puffern für N1-BC1-D11 (6,7 μ M).

Puffer	K_m , μ M	v_{max} , mM/min	k_{cat} , s^{-1}
Phosphat-Puffer, pH 6,9	243	0,28	0,35
Bicin-Puffer, pH 7,5	230	1,2	1,5
Bicin-Puffer, pH 8,0	210	3	3,7

Die Beschleunigungsrate (k_{cat} / k_{uncat}) betrug 10.

Die von Dr. Walter Stöcklein, Universität Potsdam, am BIACORE[®] ermittelten thermodynamischen Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (K_D) sind in der nachfolgenden Tab. 3.17 zusammengefasst. Die Werte zeigen eine hohe Affinität der katalytischen Antikörper zu den ÜZA Hei3 und OC4.

Tabelle 3.17: K_D -Werte der katalytischen Antikörper

monoklonale Antikörper	K_D (Hei3), nM	K_D (OC4), nM
N1-BC1-D11	2,6	13
N1-FA7-D12	0,9	4,6
N1-FA7-C4	1,0	8,3

Die Spaltung des Substrats POCc19 wurde mit verschiedenen Konzentrationen des Abzyms N1-BC1-D11 (0,0 mg/ml, 0,2 mg/ml, 1 mg/ml und 2 mg/ml) untersucht (Abb. 3.20). Bei konstanter Substratkonzentration ergibt sich eine lineare Abhängigkeit zwischen der Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse und der Konzentration des Abzyms. Aufgrund der Spontanhydrolyse des Substrats verläuft die Gerade nicht durch den Nullpunkt.

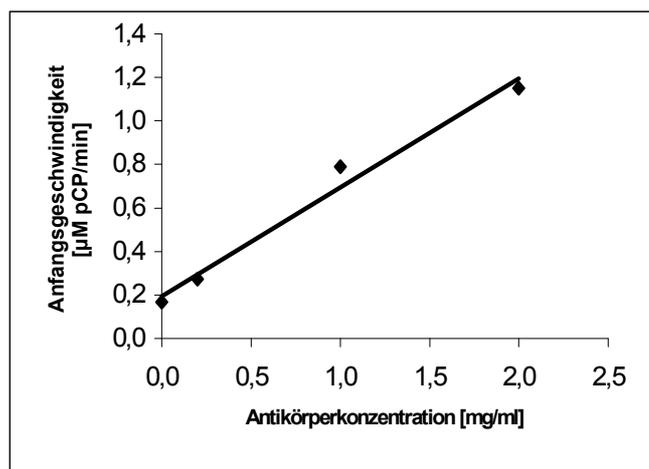


Abb. 3.20: Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit von der Abzymkonzentration.

Der Ansatz enthielt 1 mM POCc19 und variable Konzentrationen des Antikörpers N1-BC1-D11 in Bicin-Puffer, pH 7,5. Die Messung erfolgte mit dem Tyrosinase-Sensor.

Inhibitionsmessungen mit ÜZA

Zur Klärung der Frage, ob wirklich die Antigenbindungsstelle des Antikörpers für die Katalyse verantwortlich ist, wurden Spezifitätsuntersuchungen mit Inhibitoren durchgeführt. Für die Inhibitionsmessungen wurden die ÜZA Hei3 und OC4 eingesetzt.

Zuerst wurde der Einfluss der ÜZA Hei3 und OC4 auf die Aktivität der Tyrosinase getestet. Dazu wurden die ÜZA im Inkubationspuffer über einen Zeitraum von 1 h inkubiert und Proben mit dem Tyrosinasesensor vermessen. Es konnte kein Phenol oder pCP nachgewiesen werden, so dass die ÜZA für Inhibitonsexperimente eingesetzt werden konnten.

Zur Charakterisierung des Hemmtyps der ÜZA Hei3 und OC4 wurden für mehrere Messreihen mit variierenden POCc19-Konzentrationen die zugehörigen Anfangsgeschwindigkeiten bestimmt. Bei jeder Messreihe wurde eine bestimmte, jeweils konstant gehaltene Inhibitorkonzentration zugesetzt. Zur Kontrolle wurden Messungen in Abwesenheit des Inhibitors sowie in Abwesenheit des Katalysators durchgeführt.

Abb. 3.21 zeigt den Einfluss des Inhibitors Hei3 auf die Hydrolyseaktivität des Antikörpers N1-BC1-D11.

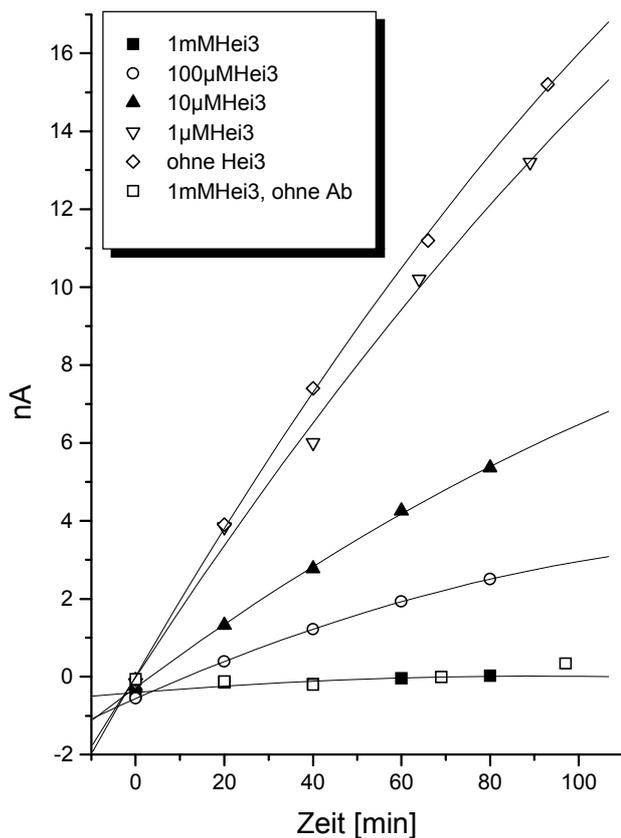


Abb. 3.21: Inhibition der hydrolytischen Aktivität des Antikörpers N1-BC1-D11 durch das ÜZA Hei3.

Der Ansatz enthielt $6,7 \mu\text{M}$ Antikörper, $250 \mu\text{M}$ POCc19 und variable Konzentrationen des Inhibitors Hei3 in Bicin-Puffer, pH 8,0. Die Messungen wurden mit dem Tyrosinase-Sensor vorgenommen. Die Messreihe \square wurde mit 1 mM Hei3 ohne Antikörper durchgeführt.

Die gemessenen Daten wurden linearisiert und sind in Tab. 3.18 und Tab. 3.19 dargestellt.

Tabelle 3.18: Einfluss des Inhibitors Hei3 auf die hydrolytische Aktivität des Abzyms N1-BC1-D11.

Dargestellt ist die Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse von POCc19 in $\mu\text{M}/\text{min}$ in Abhängigkeit von der Konzentration des Substrats und des Inhibitors. Alle Ansätze enthielten $6,7 \mu\text{M}$ Antikörper in Bicin-Puffer, pH 7,5.

Konzentration des Substrats POCc19 [μM]	Konzentration des Inhibitors Hei3 [μM]						
	0	1	10	50	100	500	1000
100	0,37	-	-	0,03	0,02	0,005	0
250	0,58	0,50	0,20	-	0,08	-	0,04
500	0,58	-	-	0,17	0,17	0,04	0,008

Tabelle 3.19: Einfluss des Inhibitors Hei3 auf die hydrolytische Aktivität des Abzyms N1-BC1-D11. Dargestellt ist die Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse von POCc19 in $\mu\text{M}/\text{min}$ in Abhängigkeit von der Konzentration des Substrats und des Inhibitors. Alle Ansätze enthielten $6,7 \mu\text{M}$ Antikörper in Bicin-Puffer, pH 8,0

Konzentration des Substrats POCc19 [μM]	Konzentration des Inhibitors Hei3 [μM]				
	0	1	10	100	1000
100	1,58	1,40	0,35	0,094	0,02
250	1,30	1,14	0,57	0,037	-
500	2,00	1,68	0,95	0,63	0,43

Stöchiometrische Mengen des ÜZA Hei3 führten zur völligen Inhibition der Katalyse. Der Einfluss kleiner Inhibitorkonzentrationen (z.B. $10 \mu\text{M}$ Hei3) wurde mit steigender Substratkonzentration geringer. Die Hemmung ließ sich durch Sättigung des Abzyms mit Substrat aufheben. Die v_{max} blieb von Hei3 unbeeinflusst; der k_{m} -Wert stieg scheinbar an. Dies deutet auf einen kompetitiven Inhibitor hin.

Diese ersten Inhibitionsmessungen lieferten nicht genügend Rohdaten, um die Inhibitionskonstanten zu berechnen.

Das ÜZA OC4 inhibierte die Katalyse ebenfalls (Tab. 3.20). Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der festgestellten Kreuzreaktivität der Antikörper N1-BC1-D11, N1-FA7-C4 und N1-FA7-D12 (Tab. 3.9).

Tabelle 3.20: Einfluss des Inhibitors OC4 auf die hydrolytische Aktivität des Abzyms N1-BC1-D11. Dargestellt ist die Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse von POCc19 in $\mu\text{M}/\text{min}$ in Abhängigkeit von der Konzentration des Substrats und des Inhibitors. Alle Ansätze enthielten $6,7 \mu\text{M}$ Antikörper in Bicin-Puffer, pH 7,5

Konzentration des Substrats POCc19 [μM]	Konzentration des Inhibitors OC4 [μM]		
	0	10	100
100	0,35	0,14	0,04

Das durch die Spaltung von POCc19 entstehende pCP verursachte keine Produktinhibition des Abzyms N1-BC1-D11.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zahlreiche Antikörper gegen Arylcarbamate und Arylharnstoffe, potenzielle Spaltprodukte und Übergangszustandsanaloga hergestellt und charakterisiert. Einige der Antikörper gegen ÜZA katalysierten die Hydrolyse von Benzylphenylcarbamaten.

Seit einigen Jahren wird intensiv an katalytischen Antikörpern geforscht und obwohl ihre Anzahl mittlerweile beachtenswert groß ist, wurden bisher keine katalytischen Antikörper beschrieben, die Benzylphenylcarbamate oder Harnstoffe hydrolysieren können. Nur einige wenige der beschriebenen Abzyme sind in der Lage, Diphenylcarbamate zu hydrolysieren. Arylcarbamate und Arylharnstoffe werden als Herbizide eingesetzt. Diese Substanzen sind stabil und über ihren Hydrolysemechanismus ist nur wenig bekannt. Deshalb wurden sie von uns als Substrate für eine Antikörper-vermittelte Hydrolyse ausgewählt. Eine Antikörper-vermittelte Katalyse wäre für die Grundlagenforschung und für die angewandte Forschung von Interesse.

Zur Generierung katalytisch aktiver Antikörper zur Hydrolyse von Arylcarbamaten und Arylharnstoffen wurden verschiedene Übergangszustandsanaloga verwendet. Einer der vier katalytischen Antikörper, N1-BC1-D11 wurde kinetisch untersucht. Die durch diesen Antikörper vermittelte Hydrolyse unterliegt einer Michaelis-Menten-Kinetik mit zufriedenstellenden Parametern. Das für die Immunisierung verwendete ÜZA inhibierte die hydrolytische Aktivität des Antikörpers.

Die Antikörper, die Substrate oder deren potenzielle Spaltprodukte binden, waren hauptsächlich für den Aufbau von immunologischen Tests zum Nachweis der Katalyse vorgesehen.

Zwei Antikörper gegen das Herbizid Diuron wurden hergestellt und umfassend charakterisiert. Ein empfindlicher Labortest zum Nachweis von Diuron wurde aufgebaut. Desweiteren wurden diese Antikörper in *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen zur Reaktivierung der Diuron-inhibierten Photosynthese eingesetzt.

4.1 Haptene und Hapten-Protein-Konjugate

Haptene müssen an Trägerproteine gekoppelt werden, um eine Immunantwort auszulösen. Eine hohe Haptendichte am Trägerprotein ist Voraussetzung für eine gute Immunantwort. Das am häufigsten zur Immunisierung benutzte Trägerprotein ist KLH (keyhole limpet hemocyanin; MW ca. 5000 kDa), das Sauerstoff-Transportprotein der Meeresschnecke

Megathura grenulata. Neben der hohen Immunogenität ist die große Anzahl freier für die Kopplung verfügbarer Aminogruppen (bis 2000 pro Molekül KLH) von Vorteil.

Die Kopplung der Haptene an Trägerproteine war auch für den Aufbau von Immunoassays notwendig. Diese Festphasen-Immunoassays wurden vielseitig im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt, z.B. um Fusionen zu screenen, um die Beschaffenheit neuer Hapten-Protein-Konjugate zu prüfen und um die Spezifität der Antikörper zu ermitteln. Das für diese Zwecke am häufigsten verwendete Trägerprotein ist BSA (MW 66 kDa, 67 freie Aminogruppen). Die Kombination - KLH zum Immunisieren; BSA (bovine serum albumin) zum Testen - erwies sich als sehr günstig, da beide Proteine keine ähnlichen Sequenzepitope besitzen, die zur Kreuzreaktivität führen können (Coligan et al., 1992-2002).

Die Kriterien, die Hapten-Trägerprotein-Konjugate erfüllen müssen, um als Immunogene eingesetzt werden zu können, lassen sich wie folgt zusammenfassen (Goodrow und Hammock, 1998):

1. Das Hapten darf durch die Kopplung in Grösse, Form (Geometrie) und Ladung nicht verändert werden,
2. Der Linker muss "harmlos", d.h. als Immunogen inert sein (z.B. eine oder mehrere Methylengruppen beinhalten),
3. Der Linker darf funktionelle Gruppen des Zielmoleküls weder maskieren noch verändern,
4. Die Kopplungsgruppe des Linkers muss mit anderen funktionellen Gruppen des Zielmoleküls kompatibel sein.

Sehr wichtig ist auch die Position des Linkers in der Haptenstruktur. Eine Positionierung des Linkers distal zu der funktionellen Gruppe, die dem Immunsystem präsentiert werden soll, führt zur Generierung von Antikörpern, die hauptsächlich diese Funktion und nicht den Linker erkennen (Harrison et al, 1991; Goodrow et al., 1994). Auf diese Art und Weise werden die entscheidenden Charakteristika einer einzelnen Substanz dem Immunsystem besser präsentiert.

Von besonderer Bedeutung ist, dass ein inerte Linker, der keine konjugierten Doppelbindungen, aromatischen Ringe oder Heteroatome enthält, verwendet wird (Harrison et al, 1991; Goodrow et al., 1994; Goodrow und Hammock, 1998). Andernfalls werden zumeist linkerspezifische Antikörper generiert. Dies kann durch eigene Erfahrungen mit den Antikörpern gegen das potenzielle Produkt POCc10 bestätigt werden. Dies ist wahrscheinlich

auf die ausgeprägte Heterogenität des für diese Kopplung verwendeten Chloracetylaminolinkers zurückzuführen.

Unsere Resultate bestätigen, dass ein Hapten, das einen schwach immunogenen Linker distal zu der zu präsentierenden Funktion trägt, optimal für die Generierung Hapten-spezifischer Antikörper ist.

Wurde Glutaraldehyd als Kopplungsreagenz zum Immunisieren verwendet (Fusion N1, Immunogen Hei3), so war die überwiegende Anzahl der 209 zunächst selektierten Antikörper gegen Glutaraldehyd gerichtet. Als möglicher Grund hierfür ist, neben der hohen Immunogenität von Glutaraldehyd, auch die *ortho*-Position der Kopplungsgruppe anzusehen. Um frühzeitig auszuschließen, dass gegen die Kopplungsgruppe gerichtete Antikörper das Screening der Fusion stören, wurden die Tests mit Konjugaten durchgeführt, die mittels anderer Kopplungsmethoden hergestellt wurden. So wurde z.B. das Hapten OC7 zum Immunisieren über Disuccinimidylsuberat (DSS) und zum Testen über 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimid HCl (EDC) gekoppelt. In Fällen, in denen unterschiedliche Kopplungsmethoden nicht verfügbar waren, wie z.B. bei den Haptenen POCc9 oder POCc10, wurde kurz nach der Fusion in einem Kompetitionsassay die Bindung des Haptens in Lösung untersucht, um frühzeitig die Antikörper auszuschließen, die die Kopplungsgruppe erkennen.

Die verwendeten Haptene (Tab. 2.1, 2.2, 2.4 und 2.5) verfügen über aromatische Aminogruppen, Carboxylgruppen oder Chloracetylgruppen, über die die Kopplung an Trägerproteine erfolgte. Die verwendeten Methoden und die Ergebnisse der quantitativen Charakterisierung der Konjugate mittels MALDI-TOF-MS sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Die qualitative Charakterisierung der Konjugate erfolgte in Bindungsassays mit spezifischen monoklonalen Nachweisantikörpern oder über eine Farbreaktion mit dem Reagenz Dimethylaminozimtaldehyd (DACA). Die beobachtete intensive rote Färbung nach Kopplung des Haptens H1 über EDC/NHS im 2-Schritt-Verfahren mit Voraktivierung des Haptens bestätigte, dass die primäre aromatische Aminogruppe von H1 frei war, d.h. dass die Kopplung über die andere kopplungsfähige Gruppe, die Carboxylgruppe, erfolgte.

Tab. 4.1: Kopplungsdichten verschiedener BSA-Konjugate bei Verwendung unterschiedlicher Kopplungsmethoden

Kopplungsgruppe	Kopplungsmethode	Hapten	durchschnittliche Kopplungsdichte pro Molekül BSA
Aromatische Aminogruppe	EDC – 1-Schritt in MES-Puffer, pH 4,7	Hei3	2
	EDC – 1-Schritt in Aqua bidest.	Hei3	3-4
	EDC – 2-Schritt in Aqua bidest.	Hei3	5
	DSS in PBS, pH 7,3	Hei3	2-3
Carboxylgruppe	EDC/NHS – 1-Schritt in Aqua bidest.	POCc9	9
	EDC/NHS – 2-Schritt in Aqua bidest.	H1	9
Chloracetylgruppe	Trauts Reagenz in Carbonatpuffer, pH 8,5	POCc10, POCc12	8
	Trauts Reagenz in Carbonatpuffer, pH 9,6	POCc10, POCc12	11

Um eine gute Immunantwort zu erhalten, sollte eine Haptendichte von 5 bis 15 Molekülen pro Molekül BSA ausreichend sein (Masseyeff et al., 1993). Unsere Kopplungsraten liegen in diesem Bereich. Es wurden Methoden der Konjugation über EDC sowohl im alkalischen als auch im neutralen Milieu beschrieben, die gute Kopplungsraten ermöglichen sollten (Hermanson, 1996; Aslam and Dent, 1998). Bei niedrigen pH-Werten sollte der zwischen EDC und der Carboxylgruppe formierte Komplex stabil sein, allerdings ist die Reaktionsfreudigkeit der aromatischen Amine sehr gering. Mit steigendem pH-Wert steigt die Aktivität der aromatischen Amine einerseits, andererseits wird der Komplex schneller hydrolysiert. Die eigenen Ergebnisse zeigten, dass eine Konjugation im neutralen Milieu zu einer höheren Haptendichte führt. Mit Hilfe des 2-Schritt-Verfahrens ließen sich befriedigende Konjugate von Haptenen mit freier aromatischer Aminogruppe herstellen. Die Ursache für die schwache Kopplung in 1-Schritt-Verfahren liegt wahrscheinlich in der schwachen Reaktivität der aromatischen Aminogruppen.

Bei den BSA-Konjugaten, die zur Immobilisierung der Haptene in Bindungsassays verwendet wurden, stellte die relativ niedrige Haptendichte kein Problem dar. Wir konnten eine große

Anzahl spezifischer Antikörper identifizieren (z.B. gegen ÜZA OC7), was eindeutig für die Brauchbarkeit der verwendeten BSA-Hapten-Konjugate spricht. Indirekt ist das auch ein Indiz dafür, dass das für die Immunisierung verwendete Konjugat eine gute Immunantwort ausgelöst hatte. Aufgrund der größeren Anzahl freier Aminogruppen war zu erwarten, dass die KLH-Hapten-Konjugate mindestens ähnlich gut konjugiert sind wie die BSA-Konjugate.

Ein Transferrin-Molekül verfügt durchschnittlich über 4 - 6 Moleküle Sialinsäure. Deshalb wurde angenommen, dass die Kopplungsrate für Haptene mit freier Aminogruppe über EDC bei der 2-Schritt-Methode (mit vorangehender Aktivierung des Trägerproteins) höher sein würde. Diese Annahme wurde experimentell nicht bestätigt. Die Kopplungsraten waren bei Transferrin und BSA ähnlich.

Die geringe Kopplungsdichte von Hei 3 bzw. OC7 könnte das Screening der Phagenbanken erschwert haben. Dies könnte ein Grund für die nicht gelungene Suche nach rekombinanten humanen Antikörpern sein, da für das Screening eine hohe Kopplungsdichte benötigt wird.

Wentworth et al. (1996) koppelten ein Phosphonsäurederivat, das als ÜZA eingesetzt wurde, über EDC an BSA und konnten 17 Moleküle Hapten pro Molekül BSA nachweisen. Das benutzte Hapten verfügte über eine schwach reaktive aromatische Aminogruppe. Um gute Konjugate zu erhalten, synthetisierten die Autoren den NHS-Ester des Haptens und benutzten diesen in der Kopplungsreaktion. Tawfik et al. (1997) koppelten ebenfalls den NHS-Ester ihres ÜZA an BSA und erreichten eine Kopplungsrate von 16 Molekülen Hapten pro Molekül BSA. Diese Werte sind 3 bis 4fach höher als die mit Hei3 und ähnlichen Haptenen erreichten Werte. Die meisten Arbeitsgruppen, die katalytische Antikörper herstellen, benutzen Haptene mit einer Carboxylgruppe für die Kopplung an Trägerproteine. Der Grund hierfür ist die mögliche Voraktivierung des Derivats in organischen Lösungsmitteln. In den meisten Fällen wurden mehr als 10 Haptenmoleküle pro Molekül BSA konjugiert. Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Kopplungseffizienz der vorhandenen Substanzen mit einer aromatischen Aminogruppe könnte deshalb die Synthese der entsprechenden NHS-Ester sein. Dies sollte bei zukünftigen Synthesen neuer Substanzen berücksichtigt werden.

Lindner und Robey (1997) entwickelten die Kopplungsmethode für Peptide mit freier Chloracetylgruppe. Sie führten Kopplungsversuche bei pH 8,0 durch und erhielten 8 mol Peptid pro mol BSA. Die von uns durchgeführte Modifizierung der Methode (Erhöhung des pH-Wertes auf 9,6) erbrachte eine Verbesserung der Haptendichte auf durchschnittlich 11. Anscheinend werden bei höherem pH-Wert mehr Aminogruppen des Trägerproteins in Thiolgruppen umgewandelt.

Durch die Anwendung und Optimierung von verschiedenen Kopplungsmethoden ist es gelungen, die kommerziellen und von den Instituten der Chemie der Universität Potsdam zur Verfügung gestellten niedermolekularen Substanzen an KLH und BSA in ausreichender Dichte zu koppeln. Damit war eine wesentliche Voraussetzung für die beabsichtigte Herstellung von Antikörpern und für den Aufbau von Festphasen-Immunoassays erfüllt.

4.2. Gewinnung, Charakterisierung und Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen Substrate

4.2.1 Antikörper gegen OC2

Antikörper gegen den Benzylphenylharnstoff OC2 wurden benötigt um:

- einen immunologischen Katalysetest für OC2 zum Nachweis der Substratabnahme aufzubauen und
- das potenzielle Herbizid OC2 nachzuweisen.

Die Charakterisierung des Anti-OC2-Antikörpers B76-BF5 ergab eine relativ breite Kreuzreaktivität mit anderen Arylharnstoffen und vor allem mit Benzylphenylcarbamaten. Damit war dieser Antikörper zum Nachweis verschiedener Substrate geeignet.

Der Antikörper B76-BF5 wurde in einem Bindungsassay und in einem indirekten Kompetitionsassay (Kapitel 2.5.1 und 3.5.1) zum Nachweis der Katalyse des Arylcarbamates POCc12 mit Kulturüberständen der Anti-Hei3-Antikörper eingesetzt.

4.2.2 Antikörper gegen Diuron

Diese Antikörper waren vorgesehen für:

- den Aufbau eines Katalysetests für Diuron (Nachweis der Substratabnahme) und
- den Aufbau eines sensitiven Nachweistests für das Herbizid.

Verwendung der Anti-Diuron-Antikörper zum Aufbau eines Nachweistests

Ein empfindlicher Nachweis für Diuron ist wichtig, weil dieses Herbizids in Deutschland nach jahrelangem Einsatz vielfach in Oberflächengewässern und Grundwasser gefunden wurde. Diuron wird derzeit vorwiegend mit Hilfe der Kapillarelektrophorese, der Hochdruckflüssigkeitschromatographie oder der Gaschromatographie-Massenspektroskopie nachgewiesen. Dieser Nachweis ist aber relativ aufwändig und teuer (Gimeno et al., 2001; Wittke et al., 2001; Yang and Rassi, 1999). Die wichtigsten Vorteile eines Enzymimmunoassays im Vergleich zu den oben aufgeführten etablierten Nachweismethoden für Diuron sind die Möglichkeit der Verwendung nicht vorbehandelter Proben, die geringe

Testzeit, der geringe apparative Aufwand und die niedrigen Kosten. Enzymimmunoassays zeichnen sich desweiteren durch eine hohe Sensitivität aus. Die Nachweisgrenzen für Haptene liegen häufig im nanomolaren Bereich.

Das Hapten POCc9 wurde als Immunogen zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern gegen Diuron eingesetzt, weil es alle im Kapitel 4.1 benannten Kriterien erfüllt. POCc9 verfügt über einen inerten Linker distal zur Harnstoff-Gruppierung. Die Kopplungsrate von POCc9 war ausreichend gut (9 Moleküle pro Molekül BSA), so dass optimale Bedingungen zur Gewinnung spezifischer Antikörper vorhanden waren.

Beide gegen Diuron generierte Antikörper B91-KF5 und B91-CG5 haben IC_{50} -Werte für Diuron zwischen 0,8 und 2,1 nM (186 und 489 ng/l). Diese wurden in einem homogenen Kompetitionsassay mit immobilisiertem BSA-POCc9 nach Vorinkubation der Antikörper mit Diuron bestimmt. Mit dem ersten von Karu et al. (1994) beschriebenen monoklonalen Antikörper gegen Diuron wurde bei ähnlichen Testbedingungen ein IC_{50} -Wert von ca. 230 μ g/l erreicht. Dieser IC_{50} -Wert ist in etwa um drei Zehnerpotenzen höher als die IC_{50} -Werte unserer monoklonalen Antikörper, d.h. dass der von uns entwickelte Labortest eine ca. 1000fach höhere Empfindlichkeit gegenüber Diuron besitzt.

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (K_D) für B91-CG5 und B91-KF5 betragen $2,2 \times 10^{-11}$ mol/l und $2,3 \times 10^{-11}$ mol/l. Diese Werte sind extrem niedrig. Für die meisten hoch affinen Antikörper liegen sie im nM-Bereich. Verglichen mit unserem hochaffinen Anti-Substrat-Antikörper B76-BF5 (K_D von $1,1 \times 10^{-9}$ mol/l) sind die K_D -Werte um 2 Zehnerpotenzen niedriger.

Der Antikörper B91-CG5 reagiert unter den gewählten Bedingungen spezifisch mit Diuron. Wegen seiner niedrigen Gleichgewichtsdissoziationskonstante und seiner strengen Spezifität für Diuron wurde dieser Antikörper für einen spezifischen Diuron-Assay favorisiert.

Der Antikörper B91-KF5 bindet bevorzugt Dihalogen-substituierte Herbizide wie Linuron, Chlorbromuron und Propyzamid. Dieser Antikörper erkennt im Unterschied zu B91-CG5 sowohl die Harnstoff- als auch die Carbamat-Funktion. Wird ein monosubstituiertes Derivat wie POCc6, das von B91-KF5 mit niedriger Affinität gebunden wird, zur Immobilisierung an der festen Phase benutzt, stieg die Kreuzreaktivität des Antikörpers bezüglich der monosubstituierten Herbizide Monolinuron und Metobromuron. Im selben Maße sank aber die Kreuzreaktivität bezüglich anderer Derivate wie Propyzamid (mit von der 3,4-Dihalogen-Substitution abweichendem Muster) oder Chlortoluron (mit abweichenden Substituenten).

Der Antikörper B91-KF5 kann aufgrund seiner Kreuzreaktivität zur Bestimmung einer Palette von Herbiziden wie Chlorbromuron, Linuron, Propyzamid, Chlortoluron, Metoxuron, Monuron, Monolinuron und Metobromuron verwendet werden und ist daher zum Monitoring von Böden und Gewässern geeignet.

Die Antikörper B91-KF5 und B91-CG5 besitzen ein großes Potenzial sowohl zum spezifischen Nachweis von Diuron als auch zum Nachweis einer Palette von Harnstoff-Herbiziden mit ähnlicher Struktur. Der entwickelte Labortest mit dem Antikörper B91-CG5 (IC_{50} -Wert 0,19 $\mu\text{g/l}$; untere Nachweisgrenze 0,04 $\mu\text{g/l}$) ist empfindlicher als alle anderen bis jetzt veröffentlichten immunologischen Nachweisverfahren für Diuron.

In Deutschland gilt die Richtlinie der Europäischen Union bezüglich des Grenzwertes von Pflanzenschutzmitteln. In der Trinkwasserverordnung ist ein Grenzwert von 0,1 $\mu\text{g/l}$ pro Einzelwirkstoff oder 0,5 $\mu\text{g/l}$ für die Summe aller Pflanzenschutzmittel einschließlich toxischer Hauptabbauprodukte festgeschrieben. Es ist offensichtlich, dass mit Hilfe des Antikörpers B91-CG5 Diuron in diesem Bereich gemessen und der beschriebene Test zum Monitoring eingesetzt werden kann. Der Antikörper B91-KF5 (IC_{50} -Wert 0,49 $\mu\text{g/l}$; untere Nachweisgrenze 0,07 $\mu\text{g/l}$) kann aufgrund seiner Kreuzreaktivität zum Nachweis einer Gruppe von Harnstoff-Herbiziden eingesetzt werden.

Die Senkung des IC_{50} -Werts für Diuron auf 0,1 $\mu\text{g/l}$ (der in der Trinkwasserverordnung festgeschriebene Wert für Pflanzenschutzmittel) in unserem Test wäre jedoch wünschenswert.

Eine Möglichkeit dazu ist der Einsatz schwacher Kompetitoren. Goodrow und Hammock (1998) beschrieben, dass die niedrigste Nachweisgrenze für einen Analyten erreicht wird, wenn die Affinität des Antikörpers zum Analyten größer ist als die Affinität zum immobilisierten Derivat. Durch die relativ schwache Affinität des Konjugats konkurriert der Analyt erfolgreicher als bei gleichen Affinitäten von Konjugat und Analyt. Ein heterogener Kompetitionsassays zum Nachweis von N-Methylcarbamatpestiziden mit einem immobilisierten Derivat des untersuchten Pestizids brachte eine 10 bis 100fache Erhöhung der Sensitivität im Vergleich zu einem homogenen Kompetitionsassay (Abad et al. 1998). Der IC_{50} -Wert für Diuron bei B91-KF5 sank unwesentlich von 2,1 nM auf 1,1 nM wenn POCc6 statt POCc9 an der festen Phase immobilisiert wurde. Eine ähnliche Abhängigkeit für B91-CG5 konnte nicht festgestellt werden. Dies liegt vermutlich daran, dass die Antikörper selbst eine sehr hohe Affinität zu Diuron besitzen und die Affinität zu Monuron (POCc6) nur um eine Größenordnung geringer ist.

Ein noch schwächerer Kompetitor wie das POCC5 (ein Derivat des Herbizids Fenuron) führte ebenfalls nicht zur Etablierung eines empfindlicheren Tests zum Nachweis von Diuron mit B91-CG5. B91-CG5 in einer Konzentration von 3,3 nM band das BSA-POCC5-Konjugat, das erhaltene Signal war jedoch schwach (OD_{490} ca. 0,2). Der Einsatz höherer Konjugat- oder Antikörperkonzentrationen führte zu einer ca. 50 %igen Erhöhung des Signals. Diese reichte jedoch für eine exakte Messung nicht aus. Der Grund dafür könnte die relativ schwache Affinität von B91-CG5 zum Hapten-Protein-Konjugat sein.

Eine weitere Möglichkeit zur Generierung eines schwachen Kompetitors, bei dem der Sauerstoff in der Harnstoffgruppierung gegen Schwefel im immobilisierten Diuronderivat ausgetauscht wurde, wurde diskutiert (Goodrow und Hammock, 1998). Das größere Schwefelatom passt anscheinend schlechter in die für das Sauerstoffatom selektierte Antigenbindungsstelle des Antikörpers. Dies führt wahrscheinlich durch den Verlust von Wasserstoffbrücken zwischen dem Thiocarbonyl und dem Antikörper zur Verringerung der Affinität. Kraemer et al. (1997) immobilisierten ein Thio-Diuron-Derivat und erreichten mit dem von Karu et al. (1994) hergestellten Anti-Diuron-Antikörper einen IC_{50} -Wert von 4 $\mu\text{g/l}$. Dies ist eine etwa 60fache Verbesserung gegenüber dem von Karu et al. (1994) gemessenen Wert (IC_{50} -Wert von 230 $\mu\text{g/l}$) bei Einsatz eines sauerstoffhaltigen Derivats. Karu et al. (1994) berichteten selbst über einen verbesserten IC_{50} -Wert (2 $\mu\text{g/l}$) bei Immobilisierung eines Derivats mit einem Methylenlinker am inneren Stickstoff der Harnstoffgruppierung.

Es wäre sinnvoll zu prüfen, ob der Einsatz eines anderen immobilisierten Konjugats in einem heterogenen Kompetitionsassay auch in unserem Fall eine wesentliche Verbesserung des IC_{50} -Werts und damit der Testempfindlichkeit mit sich bringt.

Ein anderer Weg ist der Einsatz von Enzym-markierten Haptenen. Hierbei würde auch die Testzeit verkürzt. Ein direkter Kompetitionsassay mit POCC6, markiert mit Peroxidase, wurde aufgebaut. Dieser Test erreichte jedoch nicht die Sensitivität des indirekten Kompetitionsassays.

Eine Verbesserung der Nachweisgrenzen wurde jedoch bei beiden Kompetitionsassays durch die Gewährung einer Kontaktzeit (30 bis 60 min Vorinkubation) zwischen Antikörper und Analyt (Diuron) erreicht.

Es wird gegenwärtig versucht, antiidiotypische Antikörper gegen B91-KF5 und B91-CG5 zu generieren, um ein neues Testsystem zu etablieren, von dem wir uns eine Erhöhung der Sensitivität versprechen.

Die Antikörper binden Diuron in komplexen Gemischen wie der Zell- oder Thylakoidsuspension. Es wird daher erwartet, dass beim Einsatz des Antikörpers zum Umweltmonitoring eine aufwendige Probenvorbehandlung nicht notwendig sein wird.

Die Detektion von Diuron in Oberflächengewässern und Grundwasser und die Angst vor einer dauerhaften Kontamination mit Diuron führte 1996 in Deutschland zu einem Verbot dieses Herbizids. In den letzten Jahren wurden allerdings immer mehr Stimmen laut, die für eine erneute Zulassung dieses hauptsächlich von der Deutschen Bahn AG zur Totalbekämpfung des Gleisbewuchses eingesetzten Herbizids plädieren. Mit dem vorhandenen Labortest ist eine schnelle und preiswerte Möglichkeit zum Monitoring von Diuron geschaffen worden, welche in die Diskussion um die Wiedenzulassung von Diuron eingebracht werden könnte. Es sollte ein Interessent gefunden werden, der den vorhandenen Labortest weiterentwickelt und vermarktet. Ein Kontakt mit den Verantwortlichen bei der Deutschen Bahn AG ist aufgenommen worden.

Zur Zeit werden diese Antikörper in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Axel Warsinke auf eine mögliche Anwendung in Immunosensoren getestet.

Die generierten Anti-Diuron-Antikörper könnten auch in einem Immunoassay zum Nachweis der Katalyse verwendet werden.

Verwendung der Anti-Diuron-Antikörper zur Reaktivierung der Diuron-inhibierten Photosynthese

Es konnte sowohl in *in vitro*-Tests, als auch in *in vivo*-Tests gezeigt werden, dass eine Vorinkubation des Anti-Diuron-Antikörpers mit dem Herbizid Diuron zu dessen vollständiger Inaktivierung als Photosyntheseinhibitor führt (Abb. 3.2 und Tab. 3.3). Weiterhin bewirkte die Zugabe des Anti-Diuron-Antikörpers zu Diuron-behandelten Thylakoiden eine sehr schnelle Reaktivierung des linearen Elektronentransports (Abb. 3.3). Eine weitere Bestätigung, dass die Reaktivierung ein sehr schneller Prozess war, fand sich in den ermittelten hohen Bindungskonstanten k_{on} ($6 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ für B91-KF5 und $2.3 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ für B91-CG5). Bei Zugabe des Anti-Diuron-Antikörpers zu einer mit Diuron inhibierten Suspension von intakten Algenzellen konnte ebenfalls eine vollständige Reaktivierung der Photosynthese nachgewiesen werden (Abb. 3.4). Wurde der Anti-Diuron-Antikörper durch einen irrelevanten Antikörper oder BSA ersetzt, so blieb die Hemmung bestehen. Andererseits führte die Zugabe mikromolarer Konzentrationen eines beliebigen Proteins (irrelevanter Antikörper,

BSA oder Ovalbumin) zu einer leichten Erhöhung der apparenten Photosyntheserate. Der Grund für diese leichte Stimulierung ist unklar.

Viele Harnstoffherbizide, darunter auch Diuron, wirken durch Inhibition des Elektronentransportsystems. Das Elektronentransportsystem in den Chloroplasten besteht aus drei integralen Membranproteinen: dem Photosystem II-Komplex (PSII), dem Cytochrom b_6/f -Komplex und dem Photosystem I-Komplex (PSI). PSII nimmt die aus der Wasserspaltung stammenden Elektronen auf und überträgt sie über das fest gebundene Plastochinon (Q_A) auf das in der Q_B -Bindenische des D1-Proteins bindende frei diffundierende Plastochinon (PQ), das dadurch zu Plastohydrochinon reduziert wird. Diuron und alle ähnlichen Harnstoff-Herbizide sowie die Carbamat-Herbizide Desmedipham und Phenmedipham entfalten ihre hemmende Wirkung durch Bindung in die Q_B -Bindenische des Proteins D1 (Xiong et al., 1996). Durch diese Bindung wird sowohl die photosynthetische O_2 -Entwicklung gehemmt, als auch die Reduktion von $NADP^+$ verhindert, was letztendlich den Pentosephosphatzyklus abschaltet. Die Hemmung durch die oben genannten Herbizide ist sehr effektiv und bei allen Pflanzen wirksam. Allerdings werden die Herbizide kaum biologisch abgebaut und haben lange Halbwertszeiten.

Wenn der Elektronentransport ungestört abläuft, bindet das Plastochinon in die Q_B -Bindenische des D1-Proteins. Xiong et al. bestimmten die Dissoziationskonstante des Komplexes Diuron - D1-Protein von *Chlamydomonas* mit ca. 54 nM (Xiong et al, 1998). Dieser Wert überschreitet den für den Komplex Diuron – Antikörper ermittelten Wert (0,23 nM) um mehr als 3 Zehnerpotenzen. Wir konnten zeigen (Kapitel 3.6.2), dass keiner der beiden Anti-Diuron-Antikörper den natürlichen Liganden des D1-Proteins – Decyl-Plastochinon bindet. Der Antikörper ist aufgrund seines Molekulargewichtes (150 kDa) nicht in der Lage, die Zellmembran der *Chlamydomonas*-Zellen zu passieren und kann deshalb nur extrazelluläres Diuron binden. Ausgehend von einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 900,5 g/mol für Chlorophyll und einem Gehalt von ca. 2 mmol D1 pro mol Chlorophyll (Lazar et al, 1998) kann grob überschlagen werden, dass bei einem Chlorophyll-Gehalt der Algensuspension von 6 $\mu\text{g/ml}$ und einer Diuron-Konzentration von 0,25 μM ein mehr als 10facher Überschuss von Diuron zum D1-Protein gegeben ist. Der extrazelluläre Diuron-Pool ist groß und seine Wechselwirkung mit dem intrazellulären Diuron-Pool, der aus freiem und aus in der Q_B -Bindungsnische gebundenem Diuron besteht, erfolgt sehr schnell. Die erfolgreiche Bildung des Komplexes Diuron-Antikörper ausserhalb der Zellen führt offensichtlich intrazellulär zur Freilassung von Diuron aus der Q_B -Bindungsnische. Dies lässt den Schluss zu, dass die Bindung von Diuron an die Q_B -

Bindungsnische des D1-Proteins ein reversibler Prozess ist. Diese Aussage widerspricht der von Lazar et al. angenommenen irreversiblen Bindung (Lazar et al, 1998).

Eine mögliche Anwendung der Anti-Diuron-Antikörper ist die Generierung Herbizid-toleranter transgener Nutzpflanzen. Diese Pflanzen sind in der Lage, Antikörper oder Antikörperfragmente zu synthetisieren und zu akkumulieren (Friedler et al, 1999). Für eine effektive Expression ist es wichtig, dass die Immunoglobuline im Endoplasmatischen Reticulum korrekt zusammengebaut und glykosyliert werden. Allerdings läuft die Glykosylierung in Pflanzen nach einem veränderten Muster ab. Die Akkumulation funktioneller Antikörper im Cytosol der Pflanzenzellen ist im Allgemeinen sehr niedrig. Die hochaffinen Antikörper B91-KF5 und B91-CG5 schützen die Photosynthese vor dem Einfluss von Herbiziden auch wenn diese extrazellulär eingesetzt werden. Es wird erwartet, dass zur Generierung Diuron-toleranter transgener Pflanzen ein Targeting dieser Antikörper über das Endoplasmatische Reticulum in den Apoplast ausreichen würde. Im Apoplast können, im Unterschied zum Cytosol, bedeutende Antikörper-Konzentrationen erreicht werden. Aufgrund der Kreuzreaktivität des Antikörpers B91-KF5 wird erwartet, dass die diesen Antikörper exprimierenden transgenen Pflanzen gegen eine Palette von Herbiziden tolerant wären.

Die leichten und schweren Ketten beider Antikörper wurden bereits sequenziert (Ergebnisse nicht dargestellt). Arbeiten zur Generierung eines scFv und zur Kristallisierung sind begonnen worden. Vor der Herstellung transgener Pflanzen sollte jedoch nachgewiesen werden, dass die Affinität des scFv für eine Herbizidresistenz ausreichend ist.

4.3 Gewinnung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen potenzielle Produkte der hydrolytischen Reaktion

Die Anforderungen, die die Anti-Produkt-Antikörper erfüllen sollten, waren:

- hochaffine Bindung des Spaltprodukts,
- keine Kreuzreaktivität mit den Substraten,
- möglichst breite Spezifität zwecks Detektion weiterer Spaltprodukte.

Mit diesen Anti-Produkt-Antikörpern sollten in Festphasen-Immunoassays potenzielle Spaltprodukte der Hydrolyse von Arylcarbamatn und/oder Arylharnstoffen nachgewiesen werden. Der Nachweis des potenziellen Produktes kann in einem direkten katalytischen Bindungsassay mit adsorbiertem BSA-Substrat-Konjugat und Enzym-markierten Anti-Produkt-Antikörpern erfolgen.

Die Tatsache, dass keiner der Anti-ÜZA-Antikörper die potenziellen Spaltprodukte bindet und die Möglichkeit, kleine Mengen des durch die Hydrolyse entstehenden Spaltprodukts mit immunologischen Methoden nachzuweisen, begründeten die Versuche zur Generierung einer Reihe von Anti-Produkt-Antikörpern.

4.3.1 Antikörper gegen POCc10

Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen POCc10, das potenzielle Produkt der Hydrolyse von POCc12 und POCc20 – POCc26, erwies sich als kompliziert. POCc10 ist ein sehr kleines Hapten (MW 199). Die verwendeten Proteinkonjugate hatten eine hohe Haptendichte, so dass eine gute Immunantwort erwartet werden konnte. Der hohe Titer des Antiserums bestätigte den Immunisierungserfolg. Trotzdem konnten bei 4 Fusionen keine monoklonalen Antikörper selektiert werden. Erst der Einsatz eines geänderten Immunisierungsschemas führte zur Erzeugung monoklonaler Antikörper.

Die Charakterisierung dieser monoklonalen Antikörper ergab, dass sie keine weiteren potenziellen Produkte binden. Diese strenge Spezifität, die in vielen anderen Fällen erwünscht ist, war in diesem Fall von Nachteil. Die gewonnenen Antikörper konnten nicht zur Detektion der Hydrolyse derivatisierter Benzylamine oder weiterer Substrate ohne Chloracetylaminolinker eingesetzt werden. Mögliche Gründe für die starke Immunogenität des Chloracetylaminolinkers wurden in Kapitel 4.1 diskutiert.

Die gewonnenen Antikörper erkannten gelöstes POCc10 und reagierten nicht mit den Substraten. Die meisten IC_{50} -Werte lagen im mikromolaren Bereich (160 μ M für Antikörper N19-FE12 und N19-GH3). Die untere Nachweisgrenze für POCc10, die mit beiden Antikörpern erreicht werden konnte, lag bei 20 μ M bzw. bei 10 μ M, so dass die Affinität der Antikörper für den Aufbau eines Nachweistests für POCc10 ausreichen sollte.

4.3.2 Antikörper gegen POCc17

Monoklonale Antikörper gegen das Produkt POCc17 konnten nicht generiert werden.

4.3.3 Antikörper gegen H1

Auch monoklonale Antikörper gegen das Produktanalogon H1 konnten nicht generiert werden. Der Grund dafür liegt vermutlich in der großen Ähnlichkeit mit der Aminosäure Tyrosin. Dadurch kann keine Immunantwort ausgelöst werden.

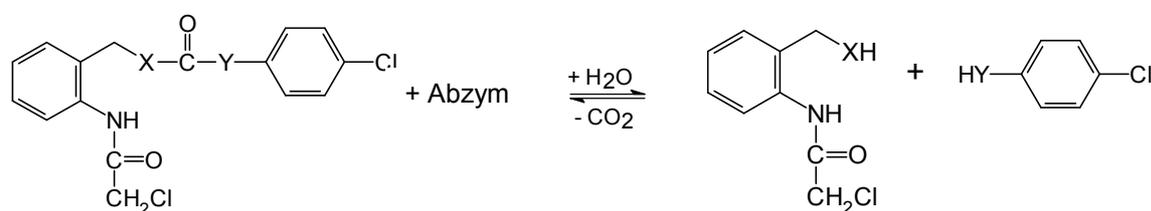
4.3.4 Antikörper gegen H6

Die Modifizierung von H1 zu H6 zwecks „Verfremdung“ für den Mausorganismus führte zur Erhöhung der Immunogenität und zur Selektion zahlreicher Antikörper. Alle Anti-H6-

Antikörper erkannten die 3,4-Dichlorfunktion. Da diese Funktion auch in einigen zur Spaltung vorgesehenen Herbiziden wie Diuron oder Linuron vorkommt, konnten diese Antikörper zum Aufbau eines immunologischen Nachweises nicht verwendet werden. Die Anti-H6-Antikörper erkannten zwar keine weiteren Substrate wie Diphenyl- oder Benzylphenylcarbamate oder –harnstoffe, reagierten aber auch nicht mit deren potenziellen Spaltprodukten. Die gewünschte breite Kreuzreaktivität mit weiteren Spaltprodukten wurde nicht erzielt. Daher konnten diese Antikörper nicht zum Nachweis der Produktentstehung verwendet werden.

4.4 Gewinnung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen ÜZA

Die Antikörper, die die ÜZA Hei3, OC4 oder OC7 binden, könnten die Hydrolyse von Arylcarbamaten oder Arylharnstoffen mit zwei aromatischen Ringen beschleunigen (Abb. 4.1):



Substrat	X	Y
OC2	NH	NH
POCc12	O	NH
POCc19	NH	O

Abb. 4.1: Reaktionen, die durch die gegen ÜZA Hei3, OC4 oder OC7 generierten Antikörper hydrolysiert werden könnten.

Hei3 und OC4 sind Phosphorsäurederivate mit tetraedrischer Struktur und einer negativen Ladung. Das ÜZA OC7 ist ein ungeladenes Analogon des hypothetischen Übergangszustandes der in Abb. 4.1 dargestellten Reaktionen. Die hergestellten Antikörper wurden auf Bindung des BSA-Konjugats dieses ÜZA selektiert und auf katalytische Aktivität getestet.

4.4.1 Antikörper gegen Hei3, OC4 und OC7

Die Bindungsspezifität der gegen Hei3 und OC4 gerichteten Antikörper wurde in einem Bindungsassay mit immobilisierten Protein-Hapten-Konjugaten ermittelt. Alle 11 Anti-Hei3-Antikörper erkennen OC4 und OC5. Hingegen erkennt nur einer der 6 Anti-OC4-Antikörper das immobilisierte Hei3 und ein anderer Antikörper das immobilisierte OC5. Hei3 und OC4 unterscheiden sich nur durch eine Methylengruppe (Tab. 2.5). Anscheinend ist dieser

Unterschied hier wesentlich, so dass eine Kreuzreaktivität nur „in der einen Richtung“ vorhanden ist – alle Anti-Hei3-Antikörper erkennen OC4, die Anti-OC4-Antikörper erkennen Hei3 nicht. Wahrscheinlich besitzt das größere OC4-Molekül genügend Flexibilität, um in die Anti-Hei3-Bindungstasche der Antikörper zu passen. OC4 und OC5 unterscheiden sich nur in der Position der kopplungsfähigen Aminogruppe. Die Position der Aminogruppe (*ortho*-Position bei OC4 und *para*-Position bei OC5) wirkt sich anscheinend nicht auf die Flexibilität des Moleküls aus. Daher wird OC5 auch von allen Anti-Hei3-Antikörpern gebunden. Die Anti-OC4-Antikörper sind spezifisch und zeigen keine Kreuzreaktivität mit OC5. Die Antigenbindungsstellen der Anti-Hei3- und Anti-OC4-Antikörper scheinen komplementär zu den negativ geladenen Hei3, OC4 und OC5 zu sein. Eine Erkennung des ungeladenen ÜZA OC7 erfolgte nicht.

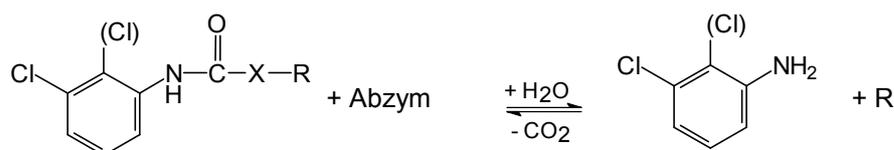
Die meisten der Anti-Hei3- und Anti-OC4-Antikörper erkennen auch die Substrate POCc12 und OC2. Wahrscheinlich ist eine genaue Übereinstimmung der chemischen Strukturen in diesen Fällen nicht zwingend notwendig. Vielmehr werden diese Substanzen aufgrund ihrer Flexibilität von den Antigenbindungsstellen etwa gleich gut erkannt.

Die überwiegende Anzahl der Anti-ÜZA-Antikörper erkennt nicht die potenziellen Spaltprodukte der Hydrolyse oder Spaltproduktanaloga. Demnach wird das Produkt nach Hydrolyse der Substrate freigesetzt und kann mit einer der zur Verfügung stehenden Methoden nachgewiesen werden.

Die Selektion von rekombinanten Antikörpern gegen die ÜZA lieferte keinen spezifischen Binder. Die Selektion eines rekombinanten Antikörpers gegen ein Hapten ist schwierig und nur in wenigen Fällen erfolgreich (Dr. Karl Krammer, TU München, persönliche Mitteilung). Der Erfolg, einen gewünschten Antikörper zu finden, hängt auch von der Diversität der Bibliothek ab und im Falle der Methode des Phagen Displays auch von der Expression in *E. coli*. Barbas et al. (1993) ist die Selektion mehrerer katalytischer F_{abs} gegen drei Haptene mit Hilfe eines Phagen Display aus einer halbsynthetischen humanen F_{ab} Bibliothek gelungen.

4.4.2 Antikörper gegen POCc14

Das ÜZA POCs14 ist eine ungeladene schwefelhaltige Verbindung mit einem aus 2 Methylengruppen und einer Carboxylgruppe bestehenden Linker. POCs14 wurde synthetisiert, um Antikörper zu gewinnen, die Phenylcarbamate wie Chlorpropham und Phenylharnstoffe wie Diuron hydrolysieren können (Abb. 4.2).



Herbizid	X	R
Diuron (2 x Cl)	N	(CH ₃) ₂
Chlorpropham (Cl)	O	CH(CH ₃) ₂

Abb. 4.2: Reaktionen, die potenziell durch die gegen ÜZA POCs14 generierten Antikörper hydrolysiert werden könnten.

Die Verwendung der Substanz POCs14 als Immunogen ergab keine monoklonalen Antikörper und keine messbare Immunantwort.

Die Kopplung an Trägerproteine erfolgte über die Carboxylgruppe im 2-Schritt-Verfahren über EDC/NHS. Die Kopplungsrate von 2 Molekülen POCs14 pro Molekül BSA war geringer als die mit anderen Haptenen erreichte Kopplungsrate (z.B. 9 Moleküle POCc9 pro Molekül BSA). Es kann angenommen werden, dass die sekundäre Aminogruppe des substituierten Sulfonamids POCs14 aufgrund der elektronenziehenden Wirkung der beiden Sauerstoffatome einen sauren Charakter annimmt und dadurch die Kopplungsrate drastisch herabgesetzt wird. Ein weiterer Grund könnte die Veränderung des pH-Werts in der wässrigen Lösung sein.

POCs14 erschließt als hypothetisches ÜZA eine andere Gruppe von Substraten - Arylcarbamate und Arylharnstoffe mit einem Phenylring, die auf Spaltung durch Abzyme getestet werden könnten. Es ist notwendig, die Versuche zur Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen POCs14 zu intensivieren. Der Einsatz ungeladener tetraedrischer ÜZA wurde beschrieben, die Erfolge sind jedoch, verglichen mit den negativ geladenen ÜZA, auf wenige Einzelfälle beschränkt (Kakinuma et al, 1999; Shokat et al., 1990). Es sollte überprüft werden, ob POCs14 durch Phosphor- oder Phosphonsäurederivate ersetzt werden kann.

4.5 Nachweis der hydrolytischen Aktivität der monoklonalen Antikörper gegen ÜZA

4.5.1 Nachweis der Substratabnahme mit dem Anti-Substrat-Antikörper B76-BF5

Der Kompetitionsassay zum Nachweis des POCc12-Abbaus war so aufgebaut, dass das Signal bei Abwesenheit von hydrolytischer Aktivität klein ist. Bei einer Hydrolyse von POCc12 wird weniger freies POCc12 vorhanden sein, das mit dem immobilisierten POCc12 konkurriert, so dass eine Erhöhung des Signals festzustellen sein sollte. In allen

durchgeführten Tests konnte keine Änderung des Signals gemessen werden. Eine erfolgreiche Katalyse (Substratspaltung) im direkten Bindungsassay mit immobilisiertem Protein-konjugiertem Substrat (BSA-POCc12) hätte durch Reduktion des Signals nachgewiesen werden können. Dieser Test ergab ebenfalls keine Signalunterschiede, die auf Antikörpereinfluss schließen ließen.

Das Substrat POCc12 wurde durch die von uns getesteten Antikörper im Kulturüberstand nicht hydrolysiert. Die negativen Testergebnisse wurden dahingehend interpretiert, dass unter Berücksichtigung der geringen Konzentration der potenziell katalytischen Antikörper im Kulturüberstand (10 bis 20 µg/ml) und der üblicherweise niedrigen Umsatzrate bekannter hydrolytischer Abzyme die verwendete Methode ungeeignet war, geringe Änderungen in der Substratkonzentration nachzuweisen. Es wurde geschlussfolgert, dass die vermeintlich katalytischen Antikörper in großen Mengen produziert, aufgereinigt und konzentriert im Test eingesetzt werden sollten.

Die chronologisch erst nach den Nachweisen der Katalyse mit Kulturüberständen ermittelte Kreuzreaktivität der Anti-ÜZA-Antikörper ergab, dass ein wesentlicher Teil dieser Antikörper (14 von 17 getesteten) die Substrate bindet. Dies bedeutet, dass die Substratmoleküle durch die vermeintlich katalytischen Antikörper „abgefangen“ werden und somit das sinkende oder steigende Signal falsch positiv als Folge einer Katalyse durch die Antikörper gewertet werden könnte. Dass dieser Effekt in den bereits durchgeführten Immunoassays nicht auftrat, lag vermutlich daran, dass die Konzentration der potenziell katalytischen Antikörper im Kulturüberstand sehr niedrig war und die Testbedingungen nicht ausgereift waren. Diese Erkenntnis führte dazu, dass die geplanten Katalysetests mit dem Nachweisantikörper B76-BF5 und gereinigten und aufkonzentrierten Anti-ÜZA-Antikörper nicht durchgeführt wurden. Statt dessen wurden weitere Katalysenachweismethoden etabliert.

Ein Immunoassay, basierend auf dem Katalysenachweis mit einem Anti-Substrat-Antikörper wurde bisher nicht beschrieben. Es wird generell bevorzugt das Produkt einer Reaktion nachgewiesen, da kleine Mengen einer neu entstehenden Substanz detektiert werden können. Eine nur schwache Abnahme der Substratkonzentration kann hingegen viel schwieriger eindeutig nachgewiesen werden.

4.5.2 Nachweis der Entstehung potenzieller Spaltprodukte

4.5.2.1 Detektion von POCc10 mit Anti-Produkt-Antikörpern

Ein empfindlicher Nachweis der potenziellen Spaltprodukte ist mit Hilfe eines indirekten Kompetitionsassays möglich.

Die Nachweismethode mit Dimethylaminozimtaldehyd ist für die Detektion der Spaltprodukte der selben Substratgruppe geeignet. Ein Vergleich der Nachweisgrenzen der DACA-Methode (10 μ M) und der immunologischen Tests ergab kaum Unterschiede. Da die Anti-POCc10-Antikörper keine Erhöhung der Sensitivität des Nachweises im Vergleich zum DACA-Test bieten und erste Tests keine befriedigenden Ergebnisse lieferten, wurde vorerst nur mit der DACA-Methode gearbeitet.

Die Detektion von Spaltprodukten mit immunologischen Methoden sollte weiter verfolgt werden. Allerdings müssten hierfür neue Anti-POCc10-Antikörper generiert werden. Aufgrund der Problematik mit dem Chloracetylaminolinker (Kapitel 4.1) ist es sinnvoller, Antikörper gegen *p*-Aminobenzylalkohol oder *m*-Aminobenzylalkohol zu generieren und die Aminogruppe als Linker zu benutzen.

Dass die immunologischen Methoden ein großes Potenzial zum Katalysennachweis haben, wird an folgenden Beispielen deutlich. Tawfik et al. (1993) wiesen hydrolytisch aktive Antikörper in Kulturüberständen nach. Eine Aufreinigung und Aufkonzentrierung der monoklonalen Antikörpern war für diesen Test nicht notwendig. Bei diesem sogenannten catELISA wird das immobilisierte Substrat (als Protein-Substrat-Konjugat) von einem katalytischen Antikörper (z.B. aus Kulturüberstand) umgesetzt. Anschließend wird das gebildete Produkt mit Hilfe eines markierten polyklonalen Anti-Produkt-Antikörpers gemessen.

Kompetitive Immunoassays mit polyklonalen Anti-Produkt-Antikörpern wurden erfolgreich zum Nachweis der Hydrolyse von Estern eingesetzt (Benedetti et al., 1998; Taran et al., 1999). In diesen Tests bindet das Produkt der katalysierten Reaktion an einen immobilisierten Anti-Produkt-Antikörper in Konkurrenz mit dem POD-markierten Produkt.

4.5.2.2 Detektion von Anilinen mit Dimethylaminozimtaldehyd

Mit Dimethylaminozimtaldehyd (DACA) wurde der Nachweis primärer aromatischer Aminogruppen durchgeführt. Diese entstehen, wenn durch die Hydrolyse Anilin oder substituierte Aniline frei werden. Die Optimierung der DACA-Methode führte zu einer Nachweisgrenze für *p*-Chloranilin von 10 μ M. Diese Nachweisgrenze wurde durch die

Verwendung einer gesättigten ethanolischen DACA-Lösung und einem 0,5 M Citronensäure-HCl-Puffer, pH 1,0 im Verhältnis 1:2:2 zum Antikörperinkubationsansatz erreicht.

Vor den eigentlichen Hydrolysemessungen wurden zum Ermitteln der Inkubationszeiten Messungen der Spontanhydrolyse vorgenommen. Es wurden nur ungefähre Halbwertszeiten ermittelt, da die Messungen nicht in temperierten Gefäßen, sondern bei Raumtemperatur stattfanden.

OC2 und POCC12 verfügen über eine Chloracetylaminogruppe als Linker für die Kopplung an Proteine. Die Amidbindung dieses Linkers könnte durchaus von hydrolytisch aktiven Antikörpern gespalten werden. Die freiwerdende primäre aromatische Aminogruppe würde ein Signal im DACA-Test geben. Um dies auszuschließen, wurde das potenzielle Spaltprodukt von OC2, POCC17, das auch eine Chloracetylaminogruppe an derselben Position hat, als Kontrolle geführt.

Nach Inkubation mit den Antikörpern wurde bei keinem der untersuchten Substrate eine Farbänderung zum Antikörper-freien Ansatz gemessen. Diese Tatsache läßt zwei Schlussfolgerungen zu:

1. Die vorhandenen vermeintlich katalytischen Antikörper hydrolysieren diese Substrate nicht.
2. Eine Antikörper-vermittelte Hydrolyse findet zwar statt, kann aber aufgrund der unzureichenden Sensitivität der Methode nicht detektiert werden.

Eine weitere Absenkung der Nachweisgrenze wurde jedoch nicht erreicht. Wahrscheinlich sind die Grenzen dieser Methode erreicht (Extinktionskoeffizient ca. 4×10^3), so dass die Entwicklung eines sensitiveren Nachweises für Anilin wünschenswert ist.

4.5.2.3 Detektion von Phenolen

4.5.2.3.1 Amperometrische Detektion von Phenolen

Phenol und *p*-Chlorphenol (pCP) als potenzielle Spaltprodukte wurden amperometrisch mit einem auf Tyrosinase basierenden Enzymsensor detektiert. Die untere Nachweisgrenze für pCP lag bei 1 μ M, für Phenol bei 3 μ M. Der Enzymsensor wurde nach jeder zehnten Messung neu kalibriert. Mit Hilfe der Kalibrationsgeraden wurden eventuelle Aktivitätsverluste (z.B. durch Inhibitionen) berücksichtigt. Meistens wurde eine Abnahme der Sensitivität des Sensors gegen Ende der Messungen festgestellt.

Diese Messmethode war aufgrund des überschaubaren Zeitaufwandes (pro Messung ca. 10 min) und des Fehlens von Interferenzen zwischen der Tyrosinase und den umgesetzten Substraten und weiteren Produkten für das Screening auf katalytische Aktivität geeignet.

Die Messungen in verschiedenen Puffern ergaben, dass die Substrate im sauren pH-Bereich eine extrem schnelle Spontanhydrolyse zeigten, so dass keine Messung möglich war. Im Bicin-Puffer, pH 8,5 fand eine messbare Spontanhydrolyse statt. Diese Tatsache ermutigte uns, die nachfolgenden Versuche in diesem Puffer durchzuführen, da eine geringe Aktivität des Antikörpers eher sichtbar geworden wäre. Getestet wurden alle gereinigten und aufkonzentrierten Anti-ÜZA-Antikörper mit den Substraten POCc18, POCc19, Substanz 27 und Substanz 3. Bei allen Messungen wurde ein irrelevanter Antikörper, der keine Kreuzreaktivität mit den ÜZA zeigte, als Kontrolle verwendet. Für die Katalysetests wurden, in Anlehnung an in der Literatur veröffentlichte Werte, Abzymkonzentrationen von 1 mg/ml (6,7 µM) gewählt. Die höchstmögliche Substratkonzentration lag bei 1 mM und ergab somit einen ca. 150fachen Überschuss des Substrats gegenüber dem Katalysator. Diese Konzentrationen wurden gewählt, damit eine Sättigung des Abzyms erreicht werden konnte.

Die Messungen mit den Antikörpern N1-BC1-D11, N1-FA7-D12 und N1-FA7- C4, generiert gegen das ÜZA Hei3, ergaben deutlich mehr entstandenes pCP im Vergleich zur Spontanhydrolyse. Der Antikörper R3-LG2-F9 führte nur bei Substanz 27 zur Entstehung eines Produkts (Phenol). Die Antikörper waren demnach katalytisch aktiv. Ein weiteres Substrat (das Diphenylcarbammat Substanz 3) wurde von keinem der katalytischen Antikörper hydrolysiert. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tab. 4.2 dargestellt.

Tabelle 4.2: Auf Katalyse getestete Anti-ÜZA-Antikörper

ÜZA	Hei3	OC4	OC7
spezifische monoklonale Antikörper	11	6	15
hydrolytisch aktive Antikörper	4	0	0

Anschließend wurden mit den Kulturüberständen der katalytischen Antikörper N1-BC1-D11, N1-FA7-D12 und N1-FA7- C4 Katalyse-Messungen mit POCc19 vorgenommen. Diese lieferten Werte, die sich ebenfalls deutlich von der Spontanhydrolyse unterschieden. Dies ließ den Schluss zu, dass diese Methode empfindlich genug ist, um die Hydrolyse von POCc19 mit Antikörpern im Kulturüberstand nachzuweisen.

Es stellte sich die Frage, ob eine Verunreinigung für die Katalyse verantwortlich ist. Sollte die Spaltung nicht durch Antikörper, sondern durch andere im Kulturüberstand enthaltene Proteine verursacht sein, so ist zu erwarten, dass irrelevante Kulturüberstände ebenfalls katalytische Aktivität zeigen. Die Messungen mit Kulturüberständen von irrelevanten Hybridomen ergaben keine Hinweise auf Hydrolyse über die Spontanhydrolyse hinaus. Alle hydrolytisch aktiven Antikörper gehören der Klasse IgG an. Alle Immunoglobuline der IgG-

Klasse wurden mit der gleichen Methode unter identischen Bedingungen aufgereinigt (Affinitätschromatographie an Protein A). Die Tatsache, dass alle IgG-Antikörper (auch die negativ auf Katalyse getesteten) nach dem selben Schema aufgereinigt wurden und das Fehlen einer katalytischen Aktivität in irrelevanten Kulturüberständen sprechen gegen die Aufkonzentrierung eines Fremdproteins mit hydrolytischer Aktivität. Die Homogenität der gereinigten Antikörper wurde durch SDS-PAGE bestätigt (Abb. 3.14). Auch die Tatsache, dass alle hydrolytisch aktiven Antikörper gegen eines der ÜZA selektiert wurden und dieses ÜZA die katalytische Aktivität hemmt (siehe auch Kapitel 3.6), spricht gegen eine Verunreinigung.

4.5.2.3.2 Detektion von Phenolen mit HPLC

Diese Methode bestätigte die hydrolytische Aktivität des Antikörpers N1-BC1-D11. Die 30minütige Inkubation des Abzyms mit 1 mM POCC19 führte zur Entstehung eines Peaks, dem das Spaltprodukt pCP eindeutig zugeordnet werden kann. Hiermit kann ausgeschlossen werden, dass Methodenfehler zu falschen Schlussfolgerungen bezüglich der Antikörpervermittelten Katalyse geführt haben.

Die Methode ist prinzipiell zum Screening auf katalytische Aktivität geeignet. Die Durchführung kinetischer Untersuchungen ist ohne weiteres nicht möglich, da eine Messung ca. 30 min. dauert.

4.6 Kinetische und thermodynamische Charakterisierung des hydrolytischen Antikörpers N1-BC1-D11

Für den katalytischen Antikörper N1-BC1-D11 wurden kinetische und thermodynamische Konstanten ermittelt. Es handelt sich dabei um erste Versuche, weshalb die ermittelten Werte als Grenzbereiche angesehen werden sollten.

Der optimale pH-Bereich für dieses Abzym liegt zwischen 6,9 und 8,5. In Bicin-Puffer, pH 8,0 wurden K_m von 210 μM und v_{max} von 3 mM/min errechnet. Die Wechselzahl k_{cat} betrug 222 min^{-1} , die Beschleunigungsrate ($k_{\text{cat}} / k_{\text{uncat}}$) betrug 10.

Ein Vergleich der Ergebnisse mit anderen Carbamat-hydrolysierenden Abzymen wurde in Tabelle 4.3 vorgenommen. Die bestimmten k_m -Werte sind bemerkenswert ähnlich. Der k_{cat} -Wert unseres Antikörper ist um einige Größenordnungen grösser. Die von uns erreichte Beschleunigungsrate ist gering. Erklärungen dafür erwarten wir aus der Aufklärung der Struktur der Antigenbindungsregion des Abzyms.

Tabelle 4.3: Carbamat-hydrolysierende Abzyme mit wichtigen Parametern

Antikörper	Autor	k_m , [μM]	k_{cat} [min^{-1}]	$k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$ (Beschleunigungsrate)	K_D , [M]
33B4F11	Van Vranken et al., 1994	5,5	1,5	260	-
EA11-D7	Wentworth et al., 1996	201	1,88	3 Subst.mol./AG-Bindungsstelle und h	5×10^{-9}
DF8-D5	Wentworth et al., 1997	120	18	3×10^3 bis $1,2 \times 10^6$, abh. von Phenolsubstitution	-
ST51	Dinaut et al., 2000	260	$1,5 \times 10^{-3}$	$6,5 \times 10^3$	-
N1-BC1-D11	eigene Ergebnisse	210	222	10	$2,6 \times 10^{-9}$

Weitere Untersuchungen an N1-BC1-D11 ergaben, dass Hei3 ein kompetitiver Inhibitor ist. Die Bindung von Hei3 in der Antigenbindungsstelle und der gleichzeitige Verlust der hydrolytischen Aktivität ist ein Beweis dafür, dass die Katalyse in der Antigenbindungsstelle abläuft. Es wurde ebenfalls eine Inhibition durch das ÜZA OC4 festgestellt. Dies steht im Einklang mit der Kreuzreaktivität der Anti-Hei3-Antikörper (darunter auch N1-BC1-D11) mit OC4. Die gewonnenen Messdaten erlaubten jedoch keine Bestimmung der Inhibitions-konstanten (k_i).

Es lässt sich schlussfolgern, dass eine genaue Übereinstimmung der chemischen Strukturen zwischen Substrat und ÜZA in diesen Fällen nicht zwingend notwendig ist. Vielmehr sollte die Flexibilität dieser Substanzen und der Antigenbindungsstelle eine Erkennung ermöglichen.

Unsere Resultate belegen, dass das durch die Spaltung von POCc19 entstehende pCP selbst zu keiner Produktinhibition des Abzyms N1-BC1 führt. Das gemessene Signal entspricht der absoluten Konzentration von pCP bei verschiedenen Substratkonzentrationen. Würde eine Inhibition stattfinden, so wäre das Signal des entstehenden pCP bei steigender Substratkonzentration geringer als das Signal der entsprechenden absoluten pCP-Konzentration.

Steigende Abzymkonzentrationen führten zum proportionalen Anstieg der Umsatzgeschwindigkeit.

All diese Aussagen sind typisch für Michaelis-Menten-Enzyme und treffen auch auf andere Abzyme zu (Janda et al., 1991; Ersoy et al., 1996). Bei dem von Wentworth et al. (1996) beschriebenen Carbamat-spaltenden Antikörper EA11-D7 wurde ebenfalls eine lineare Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit von der Konzentration des Abzyms und eine stöchiometrische Inhibition durch das ÜZA festgestellt.

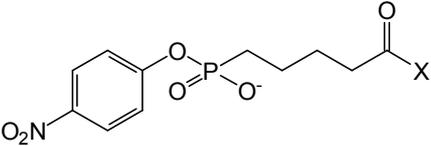
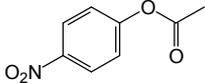
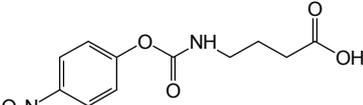
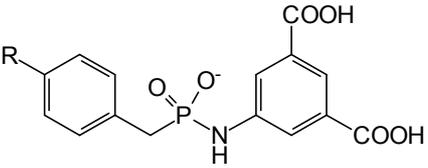
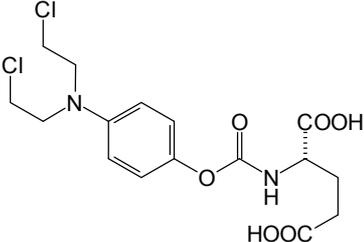
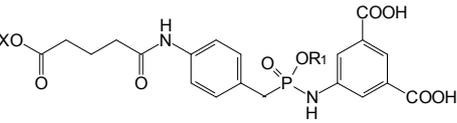
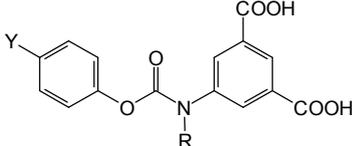
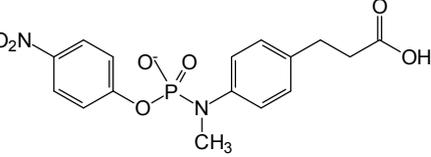
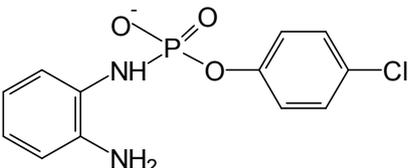
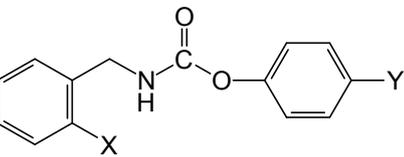
Die ermittelten thermodynamischen Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (K_D -Werte) unserer Antikörper liegen im nanomolaren bis subnanomolaren Bereich (0,9 bis 2,6 für Hei3; 4,6 bis 13 für OC4) und bestätigen eine starke Affinität des Anti-ÜZA-Antikörpers zum ÜZA. Aus Tab. 4.3 kann der K_D -Wert des Antikörpers EA11-D7 entnommen werden (Wentworth et al., 1996).

Der von Hilvert et al. (2000) generierte esterolytische Antikörper 48G7 hat einen K_D -Wert von 4,5 nM. Der K_D -Wert des entsprechenden Keimbahn-Antikörpers ist 135 μ M. Bekannterweise steigt mit Erhöhung der Affinität zum ÜZA die katalytische Aktivität. Ein Vergleich von k_{cat}/k_{uncat} und K_m/K_i zeigt, dass bei Erhöhung der Affinität des Abzyms für das ÜZA (k_i wird dabei kleiner) proportional nur ein kleiner Teil der Bindungsenergie zur Stabilisierung des Übergangszustandes benutzt wird (Stewart and Benkovic, 1995). Die 30.000fache Erhöhung der Affinität von Keimbahn- zum gereiften Antikörper führt lediglich zu einer 82fachen Erhöhung von k_{cat}/k_m . MacBeath and Hilvert (1996) regen deshalb an, die Strategie zur Selektion katalytischer Antikörper zu ändern. Statt einer Selektion auf Affinität gegen ein üblicherweise nicht perfektes ÜZA sollte direkt auf Katalyse selektiert werden.

Es wurden bisher mehrere Möglichkeiten zur Verbesserung der katalytischen Aktivität beschrieben. Die bekannten Abzyme verfügen im Allgemeinen über eine niedrige Beschleunigungsrate. Die für unsere Abzyme ermittelte Beschleunigungsrate ist ebenfalls niedrig. Ein Vergleich mit Literaturdaten ist nicht möglich, da keine Benzylphenylcarbamatspaltenden Antikörper bisher beschrieben worden sind. Die gezielte Mutagenese sollte als eine Möglichkeit zur Optimierung der vorhandenen Abzyme benutzt werden.

In der Tabelle 4.4 sind alle bis jetzt veröffentlichten Carbamat-spaltenden Antikörper zusammengefasst.

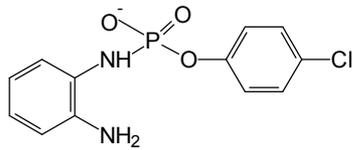
Tabelle 4.4: Carbamat-hydrolysierende Abzyme mit ÜZA und Substraten

Autor/Antikörper	ÜZA	Substrate
Van Vranken et al., 1994/ 33B4F11	 <p>Phosphonsäureester</p>	 <p>4-Nitrophenylacetat</p>  <p>Carbamat</p>
Wentworth et al., 1996/ EA11-D7	 <p>Phosphonsäureamid</p>	 <p>Carbamatderivat des L-Glutamats</p>
Wentworth et al., 1997/ DF8-D5	 <p>Phosphonsäureamid</p> <p>R₁=Et, X=Succinimidyl R₁=H, X=Succinimidyl</p>	 <p>R=H, Y=Br R=H, Y=F R=H, Y=H R=H, Y=OMe</p> <p>Diphenylcarbamat</p>
Dinaut et al. , 2000/ ST51	 <p>Phosphorsäureamid</p>	 <p>N-Methylcarbamat</p>
unsere Ergebnisse/ N1-BC1-D11	 <p>Phosphorsäureamid</p>	 <p>X=NH₂; Y=Cl – POCc18 X=NHCOCH₂Cl; Y=Cl – POCc19 X=H; Y=H - Subst. 27</p> <p>Benzylphenylcarbamate</p>

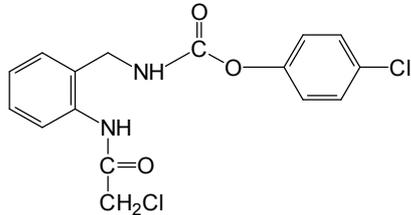
Die Mehrzahl der zur Hydrolyse von Arylcarbamaten verwendeten ÜZA sind Phosphonsäurederivate. Ein einziges Phosphorsäureamid wurde als ÜZA eingesetzt und dieses ist im Unterschied zu Hei3 an der Amidfunktion Methyl-substituiert. Für unsere Zwecke wurde ein Phosphorsäureamid ausgewählt, da es in Analogie zu Carbamaten und Harnstoffen zwei Heteroatome am Carbonylkohlenstoff hat. Die Phosphonsäurederivate verfügen über ein Heteroatom am Carbonylkohlenstoff. Seine Struktur ist analog der von Estern und Amiden. Ein weiterer Unterschied zwischen Hei3 und den veröffentlichten ÜZA besteht in der Position des Linkers. In allen veröffentlichten Arbeiten befindet sich der Linker in *para*-Stellung zur Carbamatfunktion. Bei Hei3 und OC4 befindet sich der Linker dagegen in *ortho*-Stellung. Dies wurde bereits ausführlich im Kapitel 4.1 als möglicher Grund für die grosse Anzahl zunächst selektierter Linker-spezifischer Antikörper diskutiert.

Der Vergleich der Struktur unserer Substrate mit der anderer veröffentlichter Substrate ergab große Unterschiede. Die bisher bekannten Abzyme hydrolysieren Diphenylcarbamate. Abzyme, die wie unsere Benzylphenylcarbamate hydrolysieren, sind in der Literatur nicht beschrieben. Unsere Antikörper spalten vermutlich keine Diphenylcarbamate. Eine Antikörper-vermittelte Hydrolyse der Substanz 3 konnte weder mit Dimethylaminozimtaldehyd, noch mit dem Tyrosinase-Sensor gemessen werden. Die nicht Halogen-substituierte Substanz 6 (Tab. 2.1B) wurde ebenfalls nicht hydrolysiert. Um eine endgültige Aussage diesbezüglich treffen zu können, ist jedoch die Überprüfung der Hydrolyse weiterer Diphenylcarbamate erforderlich.

Das ÜZA Hei3 wurde hinsichtlich seiner Konformation mit dem Substrat POCc19 von Dr. Bernd Kallies, Lehrstuhl für Physikalische Chemie der Universität Potsdam, verglichen. In Bezug auf die Verwendung von Benzylphenylcarbamaten, die um eine Methylengruppe länger als die Diphenylcarbamate sind, hat sich gezeigt, dass die jeweiligen Vorzugskonformationen gut miteinander zur Deckung gebracht werden können (Abb. 4.3).



Derivat des ÜZA Hei3
(mit Chloracetylamino- statt Aminogruppe, grün)



Substrat POCc19, (rot)

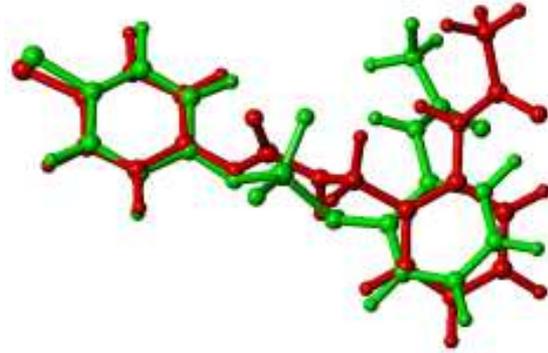
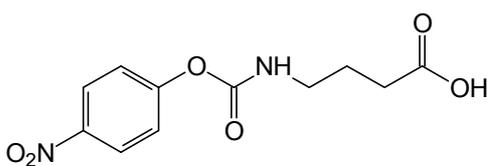


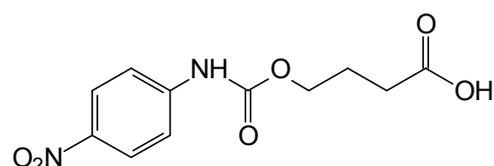
Abb. 4.3: Vorzugskonformationen eines Derivates des ÜZA Hei3 und des Substrats POCc19

Die katalytischen Antikörper haben eine strenge Spezifität zu den Benzylphenylcarbamaten mit *p*-Chlorphenol (z.B. POCc19) oder Phenol als Abgangsgruppe. Benzylphenylcarbamate mit *p*-Chloranilin als Abgangsgruppe (z.B. POCc12) wurden bisher nicht hydrolysiert. Das immobilisierte BSA-POCc12-Konjugat wurde jedoch von den katalytischen Antikörpern gebunden.

Die Arbeitsgruppe von P. G. Schultz beschrieb ein Abzym (33B4F11), das das folgende Carbamat **1** spaltet (k_m 5,5 μM , k_{cat} 1,5 min^{-1} , Beschleunigungsrate 260), aber nicht in der Lage ist, das Carbamat **2** zu spalten (Abb. 4.4; Van Vranken et al., 1994).



1



2

Abb. 4.4: Chemische Formel der von van Vranken et al. (1994) auf Katalyse durch Antikörper getesteten Substrate.

Das Abzym spaltet anscheinend die Acyl-Stickstoff-Bindung und sichert den Abgang des Nitrophenols. Wird der Sauerstoff am Phenyl durch Stickstoff ersetzt, so erfolgt keine Spaltung. Die Autoren vermuteten, dass am Antikörper eine Säuregruppe fehlt, die fähig wäre, die Hydrolyse zu ermöglichen. Eine Einschränkung in der Konformation könnte ebenfalls der Grund für diese negativen Ergebnisse sein.

Die von Schultz et al. verwendeten Carbamate sind bezüglich der Carbamat-Gruppierung unseren Substraten POCc19 und POCc12 ähnlich (Abb. 4.5).

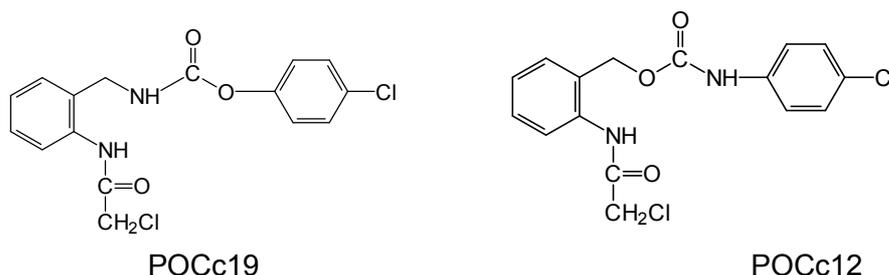


Abb. 4.5: Chemische Formel der von uns auf Katalyse durch Antikörper getesteten Substrate POCc19 und POCc12.

Ob die generierten katalytischen Antikörper POCc12 nicht hydrolysieren können oder mit den entwickelten Methoden ein Nachweis der Katalyse nicht gelang, ist schwer zu sagen. Die oben beschriebenen Experimente lassen jedoch eher den Schluss zu, dass die für POCc19 katalytischen Antikörper nicht in der Lage sind, die Aryl-Stickstoff-Bindung in POCc12 zu spalten. Eine Aussage diesbezüglich könnte nach der Aufklärung der Kristallstruktur unseres Abzyms N1-BC1 gewonnen werden. Auch eine empfindlichere Nachweismethode für Anilin würde unter Umständen eine Aussage zur Hydrolyse ermöglichen.

Unsere Arbeiten unterstützen den Befund, dass Haptene, die zur Gewinnung von Abzymen mit Erfolg eingesetzt werden sollen, zwei Bedingungen erfüllen müssen:

- a) Vorhandensein eines elektrostatischen Potentials am Reaktionszentrum und
 - b) Imitation der dreidimensionalen Gestalt des Substrats,
- um entsprechend dem Komplementaritätsprinzip die Selektion von Antikörpern mit katalytisch wirkenden Aminosäureseitenketten im aktiven Zentrum zu ermöglichen.

Eine praktische Anwendung der katalytischen Antikörper in der Analytik von Arylcarbamat- und Arylharnstoff-Herbiziden wird angestrebt. Ein Biosensor, aufgebaut auf der Basis hydrolytischer Antikörper, braucht im Unterschied zu einem Biosensor auf Basis bindender Antikörper nicht regeneriert zu werden. Aufgrund der „Selbstreinigung“ sollte ein mehrmaliger Einsatz des Biosensors ohne weiteres möglich sein.

4.7 Hydrolysemechanismus bei Carbamaten und Harnstoffen

Die vollständige Hydrolyse von Carbamaten in die Produkte Kohlensäure, Amin und Alkohol in wässrigen Medien verläuft prinzipiell in zwei aufeinanderfolgenden Hydrolyseschritten. Bei der überwiegenden Mehrzahl von Carbamaten erfolgt im ersten Schritt die Abspaltung der Alkoholkomponente, wobei Carbaminsäure entsteht. Liegt diese in neutralem bis saurem

Milieu protoniert vor, wird sie anschließend schnell zu Kohlensäure und Amin hydrolysiert. Unter diesen Bedingungen ist die Abspaltung der Alkoholkomponente der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamthydrolyse. Dieser kann entweder, wie bei den meisten Estern und Amiden, nach einem Additions-Eliminierungsmechanismus unter Ausbildung eines tetraedrischen Zwischenprodukts (AE-Mechanismus, Weg 2 in Abb. 4.6) oder nach einem Eliminierungs-Additionsmechanismus (EA-Mechanismus, Weg 1 in Abb. 4.6) ablaufen (Bender, 1951; Farlow and Moodie, 1971).

Carbamate mit aliphatischer Alkoholkomponente reagieren im Allgemeinen nach einem AE-Mechanismus mit geschwindigkeitsbestimmender Addition. Dagegen werden Carbamate mit phenolischer Alkoholkomponente in Wasser bevorzugt nach einem EA-Mechanismus hydrolysiert, bei dem im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt ein Isocyanat als Zwischenprodukt gebildet wird. Dieser Mechanismus ist zusätzlich an das Vorhandensein einer ionisierbaren NH-Gruppe an der Amidfunktion gebunden (Wentworth et al., 1997). Carbamate aus sekundären Aminen reagieren auch bei Vorhandensein einer guten alkoholischen Abgangsgruppe nach einem AE-Mechanismus.

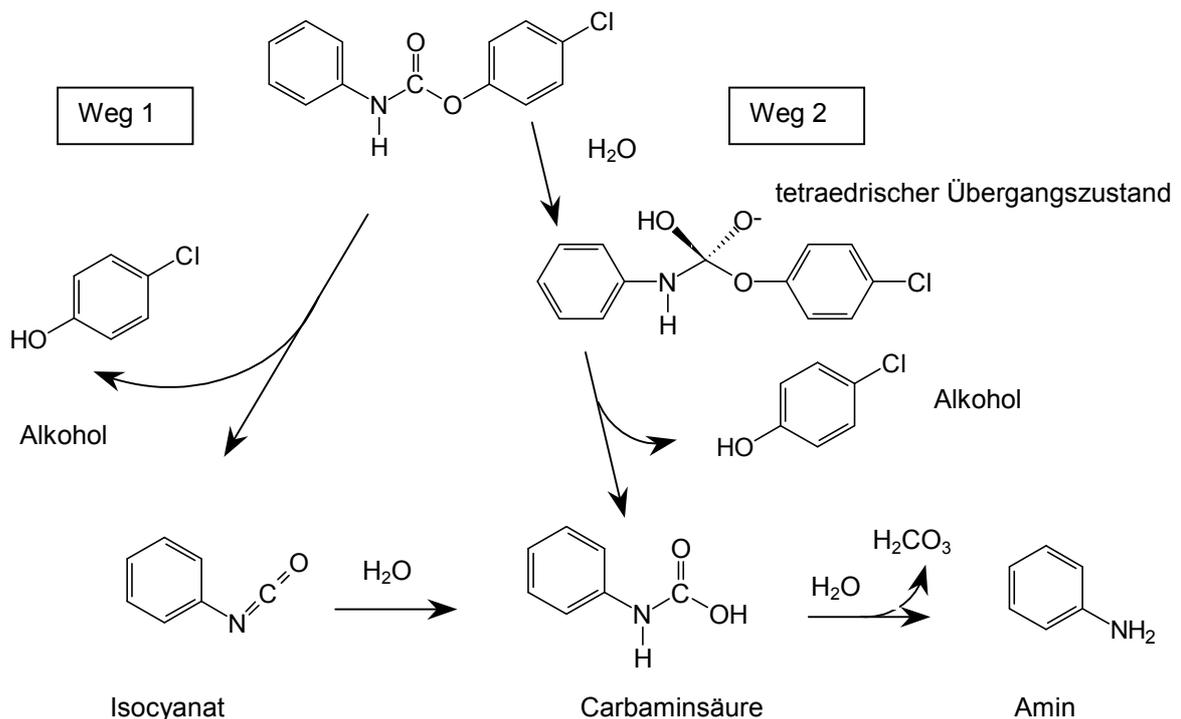


Abb. 4.6: Mögliche Hydrolysemechanismen für Carbamate und Harnstoffe, dargestellt am Beispiel eines Benzylphenylcarbamates

Zusammengefasst ergeben sich für Carbamate und Harnstoffe folgende prinzipielle Katalysiermöglichkeiten:

- Protonierung der Abgangsgruppe (immer)

- Deprotonierung einer NH-Gruppe (Eliminierung-Addition)
- Protonierung von C=O (Addition-Eliminierung)
- Aktivierung von Wasser (immer)

Aus den möglichen Hydrolysemechanismen bei Carbamaten lassen sich die folgenden zwei prinzipiellen Strukturen für aktive Zentren von heterogenen Katalysatoren ableiten (Abb. 4.7):

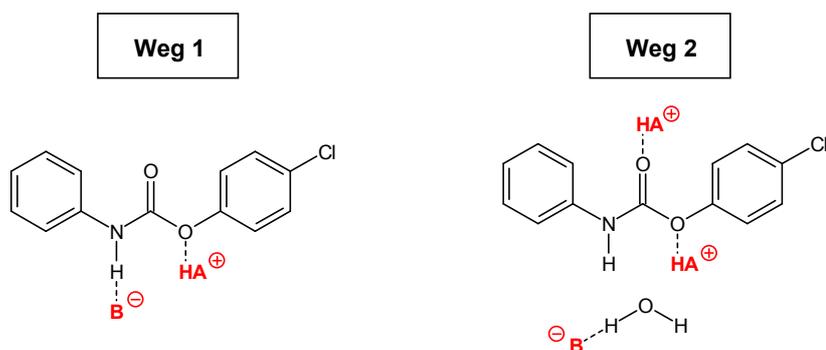


Abb. 4.7: Potenzielle aktive Gruppen im aktiven Zentrum von heterogenen Katalysatoren

Ein Additions-Eliminierungsmechanismus (Weg 2) ist in der Regel bereits bei Vorhandensein einer sauren (positiv geladenen) Aminosäureseitenkette katalysierbar, an die der Carbonylsauerstoff des Substrats bindet. Die bisher bekannten Raumstrukturen von katalytischen Antikörpern mit Esteraseaktivität zeigen alle eine solche Struktur (Seitenketten von Arg, Lys, Tyr, „Backbone“-NH; MacBeath and Hilvert, 1996; Hilvert, 2000). Die Vermutung liegt nahe, dass diese Struktur durch die Verwendung von Phosphor- oder Phosphonsäurederivaten als ÜZA selektiert wird. Eine saure Seitenkette zur Protonierung der Abgangsgruppe zur Erleichterung des Eliminierungsschrittes wurde nur im Falle des Antikörpers 17E8 nachgewiesen, der eine ungewöhnlich hohe Aktivität bei der Hydrolyse von nicht aktivierten Phenylestern aufweist (MacBeath and Hilvert, 1996). Eine Struktur, die zur Aktivierung des Nucleophils befähigt ist, ist in esterolytischen Antikörpern bisher nicht sicher identifiziert worden. Sie ist nur aus entsprechenden natürlichen Enzymen (z.B. in Gestalt der Ser-His-Asp-Triade von Serinproteasen) bekannt.

Welcher Mechanismus bei der Spaltung der Carbamat- und Harnstoff-Herbizidderivate abläuft, ist schwer vorauszusagen und muss im Einzelfall geklärt werden. Der derzeitige Kenntnisstand erlaubt keine genaue Aussage. Die Aufklärung der Kristallstruktur sowie weitere kinetische Untersuchungen mit verschiedenen Substraten werden möglicherweise dazu Erkenntnisse liefern. Es sollte unter anderem auch geprüft werden, ob diese Carbamat-spaltenden Abzyme auch Ester und Amide spalten.

Quantenchemische Untersuchungen zum Effekt der Protonierung des Carbonylsauerstoffs verschiedener Carbonsäurederivate haben gezeigt, dass neben der katalytischen Erhöhung der Nucleophilie des Reaktionszentrums auch ein zweiter, antikatalytischer Effekt diskutiert werden muss. Carbonsäurederivate sind an der Carbonylgruppe resonanzstabilisiert. Diese Stabilisierung ist bei Amiden höher als bei Estern. Bei Protonierung des Carbonylsauerstoffs wird sie zusätzlich erhöht. Da bei einem AE-Mechanismus im Additionsschritt diese Resonanzstabilisierung aufgehoben werden muss, liegt die Vermutung nahe, dass Carbonsäurederivate, die eine hohe Protonenaffinität am Carbonylsauerstoff zeigen, durch Protonierung eher inaktiviert als aktiviert werden. Diese Eigenschaft kann z.B. für die zunehmende Hydrolysestabilität in der Reihe Ester < Amide < Carbamate < Harnstoffe verantwortlich gemacht werden (Kallies, 1996).

Diese Befunde waren im Rahmen dieses Projektes auch der Anlass für die Suche nach alternativen Katalysemöglichkeiten für die Carbamathydrolyse. Eine solche Alternative ergibt sich bei Betrachtung des EA-Mechanismus. Hier sollte die Bildung des Isocyanat-Zwischenproduktes durch Protonierung der Abgangsgruppe und Deprotonierung der NH-Funktion katalysierbar sein. Ein katalytisch aktives Zentrum sollte dazu eine zwitterionische Struktur aufweisen. Ein entsprechendes ÜZA muss dazu komplementär sein, also ebenfalls eine zwitterionische Struktur aufweisen oder zumindest H-Brückenakzeptor- und -donorfunktionen haben. Eine entsprechende Struktur wiesen das ÜZA OC7 sowie das schwefelhaltige ÜZA POCs14 auf.

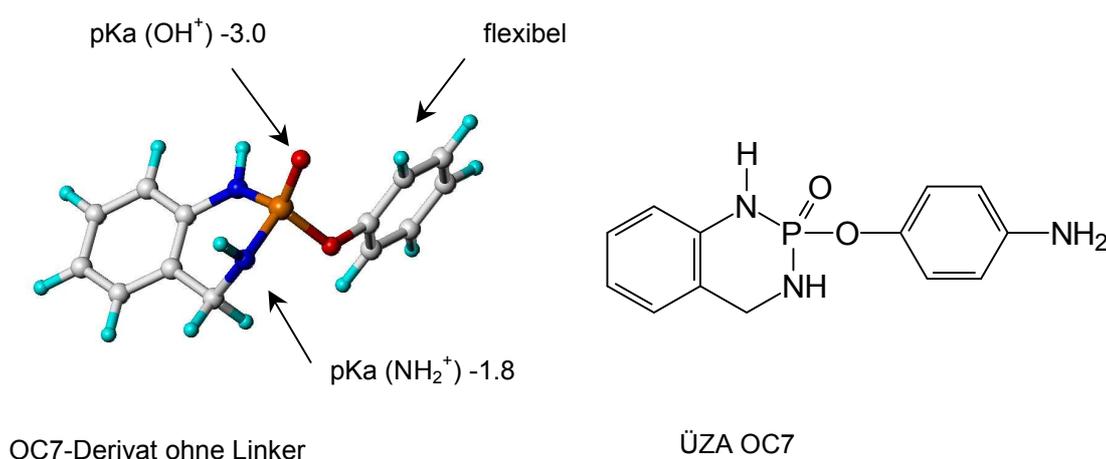


Abb. 4.8: Chemische Formel des ÜZA OC7 und Vorzugskonformation eines Derivates des ÜZA OC7. Die Pfeile zeigen die H-Brückendonor- und -akzeptorfunktionen.

Das ÜZA OC7 erscheint aufgrund des Vorhandenseins von H-Brückendonor- und -akzeptorfunktionen gut zur Selektion einer komplementären Antigenbindungsstelle geeignet (Abb. 4.8).

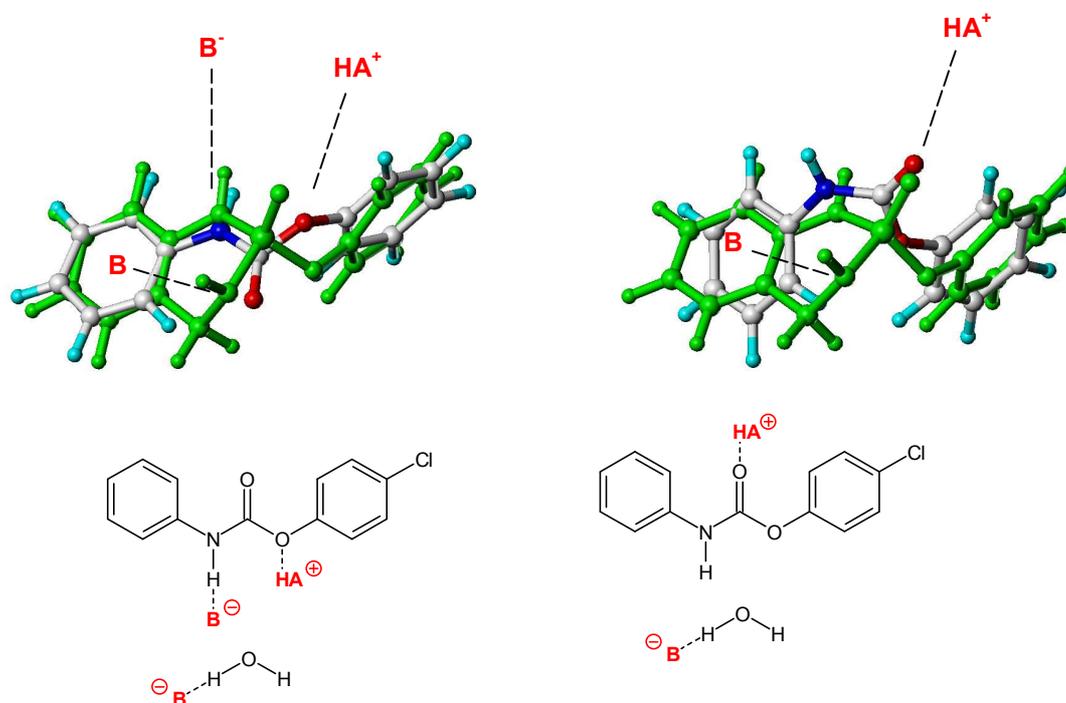


Abb. 4.9: Mögliche Bindungsmodi eines Diphenylcarbamats

Abb. 4.9 zeigt mögliche Überlagerungen der Kernstruktur des ÜZA OC7 und eines entsprechenden Diphenylcarbamats sowie zur Struktur des ÜZA komplementäre katalytisch aktive Gruppen. Die P=O-Funktion des ÜZA sollte bei gut bindenden Antikörpern eine komplementäre saure Aminosäureseitenkette (allg. HA^+) selektieren. Die Aminogruppen des ÜZA könnten komplementäre basische Gruppen (allg. B^-) bedingen. Die Benzenringe des ÜZA sollten zur Selektion von Regionen im aktiven Zentrum des Antikörpers dienen, die für die Erkennung von Diphenylcarbamaten geeignet sind. Die in Abb. 4.9 gezeigten Bindungsmodi gehen davon aus, dass die Phenylringe eines Diphenylcarbamats an den gleichen Stellen gebunden werden wie die Benzenringe des ÜZA. Im links dargestellten Bindungsmodus bindet der Estersauerstoff des Substrats an HA^+ des Antikörpers. Das Wasserstoffatom der NH-Gruppe des Substrats könnte an eine Gruppe B^- gebunden werden. Dieser Modus könnte einen Eliminierungs-Additionsmechanismus der Hydrolyse entsprechend Abb. 4.6 (Weg 1, vgl. Abb. 4.7) katalysieren. Im alternativen Bindungsmodus (Abb. 4.9 rechts) bindet der Carbonylsauerstoff des Substrats an HA^+ . Damit wäre ein Additions-Eliminierungsmechanismus entsprechend Abb. 4.6 (Weg 2, vgl. Abb. 4.7) katalysierbar. In beiden Bindungsmodi wird eine Gruppe B^- nicht durch das Substrat besetzt.

Diese könnte bei entsprechender Basizität als Basenkatalysator im Sinne der Aktivierung von Wasser als Nucleophil fungieren. Diese Überlegungen stellen Hypothesen dar, die durch Prüfung der Hydrolyse von allen vorhandenen Diphenylcarbamaten (Tab. 2.1) mit den Anti-OC7-Antikörpern geprüft werden sollten. Die bisher vorliegenden Ergebnisse mit den Diphenylcarbamaten Substanz 3 und Substanz 6 erlauben keine positive Aussage.

4.8 Urease

Harnstoff ist eine häufig vorkommende Verbindung in der lebenden Welt. Arylharnstoffe sind hingegen ohne biologische Relevanz für den Metabolismus. Ihre weite Verbreitung als Xenobiotika bestimmt jedoch ihre Forschungsrelevanz. Das ursprüngliche Ziel des Projektes „Katalytische Antikörper“ bestand in der Generierung von Abzyme gegen solche Arylharnstoffe.

Die einzige bekannte Gruppe von Enzymen, die in der Lage sind, Harnstoff zu spalten, sind die Ureasen (Harnstoff Amidhydrolase, E.C. 3.5.1.5). Ureasen sind in Bakterien, Pilzen, Pflanzen (Sojabohnen, Schwertbohnen) und wirbellosen Tieren zu finden. Die Ureasen besitzen eine hohe Beschleunigungsrate (10^{14} -fache Beschleunigung gegenüber der unkatalysierten Reaktion, $k_{\text{cat}} = 10^4 \text{ s}^{-1}$) und eine große Spezifität (Karplus and Pearson, 1997). N-substituierte Harnstoffe oder Thiolharnstoff werden als Substrate nicht akzeptiert. Bisher sind keine natürlichen Enzyme bekannt, die solche Verbindungen spalten können. Die Urease spaltet nach dem Additions-Eliminierungsmechanismus mit Bildung eines tetraedrischen Übergangszustands, wobei Ammoniak und Carbamat, das später unkatalysiert zu Ammonium und Carbonat zerfällt, entstehen (Benini et al., 1999). Das aktive Zentrum verfügt über zwei Nickelatome, die Wasser und den Carbonyl-Sauerstoff des Substrats binden. Durch Bindung von Wasser an Übergangsmetallionen wird dessen Acidität erhöht. Bei Vorhandensein von Hilfsbasen, die Protonen von komplex gebundenen Wassermolekülen akzeptieren können, werden so reaktive Nucleophile erzeugt. Die Bindung des Carbonylsauerstoffs an ein Übergangsmetallion hat prinzipiell den gleichen katalytischen Effekt wie dessen Protonierung.

Die Urease verfügt über eine schmale solvatisierte Bindungstasche, welche nach Bindung des Substrats mit einem „Deckel“ wie ein Eppendorfgesäß verschlossen wird (Karplus and Pearson, 1997; Benini et al., 1999). Die strenge Substratspezifität wird durch die Größe der Bindungstasche bedingt - einmal durch die Notwendigkeit der Schließung des „Deckels“ und durch die Wasserstoff-Brückenbildung mit Histidin 320, welches als basische Gruppe agiert. Der Deckel (für Urease aus *Klebsiella aerogenes* sind es die Aminosäuren 317 bis 334) ist nur während der Bindung des Übergangszustandes geschlossen.

Hier wird deutlich, dass bei der Generierung katalytischer Antikörper mehrere Probleme gelöst werden müssen. Eine Nachbildung des Mechanismus der Urease würde neben der Selektion bestimmter Aminosäuren in der Antigenbindungsregion möglicherweise auch eine Beteiligung von Metallionen erfordern.

4.9 Ausblick

Aufbauend auf die erhaltenen Resultate, ergeben sich folgende zukünftige Aufgabenstellungen:

1. Überprüfung, inwieweit kommerzielle Carbamat-Herbizide wie Medipham und Desmedipham und Harnstoff-Herbizide durch die etablierten Abzyme oder Anti-ÜZA-Antikörper hydrolysiert werden können. Nachweis, ob weitere Substrate, insbesondere Ester, Amide und Diphenylcarbamate, durch die etablierten Abzyme oder vorhandene Anti-ÜZA-Antikörper hydrolysiert werden können. Aus diesen Ergebnissen ließen sich wahrscheinlich Schlussfolgerungen ziehen, ob OC7 tatsächlich ein mögliches ÜZA dieser Hydrolysereaktion ist. Die dabei zu verwendenden Methoden könnten HPLC und die Dimethylaminozimtaldehyd-Methode sein.
2. Entwicklung besserer Nachweismethoden für Anilin und substituierte Aniline, die über eine niedrige Nachweisgrenze und hohen Probendurchsatz verfügen. Generierung weiterer hochaffiner und kreuzreagierender Anti-Produkt-Antikörper zur Entwicklung eines catELISA für die spezifische Selektion von Abzym-produzierenden Hybridomen.
3. Ermittlung der Aminosäuresequenz und Aufklärung der Kristallstruktur des katalytischen Antikörpers N1-BC1-D11, um Hinweise auf den Mechanismus der Hydrolyse zu erhalten. Mutagenese der Antigenbindungsstelle zur Klärung des Mechanismus der Hydrolyse.
4. „*in vitro* – Evolution“ und Mutagenese der Antigenbindungsstellen zur Erhöhung der Katalyserate.
5. Design und Synthese weiterer ÜZA insbesondere zur Hydrolyse von Harnstoff-Herbiziden und –Herbizidderivaten.
6. Aufbau eines noch empfindlicheren Nachweistests für Diuron mit den vorhandenen Antikörpern oder ihren Fragmenten.
7. Klonierung und Expression von scFv der Anti-Diuron-Antikörper B91-KF5 und B91-CG5. Herstellung transgener Pflanzen mit Herbizidtoleranz.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, katalytische Antikörper zur Hydrolyse von Benzylphenylcarbamaten sowie zahlreiche monoklonale Antikörper gegen Haptene herzustellen. Abzyme, die Benzylphenylcarbamate hydrolysieren, sind bisher nicht beschrieben worden.

Die für die Untersuchungen erforderlichen Substanzen, einschließlich der Übergangszustandsanaloga, wurden von Mitarbeitern der Institute für Chemie der Universität Potsdam zur Verfügung gestellt.

Es wurden verschiedene Hapten-Protein-Konjugate unter Verwendung unterschiedlicher Kopplungsmethoden hergestellt. Die Konjugate wurden charakterisiert. Zur Generierung der hydrolytisch aktiven Antikörper wurden Inzuchtmäuse mit KLH-Konjugaten von Übergangszustandsanaloga (ÜZA) immunisiert. Zum Einsatz kamen vier ÜZA (Hei3, OC4, OC7 und POCs14). Mit Hilfe der Hybridomtechnik wurden verschiedene monoklonale Antikörper gegen diese ÜZA gewonnen. Dabei wurden sowohl verschiedene Immunisierungsschemata als auch verschiedene Inzuchtmausstämme und Fusionstechniken verwendet. Insgesamt wurden 11 monoklonale Antikörper gegen Hei3, 6 monoklonale Antikörper gegen OC4 und 15 monoklonale Antikörper gegen OC7 selektiert. Diese Antikörper wurden in großen Mengen hergestellt und aufgereinigt.

Zum Nachweis der Antikörper-vermittelten Katalyse wurden verschiedene Methoden entwickelt und eingesetzt, darunter immunologische Nachweismethoden mit Anti-Substrat- und Anti-Produkt-Antikörpern und eine photometrische Methode mit Dimethylaminozimtaldehyd. Der Nachweis der hydrolytischen Aktivität gelang mit Hilfe eines Enzymsensors, basierend auf immobilisierter Tyrosinase. Die Antikörper N1-BC1-D11, N1-FA7-C4, N1-FA7-D12 und R3-LG2-F9 hydrolysierten die Benzylphenylcarbamate POCc18, POCc19 und Substanz 27. Der Nachweis der hydrolytischen Aktivität dieser Antikörper gelang auch mit Hilfe der HPLC.

Der katalytische Antikörper N1-BC1-D11 wurde kinetisch und thermodynamisch untersucht. Es wurde eine Michaelis-Menten-Kinetik mit K_m von 210 μM , v_{max} von 3 mM/min und k_{cat} von 222 min^{-1} beobachtet. Diese Werte korrelieren mit den Werten der wenigen bekannten Diphenylcarbamatspaltenden Abzyme. Die Beschleunigungsrate unserer Antikörper betrug 10. Das ÜZA Hei3 führte zur Hemmung der hydrolytischen Aktivität. Dies beweist, dass die Hydrolyse in der Antigenbindungsstelle stattfindet. Weiter wurde zwischen der Antikörperkonzentration und der Umsatzgeschwindigkeit eine lineare Abhängigkeit

festgestellt. Die thermodynamische Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D des Abzyms von 2,6 nM zeugt von einer sehr guten Affinität zum ÜZA, welche als Voraussetzung für die katalytische Aktivität angesehen werden kann.

Hydrolytisch aktiv waren nur Antikörper, die gegen das Übergangszustandsanalogon Hei3 hergestellt worden waren. Es wird vermutet, dass die Hydrolyse der Benzylphenylcarbamate über einen Additions-Eliminierungsmechanismus unter Ausbildung eines tetraedrischen Übergangszustandes verläuft, dessen analoge Verbindung Hei3 ist.

Im Rahmen der Generierung von Nachweisantikörpern zur Detektion der Substratabnahme bei der Hydrolyse wurden zwei Anti-Diuron-Antikörper hergestellt. Einer der Antikörper (B91-CG5) ist spezifisch für das Herbizid Diuron und hat einen IC_{50} -Wert von 0,19 $\mu\text{g/l}$ und eine untere Nachweisgrenze von 0,04 $\mu\text{g/l}$. Der andere Antikörper (B91-KF5) reagiert kreuz mit einer Palette ähnlicher Herbizide und hat für Diuron einen IC_{50} -Wert von 0,49 $\mu\text{g/l}$ und eine untere Nachweisgrenze von 0,07 $\mu\text{g/l}$. Mit diesen Antikörpern wurde ein empfindlicher Labortest, der ein Monitoring von Diuron auf Grundlage des durch die Trinkwasserverordnung festgeschriebenen Wertes von 0,1 $\mu\text{g/l}$ erlaubt, aufgebaut.

Der Effekt der Anti-Diuron-Antikörper auf die Diuron-inhibierte Photosynthese wurde *in vitro* und *in vivo* untersucht. Es wurde nachgewiesen, dass sowohl in isolierten Thylakoiden, als auch in intakten Algen eine Vorinkubation der Anti-Diuron-Antikörper mit Diuron zur Inaktivierung seiner Photosynthese-hemmenden Wirkung führt. Wurde der Elektronentransport in den isolierten Thylakoiden oder in Algen durch Diuron unterbrochen, so führte die Zugabe der Anti-Diuron-Antikörper zur Reaktivierung der Elektronenübertragung. Solche Effekte von Anti-Herbizid-Antikörpern wurden bisher noch nicht beschrieben.

Diese Arbeit entstand als Teil des Projektes „Katalytische Antikörper“ im durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft finanzierten Innovationskolleg „Biomolekulare Erkennungssysteme“. Sie baut zum Teil auf vorhandene Vorarbeiten auf und ihr Erfolg wurde nur durch die Kooperation mehrerer Institute der Universität Potsdam möglich.

6. Literaturverzeichnis

Abad, A., Moreno, M. J. and Montoya, A. (1998) Hapten synthesis and production of monoclonal antibodies to the N-methylcarbamate pesticide Methiocarb. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2417-2426

Agrawal, R. C., Kumar, S., and Mehrotra, N. K. (1996) Micronucleus induction by diuron in mouse bone marrow. *Toxicol. Lett.* 89, 1-4

Akerstrom, B. and Bjorck, L. (1989) Protein L : An immunoglobulin light chain-binding bacterial protein. Characterization of binding and physicochemical properties. *J. Biol. Chem.* 264, 33, 19740-19746

Armstrong, V. C., Farlow, D. W. and Moodie, R. B. (1968) *J. Chem. Soc. (B)*, 1099

Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenyl oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24, 1-15

Aslam, M. and Dent, A. (1998) *Bioconjugation*. MACMILLAN REFERENCE LTD, UK, pp. 256

Avalle, B., Friboulet, A. and Thomas, D. (2000) Enzymes and abzymes relationships. *J. Mol. Catalysis* 10, 39-45

Barbas, C. F. 3rd, Amberg, W., Simoncsits, A., Jones, T. M. and Lerner, A. R. (1993) Selection of human anti-hapten antibodies from semisynthetic libraries. *Gene* 137, 57-62

Barbas, C. F. 3rd, Heine, A., Zhong, G., Hoffmann, T., Gramatikova, S., Bjornestedt, R., List, B., Anderson, J., Stura, E. A., Wilson, A. and Lerner, R. A. (1997) Immune versus natural selection: Antibody aldolases with enzymic rates but broader scope. *Science* 278, 2085-2092

Baskaran, S. and Kennedy, I.R. (1999) Sorption and desorption kinetics of diuron, fluometuron, prometryn and pyrothiobac sodium in soils. *J. Environ. Sci. Health B* 34, 943-963

Bender, M. L. (1951) *J. Am. Chem. Soc.* 73, 1626-1629

Benedetti, F., Berti, F., Flego, M., Resmini, M. and Bastiani E. (1998) A Competitive immunoassay for the detection of esterolytic activity of antibodies and enzymes. *Anal. Biochem.* 256, 67-73

Benini, S., Rypniewski, W. R., Wilson, K. S., Miletti, S., Ciurli, S. and Mangani, S. (1999) A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels. *Structure* 7, 205-216

Benkovic, S. J., Adams, J. A. and Borders, S. L. Jr. (1990) The enzymic nature of antibody catalysis: development of multistep kinetic processing. *Science* 250, 1135-1139

Böger P. (1964) Das Strukturprotein aus Chloroplasten einzelliger Grünalgen und seine Beziehung zum Chlorophyll. *Flora (Jena)* 154, 174-211

Bone, R., Sampson, N. S., Bartlett, P. A. and Agard, D. A. (1991) Crystal structures of alpha-lytic protease complexes with irreversibly bound phosphonate esters. *Biochemistry* 30, 2263-2272

Cochran, A. G. and Schultz, P. G. (1990) Peroxidase activity of an antibody-heme complex. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 9414-9415

Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Marquies, D. H., Shevach, E. M. and Strober, W. (1992-2002) *Current Protocols in Immunology*. Wiley, J. and Sons, Inc.

Cosnier, S. and Innocent, C. (1993) A new strategy for the construction of a tyrosinase-based amperometric phenol and o-dophenol sensor. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 31, 147-160

Dawson, C. R. and Magee, R. J. (1955), Plant Tyrosinase (Polyphenol Oxidase). *Methods of Enzymology*, Vol. 2, 817-831

Dinaut, A. N., Chen, M.-J., Marks, A., Batey, R. A. and Taylor, S. D. (2000) Hydrolysis of an N-methylcarbamate by a catalytic antibody. *Chem. Commun.*, 385-386

el Fantroussi, S., Verschuere, L., Verstraete, W. and Top, E.M. (1999) Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene

fingerprints and community-level physiological profiles. *Appl. Environm. Microbiol.* 65, 982-988

Erzoy, O., Fleck, R., Sinskey, A. and Masamune, S. (1996) N–O-Acyl-Transfer Reaction Catalysed by Antibodies. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 13077-13078

Farlow, D. W. and Moodie, R. B. (1971) *J. Am. Chem. Soc. (B)*, 407-410

Fiedler, U., Artsaenko, O., Phillips, J. and Conrad U. (1999) Transgenic Plants - A Low Cost Production System for Recombinant Antibodies. In: *Recombinant Antibodies. Applications in Plant sciences and Plant Pathology.* (Harper K. and Ziegler A., Eds.) pp. 129-143; Taylor and Francis Philadelphia USA

Friboulet, A., Izadyar, L., Avasse, B., Roseto, A., Thomas, D. (1994) Abzyme Generation Using an Anti-Idiotypic Antibody as the “Internal Image” of an Enzyme Active Site. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 47, 229-239

Galfre, G., Howe, S. C., Milstein, C., Butcher, G. W. and Howard J. C. (1977) Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* 266, 550-552

Gallacher, G., Jackson, C. S., Searcey, M., Badman, G. T., Goel, R., Topham, C. M., Mellor, G. W. and Brocklehurst, K. (1991) A polyclonal antibody preparation with Michaelian catalytic properties. *Biochem. J.* 279, 871-881

Gallacher, G., Searcey, M., Jackson, C. S. and Brocklehurst, K. (1992) Polyclonal antibody-catalysed amide hydrolysis. *Biochem. J.* 284, 675-680

Gigant, B., Charbonnier, J.-B., Eshhar, Z., Green, B. S. and Knossow, M. (1997) X-ray structures of a hydrolytic antibody and of complexes elucidate catalytic pathway from substrate binding and transition state stabilization through water attack and product release. *PNAS* 94, 7857-7861

Gimeno, R. A., Aguilar, C., Marcé, R. M. and Borull, F. (2001) Monitoring of antifouling agents in water samples by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 915, 139-147

Goodrow, M. H., Sanborn, J. R., Stoutamire, D. W., Gee, S. J. and Hammock, B. D. (1995) Strategies for hapten design in: *Immunoanalysis of Agrochemicals*. ACS Symposium Series 586, 119-139

Goodrow, M. H. and Hammock, B. D. (1998) Hapten design for compound-selective antibodies: ELISAs for environmentally deleterious small molecules. *Anal. Chim. Acta* 376, 83-91

Guo, J., Huang, W. and Scanlan, T. S. (1994) Kinetic and mechanistic characterization of an efficient hydrolytic antibody: evidence for the formation of an acyl intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 6062-6069

Harrison, R. O., Goodrow, M. H., Gee, S. J. and Hammock, B. D. (1991) Monitoring toxic chemicals in humans, food, and the environment. In: *Immunoassays for trace chemical analysis*. (Vanderlan, M., Stanker, L. H., Watkins, B. E., Roberts, D. W., Eds.) ACS: Washington, D. C., pp. 14-27

Hermanson, G. T. (1996) *Bioconjugation Techniques*. Academic Press San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, pp. 170-173

Hilvert, D. (2000) Critical analysis of antibody catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 751-793

Hock, B., Fedtke, C. and Schmidt, R. R. (1995) *Herbizide*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, pp. 92-96, 110-129

Hu, R., Xie, G. Y., Zhang, X., Guo, Z. Q. and Sheng, J. (1998) Production and characterization of monoclonal anti-idiotypic antibody exhibiting a catalytic activity similar to carboxypeptidase A. *J. Biotechnol.* 61, 2, 109-115

Huang, T., Warsinke, A., Kuwana, T. and Scheller, F. W. (1998) Determination of L-Phenylalanine Based on an NADH-Detecting Biosensor. *Analy. Chem.* 70, 5, 991-997

Iverson, B. L., Iverson, S. A., Roberts, V. A., Getzoff, E. D., Tainer, J. A., Bencovic, S. J. and Lerner, R. A. (1990) Metalloantibodies. *Science* 249, 659-662

Janda, K. D., Lo, C.-H. L., Li, T., Barbas, C. F. 3rd, Wirsching, P. and Lerner, A. R. (1994) Direct selection for a catalytic mechanism from combinatorial antibody libraries. PNAS 91, 2532-2536

Janda, K. D., Weinhouse, M. I., Danon, T., Pacelli, K. A. and Schloeder, D. M. (1991) Antibody bait and switch catalysis: A survey of antigens capable of inducing abzymes with acyl-transfer properties. J. Am. Chem. Soc. 113, 5427- 5434

Janjic, N. and Tramontano, A. (1989) Antibody-catalysed redox reaction. J. Am. Chem. Soc. 111, 9109-9110

Jencks, W. P. (1969) Strain distortion and catalysis In: Catalysis in chemistry and Enzymology, McGraw-Hill, New York, pp. 288-289

Kallies, B. (1996) Eigenschaften und Hydrolysemechanismen von Acylverbindungen in der Gasphase und in wässriger Lösung. Dissertation, Universität Potsdam

Kakinuma, H., Shimazaki, K., Takahashi, K., Niihata, S., Aoki, Y., Hamada, K., Matsushita, H. and Nishi, Y. (1999) Comparison of phosphonate transition state analogs for inducing catalytic antibodies and evaluation of key structural factors by an ab initio study. Tetrahedron 55, 2559-2572

Karplus, P. A. and Rearson, M. A. (1997) 70 years of crystalline Urease: What have we learned? Acc. Chem. Res. 30, 330-337

Karsten, U. and Rudolph, M. (1985) Monoclonal antibodies against tumor-associated antigens: Mycoplasma as a major technical obstacle and its possible circumvention by azaserine selection medium. Arch. Geschwulstforsch. 55, 305-310

Karu, A. E., Goodrow, M. H., Schmidt, D. J., Hammock, B. D. and M. W. Bigelow, (1994) Synthesis of haptens and derivation of monoclonal antibodies for immunoassay of the phenylurea herbicide diuron. J. Agric. Food Chem. 42, 301-309

Kim, H. and Lipscomb, W. N. (1991) Comparison of the structures of three carboxypeptidase A-phosphonate complexes determined by X-ray crystallography. Biochemistry 30, 8171-8180

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

Krämer, P. M., Baumann, B. A., Stoks, P. G. (1997) Prototype of a newly developed immunochemical detection system for the determination of pesticide residues in water. *Anal. Chim. Acta* 347, 187-198

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

Lavey, B. J. and Janda, K. D. (1996) Catalytic antibody mediated hydrolysis of paraoxon. *J. Org. Chem.* 61, 7633- 7636

Lazar, D., Brokes, M., Naus, J. and L. Dvorak (1998) Mathematical Modelling of 3-(3',4'-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea Action in Plant Leaves. *J. Theor. Biol.* 191, 79-86

Lesley, S. A., Patten, P. A. and Schultz, P. G. (1993) A genetic approach to the generation of antibodies with enhanced catalytic activities. *PNAS* 90, 1160-1165

Lerner, R. A., Benkovic, S. J. and Schultz, P. G. (1991) At the crossroads of chemistry and immunology: catalytic antibodies. *Science* 252, 659-667

Li, L., Kavery, S., Tyutyulkova, S., Kazatchkine, S., and Paul, S. (1995) Catalytic activity of anti-thyroglobulin antibodies. *J. Immunol.* 154, 3328

Lindmark, R., Thoren-Tolling, K. and Sjoquist, J. (1983) Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera. *J. Immunol. Meth.* 62, 1-13

Lindner, W. and Robey, F. A. (1987) Automated synthesis and use of N-chloroacetyl-modified peptides for the preparation of synthetic peptide polymers and peptide-protein immunogens. *Int. J. Peptide Protein Res.* 30, 794-800

List, B., Shabat, D., Zhong, G., Turner, J. M., Li, A., Bui, T., Anderson, J., Lerner, R. A. and Barbas, C. F. 3rd (1999) A catalytic enantioselective route to hydroxy-substituted quaternary carbon centers; Resolution of tertiary aldols with a catalytic antibody. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 7283-7291

Louchart, X., Voltz, M., Andrieux, P. and Moussa, R. (2001) Herbicide transport to surface waters at field and watershed scales in a Mediterranean vineyard area. *J. Environ. Qual.* 30, 982-991

MacBeath, G. and Hilvert, D. (1996) Hydrolytic antibodies: variations on a theme. *Chem. Biol.* 3, 433-445

Matsuura, K., Yamamoto, K. and Sinohara, H. (1994) Amidase activity of human Bence Jones proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204, 57

Mets, B., Winger, G., Cabrera, C., Seo, S. and Jamdar, S. (1998) A catalytic antibody against cocaine prevents cocaine's reinforcing and toxic effects in rats. *PNAS* 95, 10176-10181

Mundorff, E. C., Hanson, M. A., Varvak, A., Ulrich, H. Schultz, P. G. and Stevens, R. C. (2000) Conformational effects in biological catalysis: an antibody-catalyzed oxy-cope rearrangement. *Biochemistry* 39, 627-632

Nilson, B. H., Logdberg, L., Karsten, W., Bjorck, L. and Akerstrom, B. (1993) Purification of antibodies using protein L-binding framework structures in the light chain variable domain. *J. Immunol. Meth.* 164, 1, 33-40

Paul, S., Li, L., Kalaga, R., Wilkins-Stevens, P., Stevens, F. J. and Solomon, A. (1995) Natural catalytic antibodies: peptide-hydrolyzing activities of Bence Jones proteins and VL fragment. *J. Biol. Chem.* 270, 15257-15261

Paul, S., Volle, D. J., Beach, C. M., Johnson, D. R., Powell, M. J. and Massey, R. J. (1989) Catalytic hydrolysis of vasoactive intestinal peptide by human autoantibody. *Science* 244, 1158-1162

Paul, S., Volle, D. J., Powell, M. J. and Massey, R. J. (1990) Site specificity of a catalytic vasoactive intestinal peptide antibody. An inhibitory vasoactive intestinal peptide subsequence distant from the scissile peptide bond. *J. Biol. Chem.* 265, 11910-11913

Pauling, L. (1948) Nature of forces between large molecules of biological interest. *Nature* 161, 707-709

Pollak, S. J., Jacobs, J. W. and Schultz, P. G. (1986) Selective chemical catalysis by an antibody. *Science* 234, 1570-1573

Rohde, M., Schenk, J. A., Heymann, S., Behrsing, O., Scharte, G., Kempfer, G., Woller, J., Höhne, W. E., Warsinke, A. and Micheel B. (1998) Production and characterisation of monoclonal antibodies against urea derivatives. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 75, 129-137

Sanches-Ferrer, A., Rodriguez-Lopez, J. N., Garsia-Canovas, F. and Garsia-Carmona, F. (1995) Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1247, 1-11

Satchell, D. P. N. and Satchell, R. S. (1992) The chemistry of acid derivatives. Vol. 2 (Patai, S., Ed.) Wiley: Chistester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, p. 747

Schultz, P. G. (1998) Bringing biological solutions to chemical problems. *PNAS* 95, 14590-14591

Shabat, D., Rader, C., List, B., Lerner, R. A. and Barbas, C.F. 3rd (1999) Multiple event activation of a generic prodrug trigger by antibody catalysis. *PNAS* 96, 6925-6930

Shokat, K. M., Luemann, C. J., Sigasawara, R. and Schultz, P. G. (1988) An antibody-mediated redox reaction. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27, 1172-1174

Shokat, K. M., Ko, M. K., Scanlan, T. S., Kochersperger, L., Yonkovich, S., Thaisrivongs, S. and Schultz, P. G. (1990) Katalytische Antikörper: eine Klasse von Übergangszustands-Analoga zur Erzeugung hydrolytischer Antikörper. *Angew. Chem.* 102, 1339-1346

Smiley, J. A. and Benkovic, S. J. (1994) Selection of catalytic antibodies for a biosynthetic reaction from a combinatorial cDNA library by complementation of an auxotrophic *Escherichia coli*: Antibodies for orotate decarboxylation. *PNAS* 91, 8319-8323

Stewart, J. D. and Benkovic, S. J. (1995) Transition-state stabilization as a measure of the efficiency of antibody catalysis. *Nature* 375, 388-391

Stöcklein, W. F. M., Warsinke, A., Micheel, B., Kempfer, G., Höhne, W. and F. W. Scheller (1998) Diphenylurea hapten sensing with a monoclonal antibody and its Fab fragment: Kinetic and thermodynamic investigations. *Anal. Chim. Acta* 362, 101-111

Stöcklein, W. F. M., Rohde, M., Scharte, G., Behrsing, O., Warsinke, A., Micheel, B. and Scheller, F. W. (2000) Sensitive detection of triazine and phenylurea pesticides in pure organic solvent by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): stabilities, solubilities and sensitivities. *Anal. Chim. Acta* 405, 255-265

Stoicheva, N. G. and Hui, S. W. (1994) Electrically induced fusion of mammalian cells in the presence of polyethylene glycol. *Membr. Biol.* 140, 177-182

Tang, Y., Hicks, J. B. and Hilvert, D. (1991) In vivo catalysis of a metabolically essential reaction by an antibody. *PNAS* 88, 8784-8786

Taran, F., Renard, P. Y., Créminon, C., Valleix, A., Frobert, Y., Pradelles, P., Grassi, J. and Mioskowski, C. (1999) Competitive immunoassay (Cat-EIA), a helpful technique for catalytic antibody detection. Part I. *Tetrahedron Letters* 40, 1887-1890

Taran, F., Renard, P. Y., Créminon, C., Valleix, A., Frobert, Y., Pradelles, P., Grassi, J. and Mioskowski, C. (1999) Competitive immunoassay (Cat-EIA), a helpful technique for catalytic antibody detection. Part II. *Tetrahedron Letters* 40, 1891-1894

Tawfik, D. S., Green, B. S., Chap, R., Sela, M. and Eshhar, Z. (1993) catELISA: A facile general route to catalytic antibodies. *PNAS* 90, 373-377

Tawfik, D. S., Lindner, A. B., Chap, R., Eshhar, Z. and Green, B. S. (1997) Efficient and selective p-nitrophenyl-ester-hydrolyzing antibodies elicited by a p-nitrobenzyl phosphonate hapten. *Eur. J. Biochem.* 244, 619-626

Tawfik, D. S., Chap, R., Green, B. S., Sela, M. and Eshhar, Z. (1995) Unexpectedly high occurrence of catalytic antibodies in MLR/lpr and SJL mice immunized with a transition-state analog: Is there a linkage to autoimmunity? *PNAS* 92, 2145-2149

Toker, J. D., Wentworth, P. Jr., Hu, Y., Houk, K. N. and Janda K. D. (2000) Antibody-catalysis of a bimolecular asymmetric 1,3-dipolar cycloaddition reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 3244-3245

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

Tramontano, A., Janda, K. D. and Lerner, R. A. (1986) Catalytic Antibodies. *Science* 234, 1566-1570

Tramontano, A. and Lerner, R. A. (1988) Catalytic Antibodies. *Scientific American*, March, 58-70

Tronrud, D. E., Holded, H. M. and Matthews, B. W. (1987) Structures of two thermolysin-inhibitor complexes that differ by a single hydrogen bond. *Science* 235, 571-574

Turnbull, G.A., Ousley, M., Walker, A., Shaw, E. and Morgan, J.A. (2001) Degradation of substituted phenylurea herbicides by *Arthrobacter globiformis* strain D47 and characterization of a plasmid-associated hydrolase gene, *puhA*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2270-2275

Van Vranken, D. L., Panomitros, D. and Schultz, P. G. (1994) Catalysis of carbamate hydrolysis by an antibody. *Tetrahedron Letters* 35, 23, 3873-3876

Waldmann, A. (1999) Monoclonal antibodies to progesterone: characterization and selection for enzyme immunoassay in bovine milk. *Hybridoma* 18, 289-296

Weiner, D. P., Wiemann, T., Wolfe, M. M., Wentworth, P. and Janda, K. D. (1997) A pentacoordinate oxorhenium (V) metallochelate elicits antibody catalysts for phosphodiester cleavage. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 4088-4089

Wentworth, P., Datta, A., Blakey, D., Boyle, T., Partridge, L. J. and Blackburn, G. M. (1996) Toward antibody-directed "abzyme" prodrug therapy, ADAPT: Carbamate prodrug activation by a catalytic antibody and its in vitro application to human tumor cell killing. *PNAS* 93, 799-803

Wentworth, P. Jr., Datta, A., Smith, S., Marshall, A., Partridge, L. J. and Blackburn, G. M. (1997) Antibody Catalysis of $B_{Ac} 2$ Aryl Carbamate Ester Hydrolysis: A Highly Disfavored Chemical Process. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 2315-2316

Wirsching, P., Ashley, J. A., Lo, C.-H. L., Janda, K.J. and Lerner, R. A. (1995) Reactive immunization. *Science* 270, 1775-1782

Wittke, K., Hajimiragha, H., Dunemann, L., Begerow, J. (2001) Determination of dichloroanilines in human urine by GC-MS, GC-MS-MS, and GC-EDC as markers of low-level pesticide exposure. *J. Chromatogr. B*, 755, 215-228

Xiong, J., Minagawa, J., Crofts, A. and Govindjee (1998) Loss of inhibition by formate in newly constructed photosystem II D1 mutants, D1-R257E and D1-R257M of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* 1365, 473-491

Xiong, J., Subramaniam, S. and Govindjee (1996) Modeling of the D1/D2 proteins and cofactors of the photosystem II reaction center: implications for herbicide and bicarbonate binding. *Protein Sci.* 5, 2054-2073

Yang, C. and El Rassi, Z. (1999) Electrically driven microseparation methods for pesticides and metabolites II: On-line and off-line preconcentration of urea herbicides in capillary electrochromatography. *Electrophoresis* 20, 2337-2342

Yocum, C. F. (1980) in: *Methods of Enzymology*, Vol. 69 (San Pietro, A., Ed.) Academic Press New York London Toronto Sydney San Francisco, pp. 576-584

Zemel, R., Schindler, D. G., Tawfik, D. S., Eshhar, Z. and Green, B. S. (1994) Differences in the biochemical properties of esterolytic antibodies correlate with structural diversity. *Mol. Immunol.* 31, 127-137

Zhong, G., Lerner, R. A. and Barbas, C. F. 3rd (1999) Erweiterung des Repertoires von katalytischen Antikörpern mit Aldolaseaktivität durch Kombination von reaktiver Immunisierung und Übergangszustandstheorie: neue Enantio- und Diastereoselektivitäten. *Angew. Chem.* 111, 24, 3957-3960

7. Abkürzungsverzeichnis

Ab	Antibody (engl.: Antikörper)
AP	Alkalische Phosphatase
BSA	Bovine Serum Albumin (engl.: Rinderserumalbumin)
BSS	Balanced Salt Solution (engl.: eingestellte Salzlösung)
catAb	Catalytic Antibody (engl.: katalytischer Antikörper)
catELISA	Catalytic Enzyme Linked Immunosorbent Assay (engl.: katalytischer Bindungsassay)
CFA	Komplettes Freundsches Adjuvants
DCMU	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-Dimethylharnstoff
DCPIP	2,6-Dichlorphenol-indophenol
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DSS	Disuccinimidylsüberat
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimide HCl
FA	Inkomplettes Freundsches Adjuvants
Ig.	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin (engl.: Hämocyanin)
MALDI-TOF-MS	Matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight - massspectroscopy
MES	Morpholinethansulfonsäure
MW	Molecular Weight (engl.: Molekulargewicht)
NHS	N-Hydroxysuccinimidester
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline (engl.: Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PEG	Polyethylenglykol
rpm	rotations per minute (engl.: Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
scFv	single chain variable Fragment (engl.: Einzelketten-Antikörper)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis (engl.: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

8. Danksagung

Ich möchte meinem Betreuer Prof. Dr. Burkhard Micheel für die wertvolle fachliche und sonstige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit danken. Besonders danke ich ihm für die intellektuelle Freiheit, die er mir gewährte und dafür, dass er immer für mich da war. Mein besonderer Dank gilt Dr. Olaf Behring, der mich in die Hybridomtechnik sowie in die gängigen Methoden unseres Labors eingearbeitet hat, immer ein offenes Ohr für meine Wünsche und Probleme hatte und somit eine wichtige Stütze dieser Arbeit war.

Weiterhin möchte ich Manuela Heiner und Gudrun Scharte für alle Vorarbeiten, besonders bei der Generierung monoklonaler Antikörper danken. Mein Dank gilt auch allen netten und hilfsbereiten Kollegen aus unserer Arbeitsgruppe besonders Gerda Wilhelm, Thorsten Stroh, Jörg Schenk und Beatrix Richter.

Ganz herzlich möchte ich auch Dr. Axel Warsinke danken, dessen innovative Ideen und dessen stetes Interesse an dem Fortgang der Versuche den Erfolg dieser Arbeit gewährleisteten. Ich bedanke mich auch bei allen Kollegen aus seiner Arbeitsgruppe und besonders bei Kristian Lettau, Anita Chojnacki und Dr. Walter Stöcklein. Bei Herrn Prof. Scheller möchte ich für das Ermöglichen meiner Teilnahme an Kongressen und Kursen sowie für das Interesse am Projekt bedanken.

Besonders möchte ich Dr. Bernd Kallies für die zahlreichen Diskussionen und sein Engagement danken.

Ich danke auch Prof. Dr. Wolfgang Höhne für die zahlreichen Diskussionen und Anregungen sowie seiner Arbeitsgruppe und besonders Kristina Zubow für die methodische Unterstützung.

Herrn Prof. Martin Steup und Dr. Gerhard Ritte danke ich für die methodische und fachliche Unterstützung bei der Durchführung der pflanzenphysiologischen Versuche.

Zum Schluss möchte ich meinem Mann danken, denn ohne seine Unterstützung wäre diese Arbeit mit Sicherheit nicht entstanden. Ich möchte ihm für die Übernahme diverser Aufgaben sowie seine Fähigkeit, mir zuzuhören und mich zu motivieren, danken.

9. Anhang

Nachfolgend sind alle Substanzen mit Formel und Namen aufgelistet. Für die wichtigsten Gruppen von Substanzen wird das Syntheseprinzip angegeben.

Namen der Arylcarbamate (Tabellen 2.1A und 2.1B)

Substanz 1:	Phenylcarbamate
Substanz 2:	Phenyl-3-phenylethylcarbamate
Substanz 3:	4-Chlorphenyl-phenylcarbamate
Substanz 4:	Phenyl-4-ethylphenylcarbamate
Substanz 5:	Phenyl-2-methylphenylcarbamate
Substanz 6:	Phenyl-phenylcarbamate
Substanz 7:	4-Nitrophenyldimethylcarbamate
Substanz 8:	Phenyl-2,5-dichlorphenylcarbamate
Substanz 9:	Phenyl-3-nitrophenylcarbamate
Substanz 10:	Phenyl-mesitylcarbamate
Substanz 11:	Ethyl-phenylcarbamate
Substanz 12:	Methyl-phenylcarbamate
Substanz 13:	Isopropyl-phenylcarbamate
Substanz 14:	terz. Butyl-phenylcarbamate
Substanz 15:	Phenyl-4-nitrophenylcarbamate
Substanz 16:	Phenyl-4-methylphenylcarbamate
Substanz 17:	Phenyl-3,5-dimethoxyphenylcarbamate
Substanz 18:	Phenyl-4-methoxyphenylcarbamate
Substanz 19:	Phenyl-3,4-dichlorphenylcarbamate
Substanz 20:	Phenyl-2,6-dichlorphenylcarbamate
Substanz 21:	Phenyl-3-methoxyphenylcarbamate
Substanz 22:	Phenyl-4-methyl-3-nitrophenylcarbamate
Substanz 23:	Phenyl-3-chlorphenylcarbamate
Substanz 24:	Phenyl-4-chlorphenylcarbamate
POCc12:	2-[(Chloracetyl)amino]benzyl-4-chlorphenylcarbamate
POCc18:	4-Chlorphenyl-2-aminobenzylcarbamate
POCc19:	4-Chlorphenyl-2-[(chloracetyl)amino]benzylcarbamate
POCc20:	2-[(Chloracetyl)amino]benzyl-4-nitrophenylcarbamate
POCc21:	2-[(Chloracetyl)amino]benzyl-3-chlorphenylcarbamate
POCc22:	2-[(Chloracetyl)amino]benzyl-3-(trifluormethyl)phenylcarbamate
POCc23:	2-[(Chloracetyl)amino]benzyl-4-methoxyphenylcarbamate
POCc24:	2-[(Chloracetyl)amino]benzyl-4-bromphenylcarbamate
POCc25:	2-[(Chloracetyl)amino]benzyl-3,4-dichlorphenylcarbamate

POCc26:	2-[(Chloracetyl)amino]benzyl-phenylcarbamat
POCc27:	4-Nitrophenyl-2-[(chloracetyl)amino]benzylcarbamat
Substanz 27:	Phenyl-benzylcarbamat

Namen der Arylharnstoffe (Tabellen 2.2 und 2.3)

OC1:	N-(2-Aminobenzyl)-N`-(4-chlorphenyl)harnstoff
OC2:	2-Chlor-N-{2-[[{(4-chlorphenyl)amino]carbonyl}amino)methyl]phenyl}-acetamid
POCc3:	N-(2-Aminobenzyl)-N,N-dimethylharnstoff
POCc4:	2-Chlor-N-[2-[[{(dimethylamino)carbonyl}amino)methyl]phenyl]acetamid
POCc5:	3-[[{(benzylamino)carbonyl}(methyl)amino]propionsäure
POCc6:	3-[[{(3-Chlorbenzyl)amino]carbonyl}(methyl)amino]propionsäure
POCc7:	3-[[{(4-Chlorbenzyl)amino]carbonyl}(methyl)amino]propionsäure
POCc8:	3-[[{(3-Metoxybenzyl)amino]carbonyl}(methyl)amino]propionsäure
POCc9:	3-[[{(3,4-Dichlorbenzyl)amino]carbonyl}(methyl)amino]propionsäure

Namen der potenziellen Spaltprodukte (Tabelle 2.4)

POCc10:	2,2-Dichlor-N-[2-(hydroxymethyl)phenyl]acetamid
POCc11:	2,2-Dichlor-N-(2-methylphenyl)-acetamid
POCc17:	N-(2-aminophenyl)-2,2-dichloracetamid
H1:	4-(4-Aminophenyl)butansäure
H2:	Amino-(2-chlor-5-hydroxyphenyl)essigsäure
H3:	5-Amino-2-chlor-benzoesäure
H4:	2-Chlor-5-hydroxy-benzoesäure
H5:	4-(2-Aminoethyl)anilin
H6:	2-(Aminomethyl)-3,4-dichloranilin

Namen der Übergangszustandsanaloga (Tabelle 2.5)

Hei3:	(2-Aminophenyl)-phosphoramidsäure-mono(4-chlorphenyl)-ester
OC4:	(2-Aminobenzyl)-phosphoramidsäure-mono(4-chlorphenyl)-ester
OC5:	(4-Aminobenzyl)-phosphoramidsäure-mono(4-chlorphenyl)-ester
OC7:	4-[(2-Oxido-1,2,3,4-tetrahydro-1,3,2-benzodiazaphosphinin-2-yl)oxy]anilin
POCs14:	3-[[{(4-Chlorphenyl)amino]sulfonyl}(methyl)amino]propionsäure

Synthesen verschiedener Haptene

Arylcarbamate

Synthese von POCc12 und analogen substituierten Benzylphenylcarbamaten:

Von dem zuerst hergestellten chloracetylierten 2-Aminobenzylalkohol (siehe Synthese des potenziellen Produktes POC_c10 – Anhang, Seite 135) wurden 0,01 mol in 50 bis 100 ml Toluol gelöst und mit einer katalytischen Menge von 2 ml Pyridin versetzt. Dazu wurden über 120 Minuten 0,01 mol des entsprechenden in Toluol gelösten Isocyanates zugetropft und über Nacht wurde bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wurde abgesaugt und aus Ethanol umkristallisiert.

Synthese der Benzylphenylcarbamate POCc18, POCc19 und POCc27:

Zunächst wurden die Verbindungen mit freier aromatischer Aminogruppe dargestellt.

0,02 mol 2-Aminobenzylamin wurden in 100 bis 200 ml Ether oder Toluol vorgelegt, anschliessend wurden 0,01 mol des entsprechenden Chlorameisensäure-Phenylesters (die 4-Chlor- bzw. Nitroverbindung) in Ether oder Toluol über 120 Minuten dazugetropft. Es wurde 2 Tage gerührt und abschließend abgesaugt. Die Trennung der verschiedenen Produkte erfolgte durch fraktioniertes Kristallisieren aus Methanol.

0,01 mol Verbindung mit freier aromatischer Aminogruppe wurden in Toluol unter Zusatz einer katalytischen Menge (2 ml) Pyridin vorgelegt und mit 0,01 mol Chloressigsäureanhydrid in Ether versetzt und über Nacht gerührt. Anschliessend wurde abgesaugt und aus Ethanol umkristallisiert.

Arylharnstoffe

Synthese des Benzylphenylharnstoffs OC2:

Zunächst wurde OC1 synthetisiert.

0,1 mol 2-Aminobenzylamin wurden in 50 bis 150 ml Toluol gelöst, dann wurden über 120 Minuten 0,1 mol 4-Chlorphenylisocyanat, gelöst in 50 ml Toluol, zugetropft. Über Nacht wurde bei Raumtemperatur gerührt, dann abgesaugt und aus Ethanol umkristallisiert.

Nachfolgend wurde chloracetyliert:

1 mol Substrat wurde in einem Äquivalent kalter 4 N NaOH gelöst, 2 mol Chloressigsäureanhydrid in 4 N NaOH zugegeben und über Nacht gerührt, anschliessend wurde mit HCl bis pH 1,7 angesäuert. Die gesamte Lösung wurde 8 bis 12 Mal mit Ethylacetat extrahiert, anschliessend 1 bis 2 Mal mit Petrolether gewaschen. Die vereinigten Extrakte wurden in Aceton aufgenommen, filtriert und getrocknet. Danach erfolgte die Kristallisation. In einigen Fällen wurde eingeeengt.

Synthese von POCc9 und analogen substituierten Diphenylharnstoffen:

0,05 mol des entsprechenden Phenyl-isocyanates wurden in 75 ml Toluol gelöst, über 120 Minuten wurden 0,05 mol 3-Methyl-aminopropionitril dazugetropft, nach 24 Stunden wurde abgesaugt und aus Ethanol umkristallisiert. Zur Einführung der kopplungsfähigen Gruppe wurde das Nitril zur freien Säure verseift, indem es in wenig halbkonzentrierter NaOH (oder KOH) aufgenommen und bei ca. 80 °C 12 Stunden gerührt wurde. Starker Geruch nach NH₃ zeigte den Verlauf der Reaktion an. Die Reaktion war beendet, als kein NH₃-Geruch mehr wahrnehmbar war.

Potenzielle Spaltprodukte

Synthese von POCc10:

12,3 g 2-Aminobenzylalkohol wurden in 200 ml Ether vorgelegt. Unter Kühlung wurden über 120 Minuten 5,5 g Chloracetylchlorid in 50 ml Toluol dazugetropft und über Nacht gerührt. Das Hydrochlorid wurde abgesaugt, die Lösung einrotiert. Das Hydrochlorid wurde nochmals mit Toluol gekocht, heiß abgesaugt und die Lösung einrotiert, um weiteres Produkt zu erhalten.

Die Darstellung von POCc11 und POCc17 erfolgte in Analogie zu POCc10.

Übergangszustandsanaloga

Synthese von Hei3 und OC4:

Zu einer Lösung von 0,042 mol Amin (2-Phenylendiamin (für Hei3) bzw. 2-Aminobenzylamin (für OC4)) in 65 ml trockenem Benzol wurden 0,023 mol Phosphorsäure-phenylesterdichlorid in 30 ml Benzol unter Rühren bei 0 °C zugegeben und 3 h bei Raumtemperatur gehalten. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel abgezogen, der trockene Rückstand in 300 ml Eiswasser gegeben und über Nacht stehen gelassen. Nach dem Absaugen wurde erneut in 100 ml Eiswasser suspendiert, abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die Umkristallisation erfolgte aus Ethanol/Aqua dest. (Verhältnis 1:1).

Als Nebenreaktionen wurden Cyclisierungen beobachtet, durch fraktioniertes Umkristallisieren wurden Produkt und Nebenprodukt getrennt.

Synthese von OC6:

Für die Synthese von OC6 wurde 2-Aminobenzylalkohol (0,05 mol) in 100 – 200 ml Ether vorgelegt und dazu über 120 Minuten 0,025 mol Phosphorsäure-dichlorid (die *p*-

Nitroverbindung) zugetropft und 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde abgesaugt und unter vermindertem Druck getrocknet.

Synthese von OC7:

OC7 wurde aus OC6 synthetisiert.

Die Verbindung OC6 wurde in Dioxan aufgenommen und in einem Autoklaven (Roth, Karlsruhe) unter Rühren und bei Raumtemperatur bei 40 bar mit elementarem Wasserstoff versetzt. Die Reaktion erforderte die Verwendung eines Palladiumhydroxid-Katalysators (Aldrich, Taufkirchen, BRD).

Nach 2 Tagen wurde die Reaktion beendet und die Katalysatorreste von der Lösung abzentrifugiert. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt, das Produkt fiel nach wenigen Tagen bei 4 °C aus.

Synthese von POCs14:

Zuerst wurde das Sulfonylacetamid dargestellt.

Zu einer Suspension von 0,1 mol *p*-Chloranilin in 300 ml Benzol wurden 0,1 mol Essigsäureanhydrid unter Rühren zugegeben. Nach Abkühlen wurde der Feststoff abgesaugt, mit Benzen gespült und getrocknet. 0,05 mol des entstandenen *p*-Chloracetanilid und 0,05 mol Natriumhydrid wurden in 100 ml Benzen 12 h am Rückfluss gekocht. Die Suspension wurde auf 10 °C abgekühlt und eine Lösung von 0,05 mol Sulfurylchlorid in 30 ml Benzen zugetropft. Der Feststoff wurde abgesaugt und die benzenische Lösung unter vermindertem Druck einrotiert. Das gelblich-braune Öl kristallisierte im Kühlschrank (4 °C).

Zu einer benzenischen Lösung von 0,01 mol Sulfonylacetamid wurden 0,03 mol N-Methylpropionitril gegeben. Die Lösung wurde 1 h am Rückfluss gekocht. Das Hydrochlorid des N-Methylpropionitrils wurde abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde in 1 N Natronlauge aufgenommen, 1 h am Rückfluss gekocht und auf eiskalte Salzsäure gegossen. Der Niederschlag wurde abgesaugt und aus Chloroform umkristallisiert.